



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Untersuchung einer potentiell Schwefelwasserstoff-
freisetzenden Substanz (MAH 3 HCl) an isolierten
Herzmuskelpräparaten und glatter Muskulatur von
Meerschweinchen“

verfasst von

Mia Krušić

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreut von:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

Danksagung

Ein herzliches Dankeschön geht an alle Menschen, die mich bei der Erstellung meiner Diplomarbeit unterstützt haben.

Ganz besonderer Dank geht an meinen Diplomarbeitsbetreuer Ao.Univ. Prof. Dr. Christian Studenik für seine fachliche und engagierte Betreuung während der praktischen Tätigkeit als auch bei der Erstellung dieser Arbeit.

Außerdem bedanke ich an die Arbeitsgruppe von Ao. Prof. Dr.Thomas Erker aus dem Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie für die Synthese und Bereitstellung der Testsubstanz.

Ein ganz großes Dankeschön möchte ich meinen Eltern Ankica und Boris Krušić aussprechen, die mich nicht nur finanziell, sondern auch moralisch immer unterstützt und mir den Rücken gestärkt haben.

Ich danke von ganzem Herzen meinem Freund Duško Redžić, der mich an schlechten und guten Tagen unterstützt und an mich geglaubt hat.

Abschließend ein großes Danke an alle meine Freunde und Studienkolleginnen, insbesondere an Emina Polimac, für die schöne und lustige Momente, sowie für die gute Laune.

Danke

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Zielsetzung	1
1.2. Schwefelwasserstoff - Die mögliche Wirkform	2
1.2.1. Vorkommen und Eigenschaften	2
1.2.2. Biologische Funktion.....	3
2. MATERIAL UND METHODIK	5
2.1. Testsubstanz MAH 3 HCl	5
2.2. Lösungsmittel und Pipettierschema.....	6
2.3. Glibenclamid	8
2.4. Verwendete Lösungen	9
2.4.1. Physiologische Elektrolytlösungen und Begasung	9
2.4.2. Kaliumchloridlösung	10
2.5. Versuchstiere.....	12
2.6. Entnahme und Präparation der Organe	13
2.6.1. Organentnahme	13
2.6.2. Rechter Vorhof (Atrium dexter).....	14
2.6.3. Papillarmuskel (Musculus papillaris)	15
2.6.4. Lungenarterie (Arteria pulmonalis)	17
2.6.5. Darm (Terminales Ileum)	17
2.6.6. Aorta (Aorta descendens).....	18
2.7. Versuchsanordnung und Apparaturen	19
2.7.1. Apparatur I.....	20
2.7.2. Apparatur II.....	22
2.7.3. Kraftwandler, Verstärker, Schreiber	23
2.7.4. Die Gasversorgung	24
2.7.5. Das Wasserbad	24
2.8. Versuchsabläufe	25
2.8.1. Rechter Vorhof (Atrium dexter).....	25
2.8.2. Lungenarterie (Arteria pulmonalis)	25
2.8.3. Aorta (Aorta descendens).....	26
2.8.4. Papillarmuskel (Musculus papillaris)	26
2.8.5. Darm (Terminales Ileum)	27
2.9. Auswertung der Ergebnisse	28
2.9.1. Rechter Vorhof	28
2.9.2. Papillarmuskel	28
2.9.3. Glatte Muskulatur (Aorta, Darm, Lungenarterie)	28
2.10. Statistik	30
3. ERGEBNISSE	31
3.1. Wirkung von MAH 3 HCl auf den rechten Vorhof	31
3.2. Wirkung von MAH 3 HCl auf die Lungenarterie	34
3.3. Wirkung von MAH 3 HCl auf den Papillarmuskel	37
3.4. Wirkung von MAH 3 HCl auf den Darm	40
3.5. Wirkung von MAH 3 HCl auf die Aorta	43

3.6. Untersuchung mit Glibenclamid (Wirkmechanismus)	46
3.6.1. Ergebnisse der Versuche mit 30 µmol/l Glibenclamid	46
3.6.2. Ergebnisse der Versuche mit 100 µmol/l Glibenclamid	49
4. DISKUSSION	52
4.1. Versuchsreihen an glattmuskulären Organen.....	53
4.2. Versuchsreihe am quergestreiften Herzmuskulatur.....	55
4.3. Versuchsreihen mit MAH 3 HCl in Kombination mit Glibenclamid.....	56
5. ZUSAMMENFASSUNG	57
6. LITERATURVERZEICHNIS	58
7. CURRICULUM VITAE	61

1. EINLEITUNG

1.1. Zielsetzung

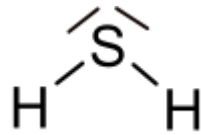
In Rahmen dieser Diplomarbeit soll eine Verbindung (MAH 3 HCl), die möglicherweise Schwefelwasserstoff (H₂S) freisetzt untersucht werden. Die zu untersuchende Substanz wurde am Department für Medizinische/ Pharmazeutische Chemie der Universität Wien synthetisiert.

Die Untersuchungen werden an isolierten Meerschweinorganen durchgeführt, weil diese physiologische Ähnlichkeit im Aufbau der Ionenkanäle aufweisen und dadurch können die Ergebnisse auch für Menschen herangezogen werden.

Es werden die Wirkungen der Testsubstanz MAH 3 HCl auf zwei Herzpräparate, auf den Papillarmuskel und den rechten Vorhof, als auch auf drei Präparate der glatten Muskulatur, auf die Lungenarterien, Aorta und den Dünndarm. Die Untersuchungen werden mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz durchgeführt und es werden die dilatierenden Aktivitäten und die Einflüsse auf Inotropie und Chronotropie mittels isometrischen Kontraktionsmessungen ermittelt.

Um die Reproduzierbarkeit und Auswertbarkeit zu gewährleisten, ist es notwendig immer nach vorgegebenen Präpariertechniken der entsprechenden Organe, als auch der richtigen Einstellungen der Messgeräte zu arbeiten.

1.2. Schwefelwasserstoff - Die mögliche Wirkform



1.2.1. Vorkommen und Eigenschaften

Schwefelwasserstoff ist ein farbloses, stechendes, stark giftiges und nach faulenden Eiern riechendes Gas (Winder und Winder, 1933).

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

Bei den Menschen kann es leicht zu H₂S-Vergiftungen kommen, weil Schwefelwasserstoff ein äußerst giftiges Gas ist und eine starke Betäubung der Geruchsrezeptoren bewirkt, wobei man eine Zunahme der Konzentration nicht mehr über den Geruch wahrnehmen kann (Aktories et al. 2009).

Eine besonders reizende Wirkung kann H₂S an Schleimhäuten, vor allem der Nase, des Rachens, in der Lunge und in den Augen verursachen.

Abbildung 1: EU-Gefahrstoffkennzeichnung aus EU-Verordnung



Sehr giftig
(T+)



Hochentzündlich
(F+)



Umweltgefährlich
(N)

Der genaue Wirkmechanismus der Schwefelwasserstoffvergiftungen ist noch nicht geklärt, aber er beruht auf einer Zerstörung des Hämoglobins, eines roten Farbstoff des Blutes, wobei wahrscheinlich O₂-übertragende Enzyme inaktiviert werden.

Schwefelwasserstoff wurde in der Therapie bei mehreren Krankheiten verwendet, z.B. bei Hypertonie (Yan et al. 2004), beim Down-Syndrom (Kamoun 2001), bei akuter Pankreatitis (Bhatia et al. 2005) und beim septischen Schock (Li et al. 2005).

H₂S kann auch Schäden im zentralen und peripheren Nervensystem hervorrufen (Aktories et al. 2009).

1.2.2. Biologische Funktion

Die Wirkung von Schwefelwasserstoff ist nicht nur auf pathophysiologische Prozesse beschränkt. Es gibt eine Ähnlichkeit zu Stickstoffmonoxid (NO), einem im Organismus vorkommenden Botenstoff.

H₂S wird im Körper, in Endothelzellen der Blutgefäße, sowie in glatten Muskelzellen durch Abbau von schwefelhaltigen Aminosäuren, wie L-Cystein und L-Methionin produziert (Moore et al. 2003).

Die Biosynthese wird durch zwei Enzyme, Cystathion-β-Synthase (CBS) und Cystathion-γ-Lyase (CSE), katalysiert (Stipanuk und Beck 1982, Griffith 1987, Erickson et al. 1990, Swaroop et al. 1992, Hosoki et al. 1997). CBS kommt in höheren Konzentrationen im Gehirn, in der Leber und in der Niere vor (Abe und Kimura 1996), aber nicht in den Blutgefäßen (Hosoki et al. 1997; Kimura 2000; Zhao et al. 2001), weil CSE in verschiedenen Blutgefäßsystemen, in der Leber und in der Niere stark exprimiert ist, während es im Gehirn nur in kleinen Konzentrationen vorkommt.

Es wurden mehrere Studien durchgeführt, um die Wirkung und den Wirkmechanismus von H₂S aufzuklären.

Freigesetztes H₂S führt zur einer Erweiterung der Blutgefäße (Vasodilatation), was eine relaxierende Wirkung an der Aorta von Ratten in *in vitro* Versuchen gezeigt hat (Hosoki et al.

1997). Es wurde auch festgestellt, dass es durch die Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen zur Dilatation kommt (Zhao et al. 2001).

Durch die Öffnung der K_{ATP} -Kanäle kommt es zur Hyperpolarisation der Zellmembran und zur Inaktivierung von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen vom L-Typ und damit zur Senkung der intrazellulären Calcium-Konzentration und anschließend zur Erweiterung (Dilatation) der glatten Muskulatur des Gefäßsystems (Zhao et al. 2001; Moore et al. 2003; Nelson et al. 1995; Cheng et al. 2004).

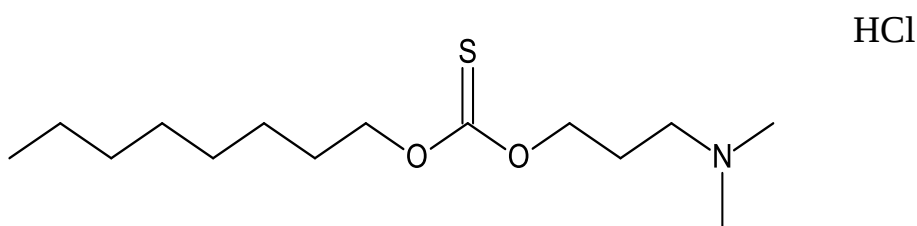
Die ATP-abhängigen K^+ -Kanäle kommen in verschiedenen Organen im Körper, wie in den B-Zellen des Pankreas, in der glatten Muskulatur, im Skelett, im Gehirn und in der Leber vor, wobei sie ein wichtiger Angriffspunkt für verschiedene Wirkstoffe sind (Ashcroft F. 1998; Terzic et al. 1995; Seino und Miki 2003).

2. MATERIAL UND METHODIK

2.1. Testsubstanz MAH 3 HCl

Die Substanz wurde am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie an der Universität Wien von Ao. Prof. Dr. Thomas Erker und seiner Arbeitsgruppe neu synthetisiert, und stand dann für die Versuche dieser Diplomarbeit zur Verfügung.

Abbildung 2: Chemische Struktur von MAH 3 HCl



Chemische und physikalische Eigenschaften der Testsubstanz MAH 3 :

- Bezeichnung: MAH 3 HCl
- MG: 311,9 g/mol
- Nomenklatur: 3-(Dimethylamino)propoxy-2-octyloxy-methanthioat Hydrochlorid
- Farbe: weiß
- Löslichkeit: gut löslich in Wasser

2.2. Lösungsmittel und Pipettierschema

Täglich wurde eine Stammlösung der Substanz mit Aqua bidestillata frisch hergestellt, weil die MAH 3 HCl rasch und vollständig in Wasser löslich ist.

Zur besseren Haltbarkeit wird die Testsubstanz, als auch die Stammlösung der Testsubstanz im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Einwaage der Testsubstanz in mg wurde für zwei unterschiedliche Volumina der Organbäder (8 ml und 25 ml), in dem die Versuche durchgeführt werden, über die molare Masse ausgerechnet.

Die bestimmte Substanzmenge wird in einer Glasphiole eingewogen und in 100 µl Wasser gelöst. Durch kumulative Zugabe der Stammlösung am Ende des Versuches wurde eine maximale Wirkstoffkonzentration von 100 µmol/l im Organbad erreicht.

Es wurden folgende Einwaagen verwendet:

Tabelle 1: Verwendete Einwaage

Substanz	Molekulargewicht	Volumen Organbad	Einwaage Substanz in 100 µl
MAH 3	311,9 g/mol	8 ml	0,13 mg
		25 ml	0,78 mg

Nach der Erreichung der konstanten Kontrollphase (Anpassungsphase) wurden die Stammlösungen von 1 µl, 2 µl, 7 µl, 20 µl und 70 µl mittels eine Eppendorf- bzw. Finnpiquette vorsichtig, ohne das Präparat oder den Kraftwandler zu berühren, eingespritzt. Damit wurden die folgenden Badkonzentrationen erreicht: 1µmol/l, 3 µmol/l, 10 µmol/l, 30 µmol/l und 100 µmol/l.

Die Substanzgabe erfolgte alle 45 Minuten. In dieser Zeitspanne sollte bei jeder Konzentration ein Plateau, sogenannter Steady State, im Organbad erreicht werden.

Tabelle 2: Pipettierschema

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

Am Millimeterpapier des Schreibers wurden die genauen Zeitpunkte der Stammlösungszugabe markiert, um späteren Ausrechnungen möglichst exakt durchführen zu können.

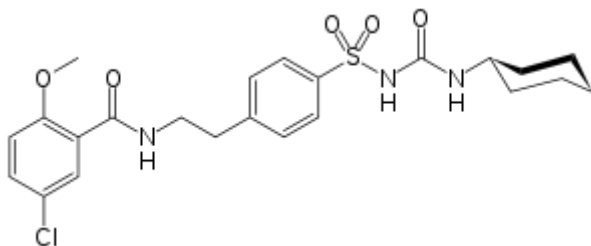
2.3. Glibenclamid

Mit Glibenclamid wurde dann in zweiten Teil der Diplomarbeit der Wirkmechanismus der Testsubstanz geprüft.

Glibenclamid ist eine chemische Verbindung aus der Gruppe der Sulfonylharnstoffe, das pharmakologisch als orales Antidiabetikum in der Therapie von Diabetes Mellitus Typ II eingesetzt wird.

Der Wirkmechanismus von Sulfonylharnstoffderivaten beruht auf der Bindung an spezifische SUR-1 Bindungsstellen in den B-Zellen der Pankreasinseln. Dadurch kommt es zur Blockade der ATP-abhängigen K^+ -Kanäle, was zu einer Steigerung der K^+ -Konzentration im Zellinneren und einem positiven Membranpotential führt. Es kommt zu einer Depolarisation der Zellmembran, die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ öffnen sich und Calcium strömt in die B-Zellen ein. Die erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen bewirkt eine vermehrte Exozytose von Insulin (Forth et al. 2009).

Abbildung 3: Glibenclamid - Strukturformel



MG: 494,00 g/mol

Die Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen führt zur Konstriktion der glatten Muskelzellen.

Da Glibenclamid ein Sulfonamid ist, kann es viele unerwünschte Nebenwirkungen auslösen, wie schwere und lang anhaltende Hypoglykämie ("hypoglykämischer Schock"), gastrointestinale Beschwerden, allergische Reaktionen und zu einem Wachstum der Schilddrüse. In seltenem Fällen kommt es zu Leukopenie oder Thrombozytopenie (Mutschler et al. 2001). Die Sulfonylharnstoffe und deren Derivate fördern die Gewichtszunahme.

2.4. Verwendete Lösungen

2.4.1. Physiologische Elektrolytlösungen und Begasung

Um das Leben der isolierten Organen künstlich zu erhalten, wurde jeden Tag vor dem Versuchsbeginn physiologische Elektrolytlösung oder Tyrode frisch vorbereitet. Die verwendete Tyrode-Lösung ist nach dem amerikanischen Pharmakologen benannt und wurde nach dem Vorschriften von Reiter (1967) hergestellt.

Um einen konstanten, physiologischen pH-Wert (pH 7,2-7,4) und eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Organe zu gewährleisten, wurde die Lösung mit Oxymix bzw. Carbogen (Gemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂) begast.

Tabelle 2: Zusammensetzung der physiologischen Elektrolytlösung

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

Die vorgegebene Menge der einzelnen Komponenten (siehe Tabelle 2), außer CaCl₂ wurden mit Hilfe einer Bürette in einem 2L Messkolben eingebracht und mit Aqua bidestillata bis auf 2/3 aufgefüllt. Nach dem mehrmaligen Schütteln und wenn die Glucose vollständig gelöst war, wurde die Zusammensetzung homogen. Jetzt begaste man die Lösung mit Oxymix ca. 20 Minuten lang.

Nach einer 10-minütigen Perfusion wurde die begaste Lösung mit CaCl_2 tropfenweise und langsam mit Hilfe einer automatischen Messpipette versetzt um das Ausfallen von schwerlöslichen Calcium-Salzen, sowie eine Trübung der Lösung zu verhindern.

Nach der Zugabe von CaCl_2 wurde die Lösung weitere 10 Minuten begast und zum Schluss mit Aqua bidestillata bis zu Eichmarke aufgefüllt und durchgemischt.

Die frisch vorbereitete Elektrolytlösung wurde verwendet:

- für die Aufbewahrung der Organpräparate
- zur Versuchsdurchführung am Vorhof und am Papillarmuskel
- zur Herstellung der Kaliumchlorid-Lösung, die zur Vorkontraktion der isolierten Organpräparate (Aorta, Arteria pulmonalis, Ileum terminalis) dient
- zur Befüllung der Organbäder
- zur kurzzeitigen Aufbewahrung der Präparate
- als Nährstofflösung während der Präparation
- zum Spülen der Organbäder vor/nach dem Versuch.

2.4.2. Kaliumchloridlösung

Die Kaliumchloridlösung gewährleistet einen konstanten Tonus der glatten Muskulatur und eine maximale Kontraktion der Präparate und wurde für die Untersuchungen der vasodilatierenden bzw. spasmolytischen Wirkung der Testsubstanz MAH 3 HCl verwendet.

Tabelle 3: Kaliumchloridlösung

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

Der rechte Vorhof und die quergestreifte Muskulatur des Papillarmuskels wurden nicht durch Kaliumchlorid vorkontrahiert, weil der rechte Vorhof ein spontanes Erregungsbildungssystem am Sinusknoten (SA-Knoten) besitzt, während die quergestreifte Muskulatur des Papillarmuskels kein spontanes Erregungsbildungspotentials aufweist und in der physiologischen Nährlösung elektrisch gereizt wurde.

Es wurden zwei KCl-Lösungen, eine 60 mmolare für die Vorkontraktion des terminalen Ileums und 90 mmolare für die Aorta und Lungenarterie verwendet. Die entsprechende Menge an KCl wurde in Tyrode in einem 100 ml Messkolben aufgelöst

2.5. Versuchstiere

Die Durchführung der Versuche wurden an fünf verschiedenen isolierten Meerschweinchenorganen gemacht (Arteria pulmonalis, Aorta, Ileum terminalis, Atrium cordis dexter und Musculus papillaris).

Als Versuchstiere wurden die Meerschweinchen des 'TRIK'-Stammes verwendet, die zwischen vier und sechs Wochen alt waren und mit einem durchschnittlichem Körpergewicht von 250-600 g.

Abbildung 4: Meerschweinchen



Am Versuchstag wurde ein nüchternes Meerschweinchen verwendet um einen möglichst konstanten Ruhetonus der glatten Muskulatur des Dünndarms zu erhalten und um eine zu große Darmmotilität während der Versuchsdurchführung zu verhindern.

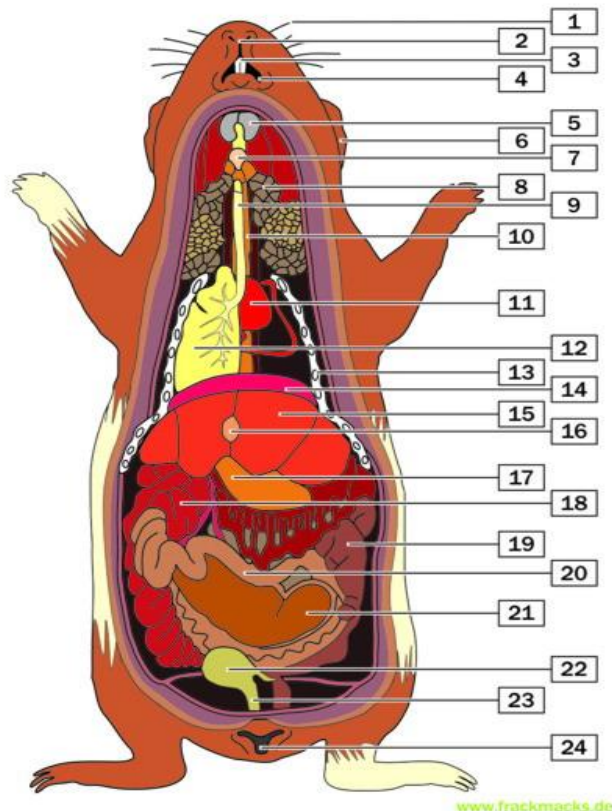
Das verwendete Versuchstier wurde durch einen gezielten und schnellen Genickschlag von einem qualifizierten und geübten Fachpersonals getötet um einen schmerzlosen Tod zu ermöglichen. Dann erfolgte die vorsichtige Öffnung des Thorax und Abdomen, und die Organe (Herz, Darm und Aorta) wurden entnommen.

2.6. Entnahme und Präparation der Organe

2.6.1. Organentnahme

Abbildung 5: Anatomie eines Meerschweinchens

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



Unmittelbar nachdem das Tier getötet wurde, wurden Bauch- und Brustraum mit einer Schere vorsichtig, ohne Verletzung der Organe geöffnet, um eine optimale Organentnahme zu gewährleisten.

Zuerst wurde das Herz inklusiv Lunge herausgeschnitten und je schneller, möglichst in eine frisch bereitete und begaste physiologische Lösung gegeben, um eine Hypoxie bzw. Blutkoagulation in Herzgefäße zu verhindern.

Dann wurde das Ileum terminalis entnommen. Der jejunale Teil wurde mit einem Zwirnsfaden markiert, um die beiden Darmenden nicht zu verwechseln. Der Darm wurde möglichst rasch in die physiologische Lösung unter ständiger Begasung überführt.

Am Ende wurde die Aorta herausgeschnitten. Zuerst wurde der obere Teil der Aorta abgeschnitten, und vorsichtig mit einer Schere entlang des Rückrats herauspräpariert, ohne das Gewebe zu verletzen. Die 3-5 cm lange Aorta wurde in einem mit physiologischer Nährlösung gefüllten Becherglas aufbewahrt.

Für die präzise Präparation der isolierten Organe wurden Stereomikroskop, Schere, Federschere, Pinzetten, Präpariernadeln, Silberhäkchen, Petrischale, Pasteurpipetten und Korkboden, der mit einem Gummischlauch in der Petrischale fixiert wurde, verwendet.

Abbildung 5: Stereomikroskop und weitere Materialien



2.6.2. Rechter Vorhof (Atrium dexter)

Das herausgeschnittene Herz musste als erstes unter einem Mikroskop von Resten der Lunge und anhaftenden Fett- und Bindegewebe befreit werden.

Dann wurde der rechte Vorhof isoliert. Die Isolierung muss sehr vorsichtig sein, dass die Funktion des Sinusknotens nicht geschädigt wird, was zu verfälschten Ergebnisse führen kann. Dann wurde er mit Hilfe von zwei Präpariernadeln an der unteren Spitze und oberen Basis am Korkboden, der mit Nährlösung befüllte Glaspetrischale, befestigt. Der Vorhof musste mit zwei kleinen Silberdrahthaken an den beiden Enden mit Hilfe des Bindefadens gebunden werden, um fertige Präparat anschließend an die Versuchsausrüstung einspannen zu können. Bis zum Einspannen und Versuchsbeginn wurde der fertig präparierte Vorhof in begaste Tyrode aufbewahrt.

Abbildung 6: Atrium dexter eingespannt in der Apparatur



2.6.3. Papillarmuskel (Musculus papillaris)

Um die Papillarmuskel heraus zuschneiden, wurden die rechte und linke Kammer über die Arteria pulmonalis, entlang des Septums bis zur Herzspitze geöffnet.

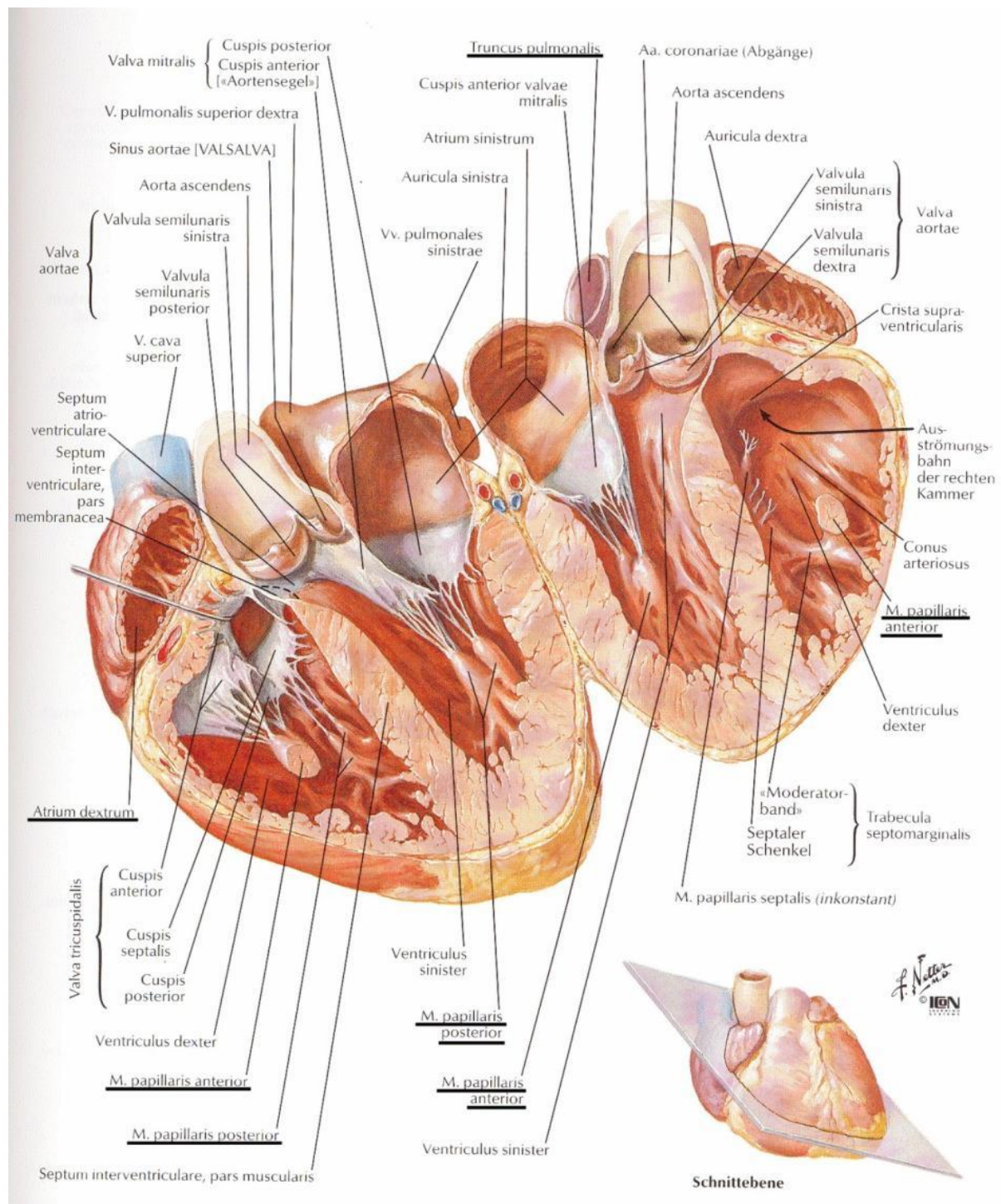
In der rechten Kammer sind drei und in den linken zwei Papillarmuskeln zu finden.

Die Papillarmuskeln mussten von Purkinjefasern befreit werden, da diese Fasern durch ihre spontane Erregungsbildung den späteren Versuchsablauf beeinträchtigen können. Muskeln wurden mit einem Bindfaden, am dem ein Silberhäkchen platziert ist, angebunden und in der begasten Nährstofflösung bis zum Versuchsbeginn aufbewahrt.

Abbildung 7: Präparat des Musculus papillaris



Abbildung 8: Schematische Darstellung des Herzens - Querschnitt (Netter FH 2003)



2.6.4. Lungenarterie (Arteria pulmonalis)

Das Herz des Meerschweinchen besteht sich aus zwei Lungenarterien (linke und rechte). Für die Versuche wurde das 1 cm lange Stück (Truncus pulmonalis) verwendet, direkt von der rechten Kammer herausgehende und bis zu Aufgabelung in rechte und linke Arterie erreicht. Das isolierte Stück wurde an den Enden mit zwei Präpariernadeln in der Petrischale befestigt und von Fett- und Muskelgewebe gereinigt. Dann wurden 2-3 mm breite ringförmige Stücke geschnitten. Die fertigen Präparate wurden direkt in die Apparatur eingespannt.

Die Aufbewahrung bis zum Versuchsbeginn erfolgte in der begasten Nährstofflösung

2.6.5. Darm (Terminales Ileum)

Für die Versuche wurde der terminale Abschnitt des Dünndarmes verwendet.

Ein ca. 20 cm langes Stück wurde in einer Petrischale in ca. 0,5 cm lange Stücke geschnitten. Beide Enden wurden mit zwei Präpariernadeln auf der Korkunterlage befestigt, um das Einrollen zu verhindern.

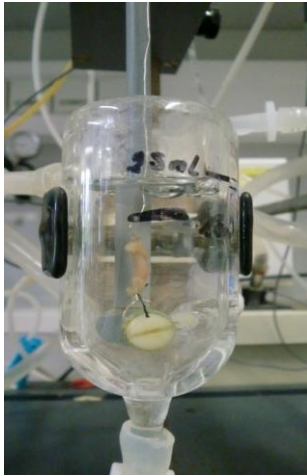
Nach Durchspülen mit Tyrode um Chymusreste zu entfernen, wurde an beiden Darmenden ein Silberhäkchen mittels Bindefaden befestigt, um das Einspannen in die Apparatur zu ermöglichen.

Es ist sehr wichtig, dass die Darmöffnungen am Enden nicht verschlossen sind, dass die Testsubstanz durch den Darmlumen wandern konnte.

Für die Versuchsergebnisse war es auch wichtig, vorsichtig zu arbeiten, weil die glatte Muskulatur empfindlich ist, und darf nicht durch übermäßiges Dehnen geschädigt sein.

Die angefertigten Präparate wurden bis zu Versuchsbeginn in der begasten Nährlösung aufbewahrt.

Abbildung 9: Darmpräparat im Organbad

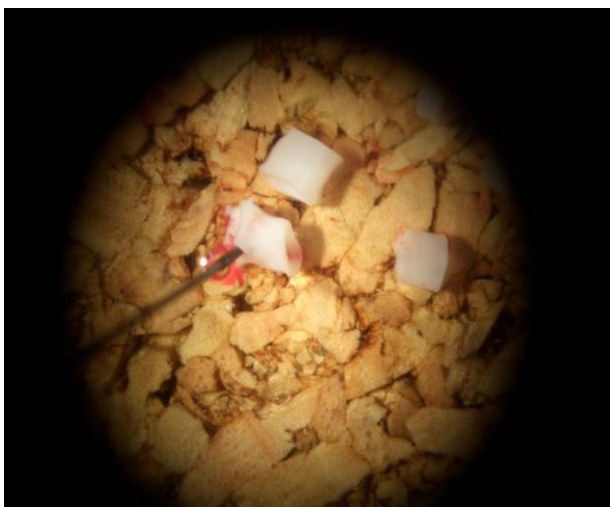


2.6.6. Aorta (Aorta descendens)

Die isolierte Aorta wurde in einer mit Tyrode befüllten Petrischale fixiert und präpariert. Anschließend wurde wie bei den Lungenarterien das Fett- und Muskelgewebe entfernt, als auch das koagulierte Blut. Man muss hier auch vorsichtig arbeiten, weil bei Überdehnung zur Verletzung des Organs kommen kann, was zu falschen Ergebnisse führen kann.

Die ca. 3 cm lange, gereinigte Aorta wurde dann in 2-3 mm lange Ringe zerschnitten in die Versuchsapparatur eingebracht werden konnten.

Abbildung 10: Ringförmig geschnittene Aortapräparate



2.7. Versuchsanordnung und Apparaturen

Um die Versuche an isolierten Meerschweinchenorganen durchzuführen, standen zwei verschiedenen Apparaturen zur Verfügung.

Die beiden Apparaturen hatten das gleiche Funktionsprinzip und unterscheiden sich nur in Aufbau und Befestigungsmechanismus.

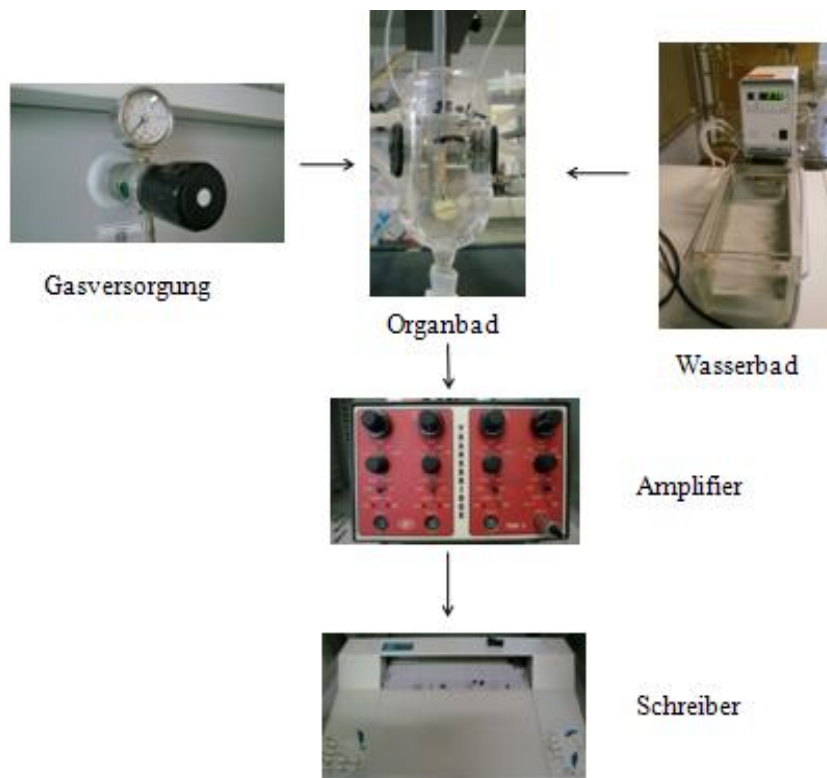
Die Papillarmuskeln wurden in die Apparatur I eingespannt und getestet, und Apparatur II wurde für das Testen von Substanz an den restlichen vier Organen (Vorhof, Arteria pulmonalis, Aorta und terminales Ileum) verwendet.

Die fertigen Präparate wurden mit oder ohne Silberdrahthäkchen an einem Silberdraht fixiert und so an die Apparatur angespannt. Dadurch wurden die isolierten Organe mit dem Kraftwandler, der über Verstärker an dem Schreiber gebunden ist, in Kontakt getreten.

Bei der Versuchsdurchführung wandelt der Kraftwandler die mechanische Kraft in ein elektrisches Signal um.

Das elektrische Signal wurde mit Hilfe eines Amplifiers verstärkt, und mittels Schreiber wurden die Signale auf einem Millimeterpapier aufgezeichnet.

Abbildung 11: Versuchsanordnung



Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei den Versuchen zu ermöglichen, musste man die optimalen und physiologischen Versuchsbedingungen einhalten (pH, Temperatur, Sauerstoffversorgung).

2.7.1. Apparatur I

Wie schon erwähnt wurde die Apparatur I nur für die Papillarmuskelpräparate verwendet.

Das Gerät bestand aus einem Organbad (7), mit Volumen von 27 ml, welches in ein mit Aqua bidestillata aufgefülltes Wasserbad (1) eintaucht.

Die Temperatur des Wasserbades musste konstant sein und $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ aufweisen, um möglichst optimale physiologische Bedingungen sicherzustellen. Dazu diente das Thermostat mit einer Heizspirale.

Die Organkammer wurde mit 25 ml physiologischen Nährlösung mindestens 10 Minuten vor dem Versuchsbeginn befüllt, um die gewünschte Temperatur zu erreichen. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, wurde die Nährlösung über eine Glasfritte (8), im unteren Teil des Organbades, mit Gas (Oxymix) begast.

Der präparierte Papillarmuskel wurde auf einem Silberdraht an der Organhalterung (2), welches sich auf einem Stativ (3) befand, angehängt. Das frei hängende Präparat wurde zwischen einer kleinen Plexiglasscheibe und einer Platin-Kathode platziert, und so rasch wie möglich in das Organbad mit Hilfe des Stativs eingetaucht.

Im Gegensatz zum Vorhof ist der Papillarmuskel nicht fähig spontan zu kontrahieren, und musste elektrisch gereizt werden.

Diese elektrischen Impulse wurden von einem Anapulse Stimulator (Model Isostim 301 T, World Precision Instruments, Hamden, CT, USA) erzeugt, und durch einen Amplifier 100-fach verstärkt und an einen Schreiber übertragen.

Um die alle Versuche unter gleichen Bedingungen durchzuführen, wurde die entsprechende Vorspannung über den Feintrieb eingestellt.

Abbildung 12: Schematische Darstellung der Apparatur I

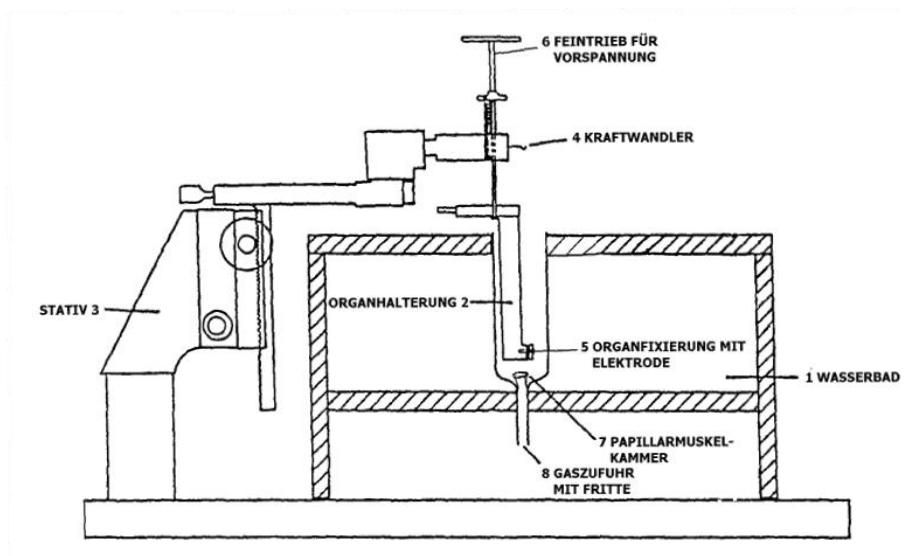
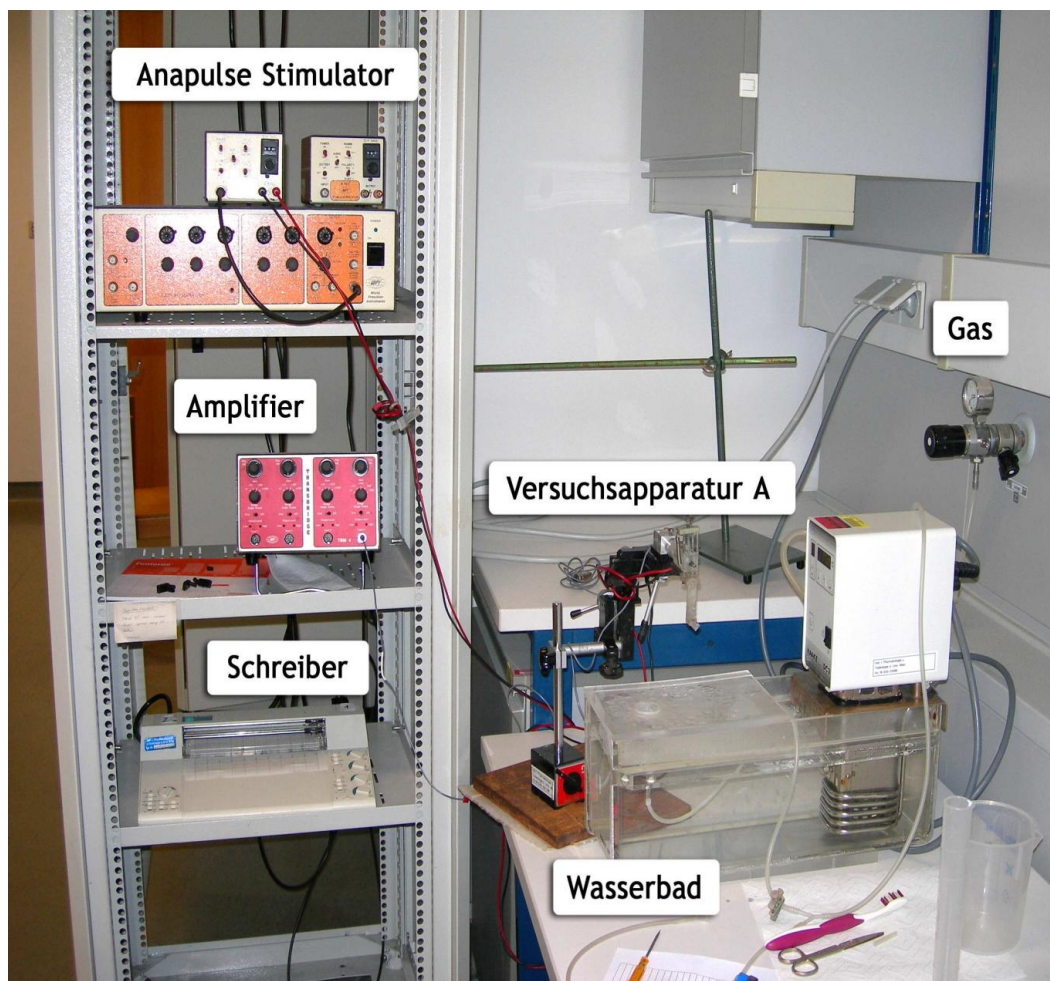


Abbildung 13: Originalabbildung der Apparatur I



2.7.2. Apparatur II

Diese Apparatur wurde für die Aorta, Lungenarterie, Darm und Vorhof verwendet.

Das Präparat wurde an zwei Silberdrahten fixiert, und anschließend in das mit $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ vorgewärmte, doppelwandige Organbad aus Glas eingetaucht.

Das Wasser in das Wasserbad wurde mittels eines Thermostats erwärmt, und strömt durch das doppelwandige Glas der Organkammer und gewährleistet vorgeschriebene Temperatur während Untersuchung. Seitlich befand sich der Schlauch für die Gaszufuhr und die entströmende Gasmenge konnte man mittels kleiner Schrauben regulieren.

Das Organbad wurde je nach Größen mit 25 ml bzw. 8 ml mindestens 10 Minuten vor dem Versuchsbeginn gefüllt. Die einzelnen Präparate wurden an den Kraftwandler befestigt und dann mit dem Stativschlitten in das mit Nährstofflösung gefüllte und in genau temperiertes Organbad eingetaucht. Um Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten wurde die entsprechende Vorspannung über der Feintrieb eingestellt.

Abbildung 14: Schematische Darstellung der Apparatur II

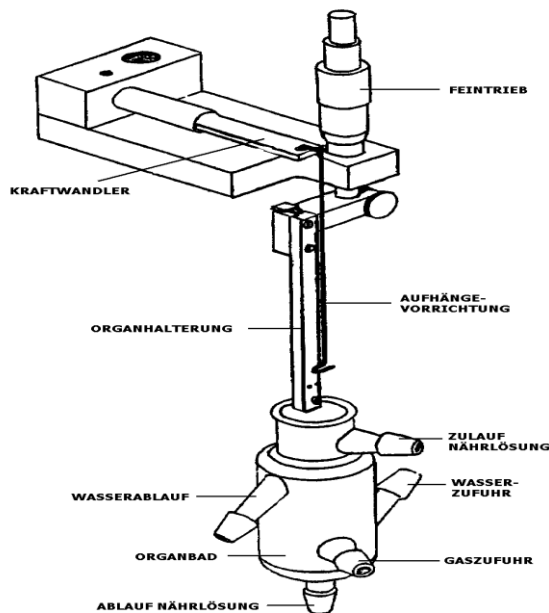
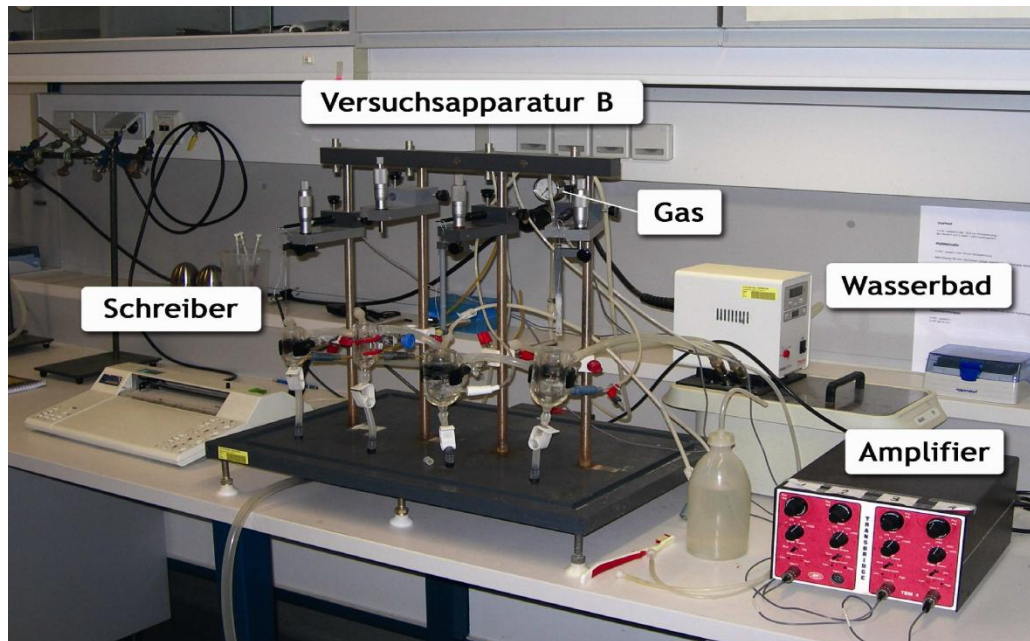


Abbildung 15: Originalabbildung der Apparatur 2

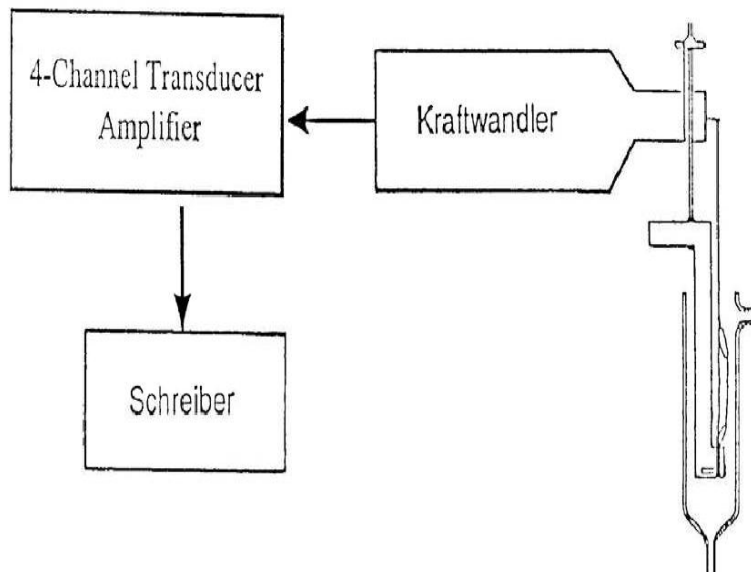


2.7.3. Kraftwandler, Verstärker, Schreiber

Das Prinzip beruht auf der Umwandlung der mechanischen Kraft (entweder eine Kontraktion oder eine Spasmolyse) in ein elektrisches Signal über einen Kraftwandler oder „Transducer“ (TransbridgeTM, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). Dafür verwendet man einen Widerstandswandler mit Dehnungstreifen in Wheatstone'scher Brückenschaltung (Firma Aksjeselskapet, Horten, Norwegen)

Durch die Änderung der Kontraktionskraft bzw. der Dehnung kommt es zur Änderung des elektrischen Dehnungswiderstandes des Messstreifens und dadurch zur proportionalen Änderung des Stromflusses. Durch die Kontraktion und Relaxation der isolierten Organe entstandenen Signale werden dann zu einem Verstärker (TransbridgeTM, 4-Channel Transducer Amplifier, World Precision Instruments (WPI), Sarasota, FL, USA) weitergeleitet und verstärkt. Abschließend wurden die Impulse mittels Schreibgerät. (Flatbed Recorder BD 112, Fa Kipp & Zonen, Niederlande) auf ein Millimeterpapier aufgezeichnet.

Abbildung 16: Schematische Darstellung des Kraftwandlers, Verstärker und Schreiber



2.7.4. Die Gasversorgung

Um die Durchführung der Versuche zu ermöglichen, musste eine ausreichende Gasversorgung der isolierten Organe während der ganzen Versuchsdauer gewährleistet werden. Die Begasung ist unentbehrlich, um einen konstanten pH-Wert und ausreichende Sauerstoffversorgung zu erhalten und auf diese Weise die Hypoxie und Absterben von Organen zu vermeiden. Für die Versuche verwendete man Oxymix, ein Gasgemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂.

Oxymix ist in einer zentralen Gasflasche gelagert und erreicht über ein Schlauchsystem die Versuchsaapparaturen. Um die Intensität der Gaszufuhr zu regulieren und dem Bedarf anzupassen, sind die Schläuche mit Schraubklammern ausgestattet.

2.7.5. Das Wasserbad

Neben des physiologischen pH-Wertes und der ausreichenden Sauerstoffversorgung, musste die Nährstofflösung auf eine bestimmte Temperatur erwärmt werden, um die optimalen Bedingungen während Versuchsverlaufs zu gewährleisten. Um diese Voraussetzung zu erfüllen, wurde ein Wasserbad mit Thermostat verwendet. Die vorgeschriebene Temperatur für Papillarmuskelpräparate beträgt $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ und für alle anderen (Aorta, Lungenarterie, rechte Vorhof und Darm) $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.8. Versuchsabläufe

Um die auswertbare und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, musste neben der Gewährleistung der physiologischen Bedingungen auch die Sauberkeit der Apparaturen erhalten werden. Durch Verunreinigungen kann es zu falschen Ergebnissen kommen und deswegen ist eine gründliche Reinigung von Apparaturen erforderlich.

Die Organbäder und dazugehörige Halterungen wurden zu Beginn und am Ende jedes Arbeitstages mit einer 0.1 N Salzsäure und dann mit Aqua bidestillata 2-3 Mal durchgespült.

2.8.1. Rechter Vorhof (Atrium dexter)

Das vorbereitete Präparat wurde in die Versuchsapparatur eingespannt und in die bereits temperierte Nährstofflösung eingetaucht.

Zuerst musste der Schreiber mit einer Spannung von 5 mV und einer Geschwindigkeit von 5 mm/sec eingeschaltet werden. Dann wurde der Verstärker eingeschaltet und Schreiber mit dem Feintrieb des Verstärkers auf den Nullpunkt gestellt. Nachdem wurde die Vorspannung von 10,4 mN mit dem Feintrieb erzeugt und mit dem Zero-Drehrad wieder auf den Nullpunkt zurückgestellt.

Die Vorhofpräparate brauchten ca. 30-45 Minuten um sich an die neuen Bedingungen anzupassen und erst nach der Anpassungsphase darf man eine Kontrollphase beginnen.

In der Kontrollphase wurden die Messungen alle 5 Minuten wiederholt, wobei die Frequenz von 12 Sekunden, entspricht 6 Kästchen auf dem Millimeterpapier, registriert wurde. Diese Phase war beendet, wenn die Schläge von letzten 2-3 Messungen konstant blieben.

Erst dann wurde die erste Konzentration der Testsubstanz eingespritzt. Die Messungen erfolgten, wie in der Kontrollphase, alle 5 Minuten und nach 45 Minuten wurde die nächste Konzentration eingespritzt. Die Zugabe der Testsubstanz wurde nach dem Pipettierschema mit einem 45-minütigen Abstand erfolgt.

2.8.2. Lungenarterie (Arteria pulmonalis)

Das Präparat wurde direkt zwischen zwei Silberdrähte in die Apparatur II eingespannt und in mit der Tyrodelösung gefülltes Organbad eingetaucht.

Der Schreiber und der Verstärker wurden eingeschaltet und die Vorspannung von 9,81 mN wurde mit dem Feintrieb angelegt. Der Schreiber musste auf den Nullpunkt zurückgestellt

und es erfolgte eine 20 Minute lange Anpassungsphase. Danach wurde die Tyrode durch Öffnen der Schlauchklemmen ausgelassen und das Organbad mit einer 90 mmol/l KCl-Lösung aufgefüllt. Durch die Kaliumchlorid-Lösung kam es zu schneller Veränderung der Kontraktionskraft und ein rasches Ausschlagen des Schreibers nach links. Nach 45-60 Minuten erreicht die Kontraktion eine konstante Plateauphase (Steady-State-Phase) und dann durfte die Testsubstanz in einem 45-minütigen Intervall eingespritzt werden.

2.8.3. Aorta (Aorta descendes)

Die Versuche an der vorbereiteten Präparaten der Aorta wurden analog zur der Lungenarterie abgelaufen. Der einzige Unterschied liegt in Vorspannung, die bei der Aorta 19,6 mN beträgt.

2.8.4. Papillarmuskel (Musculus papillaris)

Das Papillarmuskelpräparat wurde in die Apparatur I eingespannt und in die mit Tyrode gefüllte Organkammer eingetaucht.

Der Schreiber, mit einer Spannung von 5 mV (2 oder 1 mV bei Bedarf) und einer Geschwindigkeit von 5 mm/sec, und einer Verstärker wurden eingeschaltet.

Die Vorspannung von 3,92 mN wurde mittels Feintrieb erzeugt, um die maximale Muskelkontraktion zu erzielen. Da der Papillarmuskel keine Spontanaktivität aufwies, musste er elektrisch gereizt werden, um eine Kontraktion auszulösen. Dazu dient ein Reizgerät Anapulse Stimulator (Model Isostim 301T, World Precision Instruments, Hamden, CT, USA). Die Reizstärke wurde bis zum Kontraktionsbeginn langsam erhöht. Aber man muss beachten, dass die Stromstärke nicht zu hoch ist (maximal 10% über der minimalen Reizwelle), weil es zu einer unkontrollierten Entleerung der Katecholaminspeicher und dadurch zur Verfälschung von Ergebnissen kommen kann. (Furchgott R.F. et al. 1959)

Wenn diese Anpassungsphase, die ca. 30 Minuten dauert, beendet war, konnte die Kontrollphase anfangen.

Die Kontrollmessungen wurden so durchgeführt, dass der Schreiber sechs Kontraktionsamplituden auf dem Millimeterpapier alle 5 Minuten aufzeichnete. Wenn die Peakamplitude eine konstante Größe erreichte, folgte die Testsubstanzzugabe nach dem Pipettierschema in einem 45-minütigen Abstand.

2.8.5. Darm (Terminales Ileum)

Die Versuche an den Darmpräparaten wurden in der Apparatur II durchgeführt.

Die fertigen Präparate wurden mit der caecalen Seite nach unten und der jejunalen Seite nach oben zwischen zwei Silberdrähten angehängt und in das Organbad eingetaucht.

Der Schreiber und Verstärker wurden eingeschaltet, der Schreiber auf den Nullpunkt zurückgestellt und eine Vorspannung von 4,92 mN mit dem Feintrieb angelegt. Die maximale Darmkontraktion wurde ausgelöst und der Schreiber wurde wieder auf den Nullpunkt zurückgestellt (mit dem Zero-Drehrad). Die Anpassungsphase dauert bei dem Darm ca. 20 Minuten. Wenn diese Zeit vorbei ist, wurde die Tyrode über den Gummischlauch abgelassen und mit eine frisch Zubereitete 60 mmolaren KCl-Lösung aufgefüllt. Die Kaliumchlorid-Lösung bewirkte eine sofortige, schlagartige Darmkontraktion, die dann auch schnell abnahm und dann wieder langsam nach oben ging. Die Phase, bis die 100%ige Kontraktion erreicht wurde, dauerte ca. 60 Minuten. Die Kurve wurde ein Plateau ausgebildet und die Substanz konnte nach dem Pipettierschema an Abstand von 45 Minuten eingespritzt werden, bis die gewünschte Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ erreicht wurde.

2.9. Auswertung der Ergebnisse

2.9.1. Rechter Vorhof

Am rechten Vorhof könnte die, durch die Testsubstanz hervorgerufene, positive oder negative chronotrope Wirkung (Schlagfrequenz) überprüft werden. Um die Abnahme oder Zunahme der Schlagfrequenz ermitteln zu können, wurde die Herzschläge innerhalb von 12 Sekunden bzw. über eine Strecke von 6 Zentimeter am Millimeterpapier mittels Schreiber mit einem Papierschub von 5 mm/sec aufgezeichnet und gezählt.

Die aufgezeichneten Herzschläge wurden mit Faktor 5 multipliziert, wodurch man die Anzahl der Schläge pro Minute erhielt.

Als Referenzwert (entspricht 100%) diente die letzte Kontrollmessung vor der ersten Substanzzugabe. Die Prozentwerte wurden berechnet und die Einflüsse der applizierten Substanz anhand einer Konzentrations-Wirkungskurve darstellt.

2.9.2. Papillarmuskel

Durch die Versuchsreihen an Papillarmuskelpräparaten wurden die Auswirkung der Testsubstanz MAH 3 HCl auf eine mögliche Abnahme oder Zunahme der Inotropie (Kontraktionskraft) untersucht.

Die sechs aufgezeichneten Amplituden (in cm) wurden mit einem Lineal abgelesen, um die Kontraktionskraft in mN messen zu können. Man musste der Mittelwert aus 6 Amplituden mit dem Korrekturfaktor 0,98 bei einer eingestellten elektrischen Spannung von 5 mV bzw. mit Faktor $0,98 \times 0,4$ bei der Spannung von 1 mV bzw. 2 mV multipliziert werden.

Die Abnahme und Zunahme von Inotropie durch Substanzzugabe wurde wieder in Abhängigkeit vom Kontrollwert in % berechnet und eine Konzentrations-Wirkungskurve erstellt.

2.9.3. Glatte Muskulatur (Aorta, Darm, Lungenarterie)

Bei diesen Versuchen wurde eine mögliche vasodilatierende bzw. spasmolytische Wirkung überprüft. Die glatte Muskulatur wurde zuerst chemisch mit Kaliumchlorid-Lösung maximal vokontrahiert.

Wenn die Kontraktionskurve die Plateauphase erreicht hatte, wurde die Analysesubstanz MAH 3 dazugegeben. Vor jeder Substanzzugabe musste der Punkt an der Kurve markiert werden, um die Auswertung der Abstände von der Nulllinie bestimmen zu können. Die gemessenen Werte wurden mit einem Eichungsfaktor 0,98 bei einer eingestellten Spannung von 5 mV multipliziert, um die Kontraktionskraft in mN zu ermitteln. Die Abnahme bzw. Zunahme der Kontraktionskraft wurde im Bezug auf den Kontrollwert berechnet.

2.10. Statistik

Um die ausgewerteten Ergebnisse von Versuchen statistisch zu beurteilen und graphisch zu darstellen, wurde das Programm „Sigma Plot 9,0“ verwendet.

Die Kontraktionskraft (f_c) und die Sinusfrequenz (f) wurden in mN bzw. in Schläge/min und in Prozent (%) angegeben und aus angelegten Messdaten wurde der arithmetische Mittelwert und deren Standardfehler (SEM = standard error of mean) errechnet und in Konzentrations-Wirkungskurven dargestellt.

Bei stark wirksamen Substanzen konnte der EC_{50} -Wert, der die effektive Konzentration in $\mu\text{mol/l}$, bei der die Inotropie bzw. Chronotropie auf die Hälfte des Referenzwertes absinkt, ermittelt werden.

Unter Verwendung des Signifikanztest („Student-t-Test für gepaarte Beobachtungen“) wurden die Messwerte bezüglich ihrer Signifikanz beurteilt. Die Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 5\%$ ($P < 0,05$) bzw. $< 1\%$ ($P < 0,01$) wurden nach diesem Test als signifikant und unter $< 0,1\%$ ($P < 0,001$) als hochsignifikant bewertet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Wirkung von MAH 3 HCl auf den rechten Vorhof

Bei den Versuchen am rechten Vorhof, wurde im Gegensatz zu den anderen isolierten Organen nicht die dilatierende Wirkung, sondern die chronotrope Wirkung der Testsubstanz MAH 3 HCl untersucht.

Man sieht zuerst eine relativ schwache Reduktion der Schlagfrequenz bis zur Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$. Bei einer Konzentration von 48 $\mu\text{mol/l}$ konnte die Schlagfrequenz 50% des Kontrollwerts erreichen.

Nach Zugabe der letzten Konzentration der Testsubstanz (bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$) konnte ein Stillstand festgestellt werden.

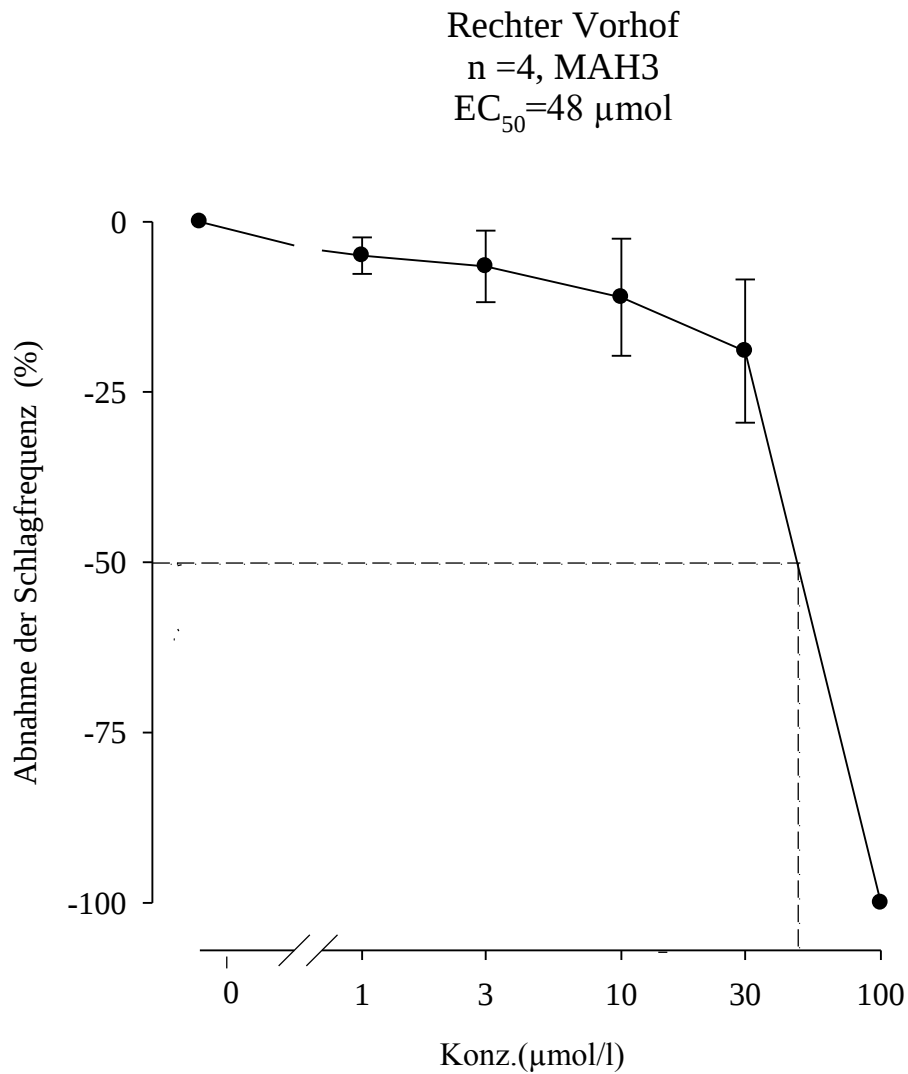
Tabelle 4: Wirkung von MAH 3 HCl auf den rechten Vorhof

MAH 3 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f \pm \text{SEM}$ (mN)	$f \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$192,50 \pm 8,54$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
1	$182,50 \pm 6,61$	$-4,98 \pm 2,69$	4	n.s.
3	$178,25 \pm 5,15$	$-6,25 \pm 5,26$	4	n.s.
10	$171,25 \pm 10,08$	$-11,10 \pm 8,60$	4	n.s.
30	$153,75 \pm 13,75$	$-19,00 \pm 10,50$	4	0,05
100	$0,00 \pm 0,00$	$-100 \pm 0,00$	4	0,001

Legende zu Tabelle 4:

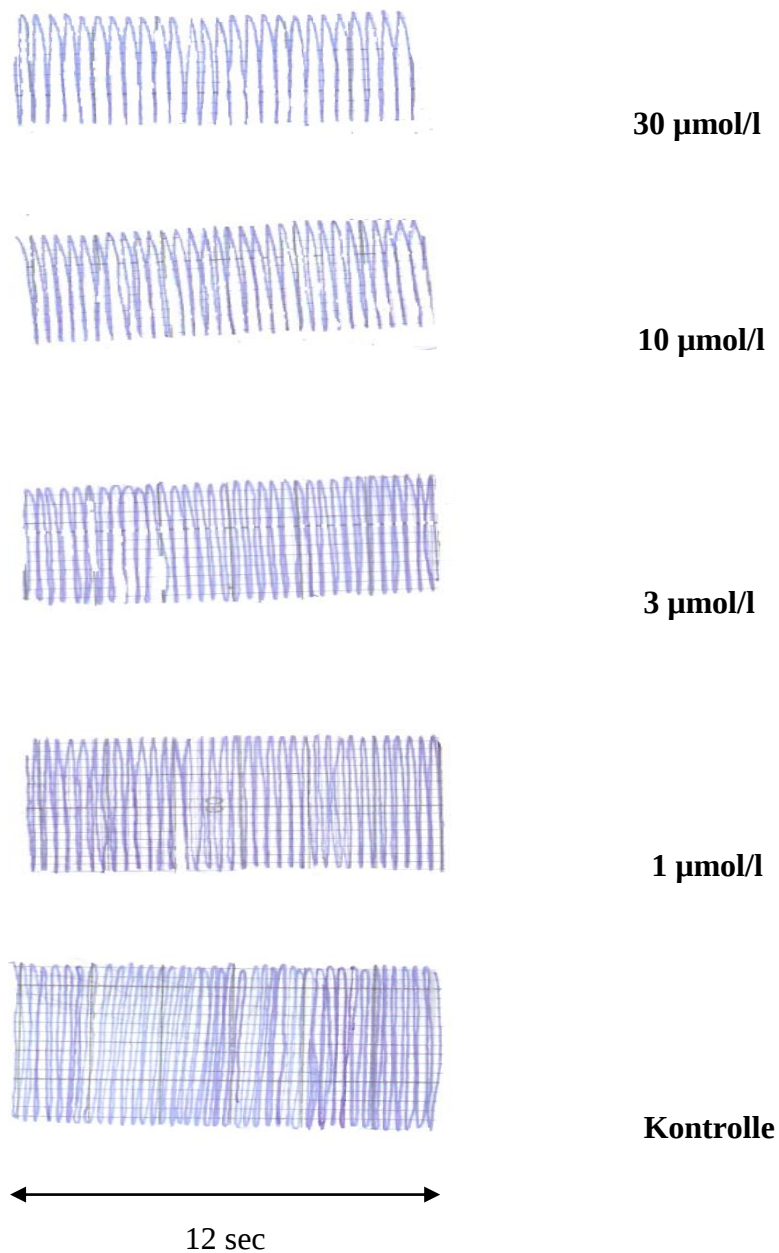
- f_c = arithmetische Mittelwert der Schlagfrequenz pro Minute
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes

Abbildung 17: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH 3 HCl am rechten Vorhof



Auf der x-Achse wurde die verwendete Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ angegeben und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in %. Die senkrechten Balken stellen die Standardfehler dar und die strichlierte Linien stehen für die effektive Konzentration bei der es zu einer 50%igen Abnahme kommt (EC_{50}).

Abbildung 18: Originalaufzeichnung von MAH 3 HCl am rechten Vorhof



Die Abbildung 18 zeigt die Originalregistrierung des Schreibers, woraus eine negativ chronotrope Wirkung von MAH 3 HCl am Atrium cordis dexter sichtbar ist.

3.2. Wirkung von MAH 3 HCl auf die Lungenarterie

An der Lungenarterie wurde die mögliche vasodilatierende Wirkung von Testsubstanz MAH 3 HCl an 4 verschiedene Lungenarterienpräparate überprüft.

Man sieht eine deutliche Reduktion der Kontraktionskraft. Bei einer Konzentration von 13.7 $\mu\text{mol/l}$ wurde ein EC_{50} -Wert erreicht.

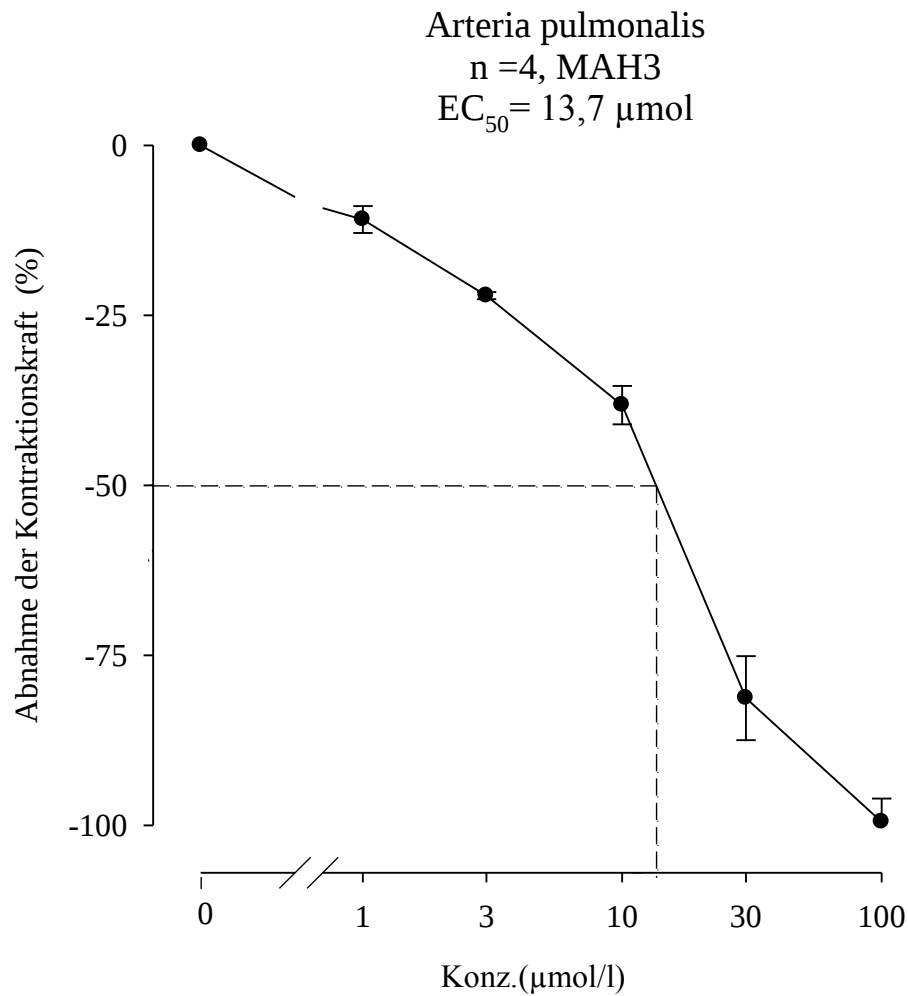
Tabelle 5: Wirkung von MAH 3 HCl auf die Lungenarterie

MAH 3 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchszahl	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$9,17 \pm 1,87$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
1	$8,10 \pm 1,57$	$-10,90 \pm 1,98$	4	0,05
3	$7,15 \pm 1,46$	$-22,10 \pm 0,51$	4	0,01
10	$5,79 \pm 1,28$	$-38,20 \pm 2,83$	4	0,01
30	$2,01 \pm 0,82$	$-81,30 \pm 6,19$	4	0,001
100	$0,62 \pm 0,53$	$-99,50 \pm 3,43$	4	0,001

Legende zu Tabelle 5:

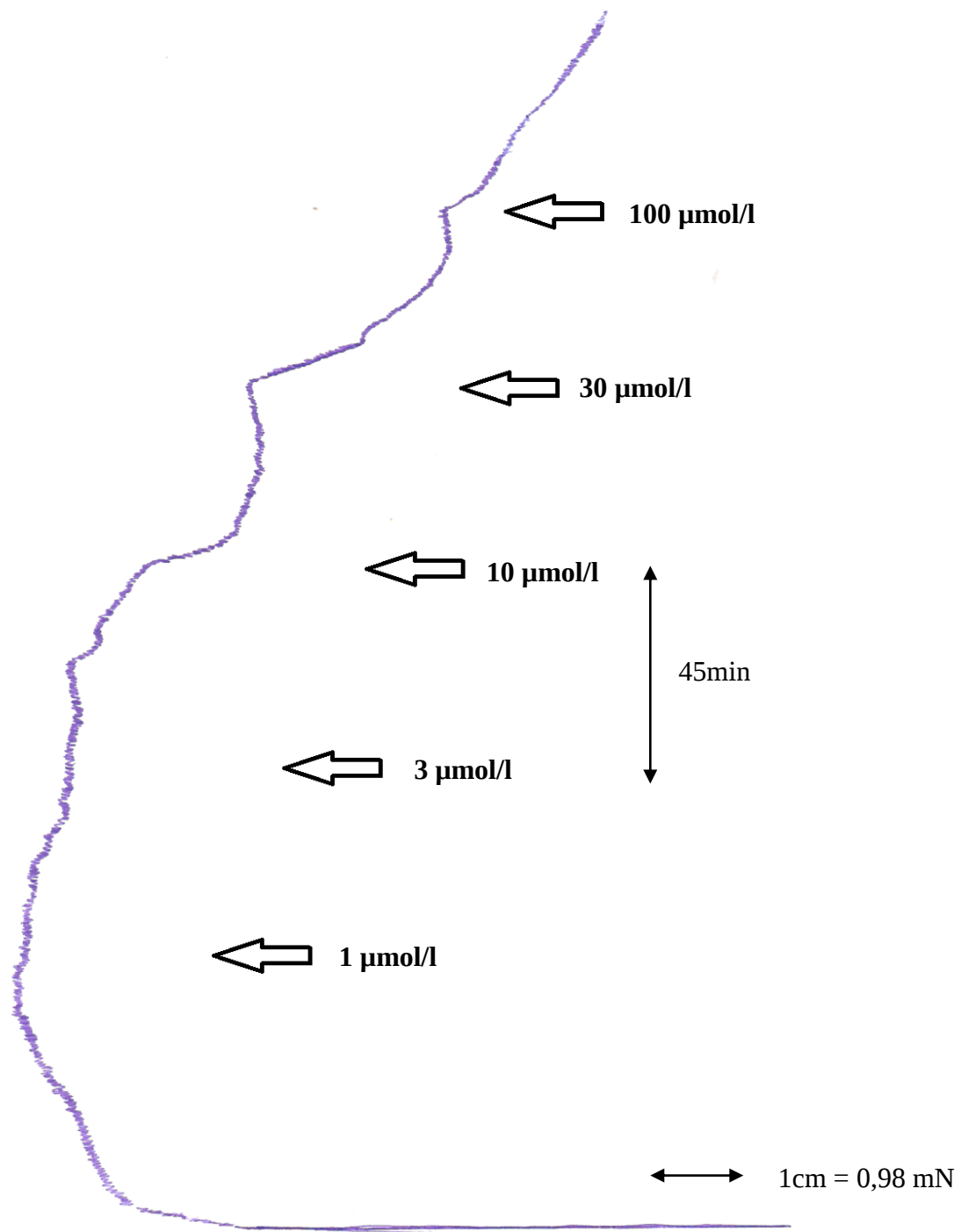
- f_c = arithmetische Mittelwert der Kontraktionsänderung
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes

Abbildung 19: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH 3 HCl auf die Lungenarterie



Auf der x-Achse wurde wieder die verwendete Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ angegeben und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in %. Die senkrechten Balken stellen die Standardfehler dar und die strichlierte Linien stehen für die effektive Konzentration bei der es zu einer 50%igen Abnahme kommt (EC_{50}).

Abbildung 20: Originalaufzeichnung von MAH 3 HCl auf die Lungenarterie



Die Abbildung 20 zeigt die Originalregistrierung des Schreibers, woraus eine signifikante relaxierende Wirkung (Abnahme der Kontraktionskraft) von MAH 3 HCl auf die Lungenarterie sichtbar ist.

3.3. Wirkung von MAH 3 HCl auf den Papillarmuskel

Bei den Versuchen auf den Papillarmuskel wurde die Abnahme der Inotropie durch Zugabe der Testsubstanz MAH 3 HCl geprüft.

Man kann eine negativ inotrope Wirkung der Testsubstanz MAH 3 HCl auf den Papillarmuskel beobachten. Bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ wurde ein EC_{50} -Wert erreicht.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst:

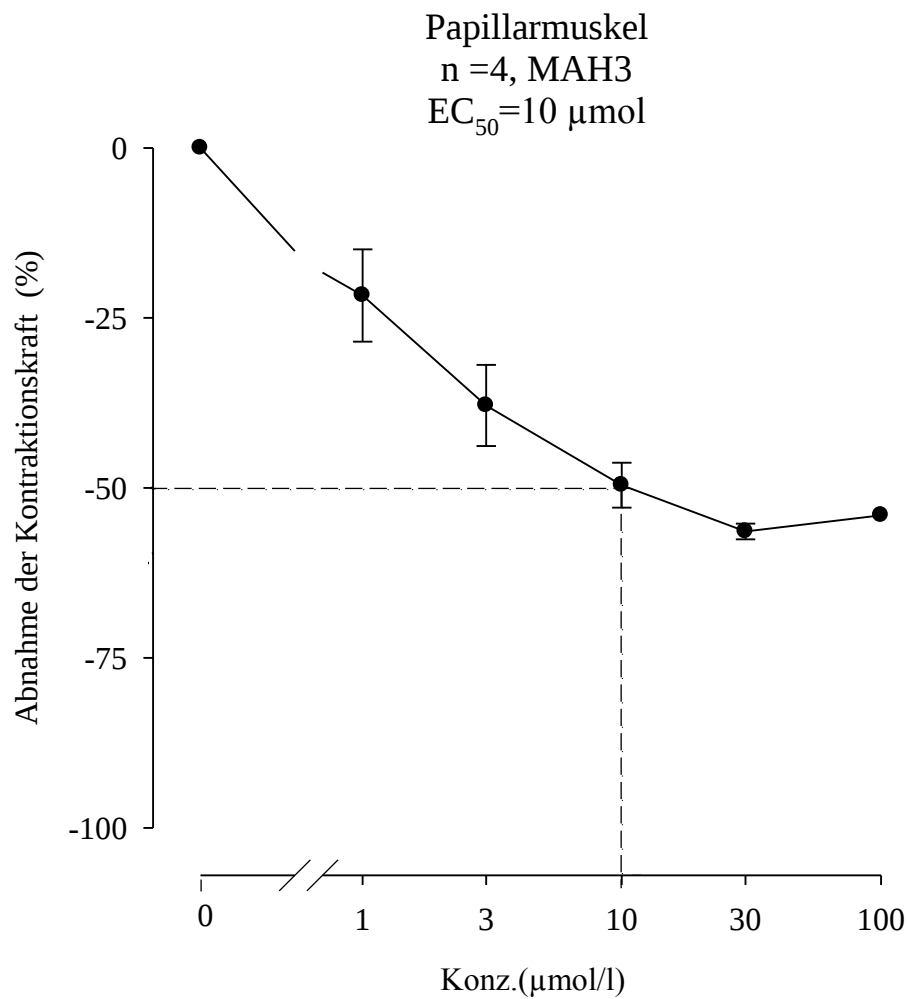
Tabelle 6: Wirkung von MAH 3 HCl auf den Papillarmuskel

MAH 3 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchszahl	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$2,07 \pm 0,16$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
1	$1,66 \pm 0,29$	$-21,70 \pm 6,79$	4	0,05
3	$1,32 \pm 0,22$	$-37,88 \pm 5,98$	4	0,05
10	$1,05 \pm 0,14$	$-49,70 \pm 3,31$	4	0,01
30	$0,91 \pm 0,08$	$-56,41 \pm 1,16$	4	0,01
100	$0,95 \pm 0,08$	$-54,05 \pm 2,50$	4	0,01

Legende zu Tabelle 6:

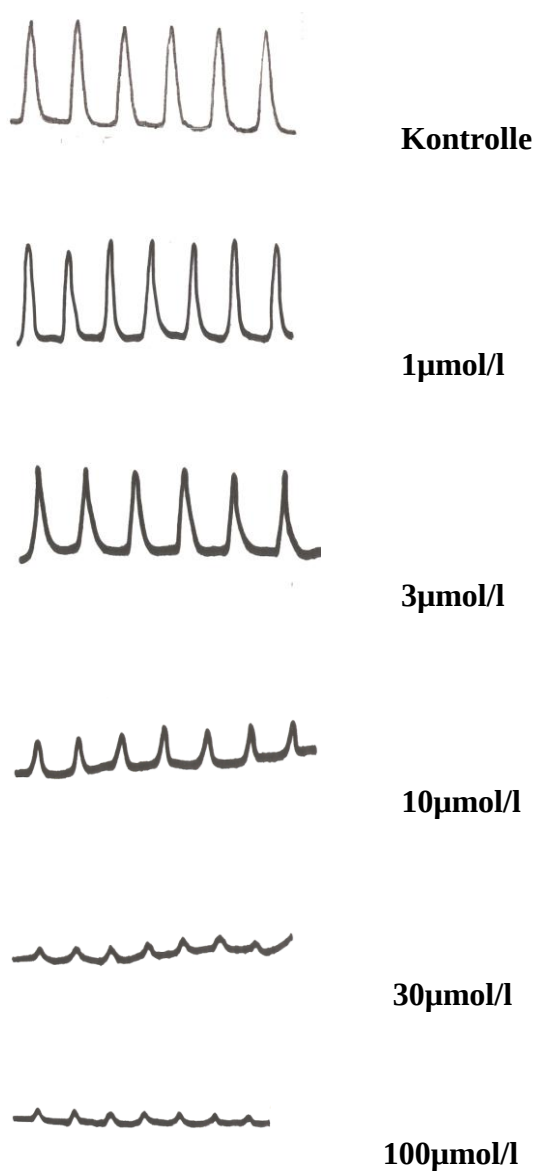
- f_c = arithmetische Mittelwert der Kontraktionsänderung
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes

Abbildung 21: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH 3 HCl auf den Papillarmuskel



Die verwendete Konzentration wurde an der x-Achse in $\mu\text{mol/l}$ und die Abnahme der Kontraktionskraft in % auf der y-Achse eingetragen. Die senkrechten Balken stellen die Standardfehler dar und die strichlierte Linien stehen für die effektive Konzentration bei der es zu einer 50%igen Abnahme kommt (EC_{50}).

Abbildung 22: Originalaufzeichnung von MAH 3 HCl auf den Papillarmuskel



Die Abbildung 22 zeigt die Originalregistrierung des Versuchsablaufs beim Papillarmuskel und damit der negative inotrope Effekte der Testsubstanz MAH 3 HCl.

3.4. Wirkung von MAH 3 HCl auf den Darm

An den vier isolierten Darmpräparaten wurde die potentielle spasmolytische Aktivität von Testsubstanz getestet. Man sieht eine deutliche Reduktion der Kontraktionskraft und starke spasmolytische Wirkung auf die Darmmuskulatur.

Der arithmetische Mittelwert (f_c) und Standardfehler wurden ausgerechnet und in der Tabelle 7 zusammengefasst:

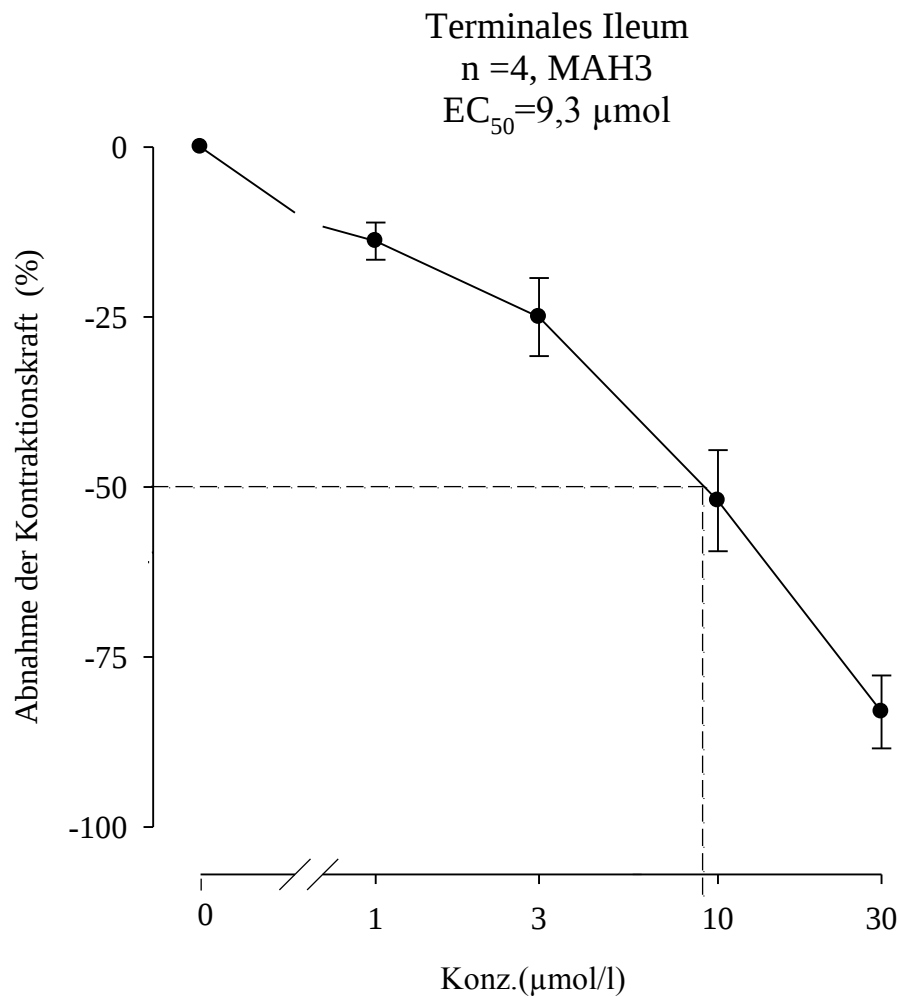
Tabelle 7: Wirkung von MAH 3 HCl auf den Dünndarm

MAH 3 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$10,42 \pm 0,91$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
1	$9,05 \pm 2,30$	$-13,85 \pm 2,73$	4	0,05
3	$7,95 \pm 2,16$	$-25,01 \pm 5,74$	4	0,05
10	$5,20 \pm 1,63$	$-52,02 \pm 7,44$	4	0,01
30	$1,74 \pm 0,59$	$-83,05 \pm 5,36$	4	0,001
100	$2,32 \pm 0,55$	$-77,59 \pm 3,06$	4	0,001

Legende zu Tabelle 7:

- f_c = arithmetische Mittelwert der Kontraktionsänderung
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes

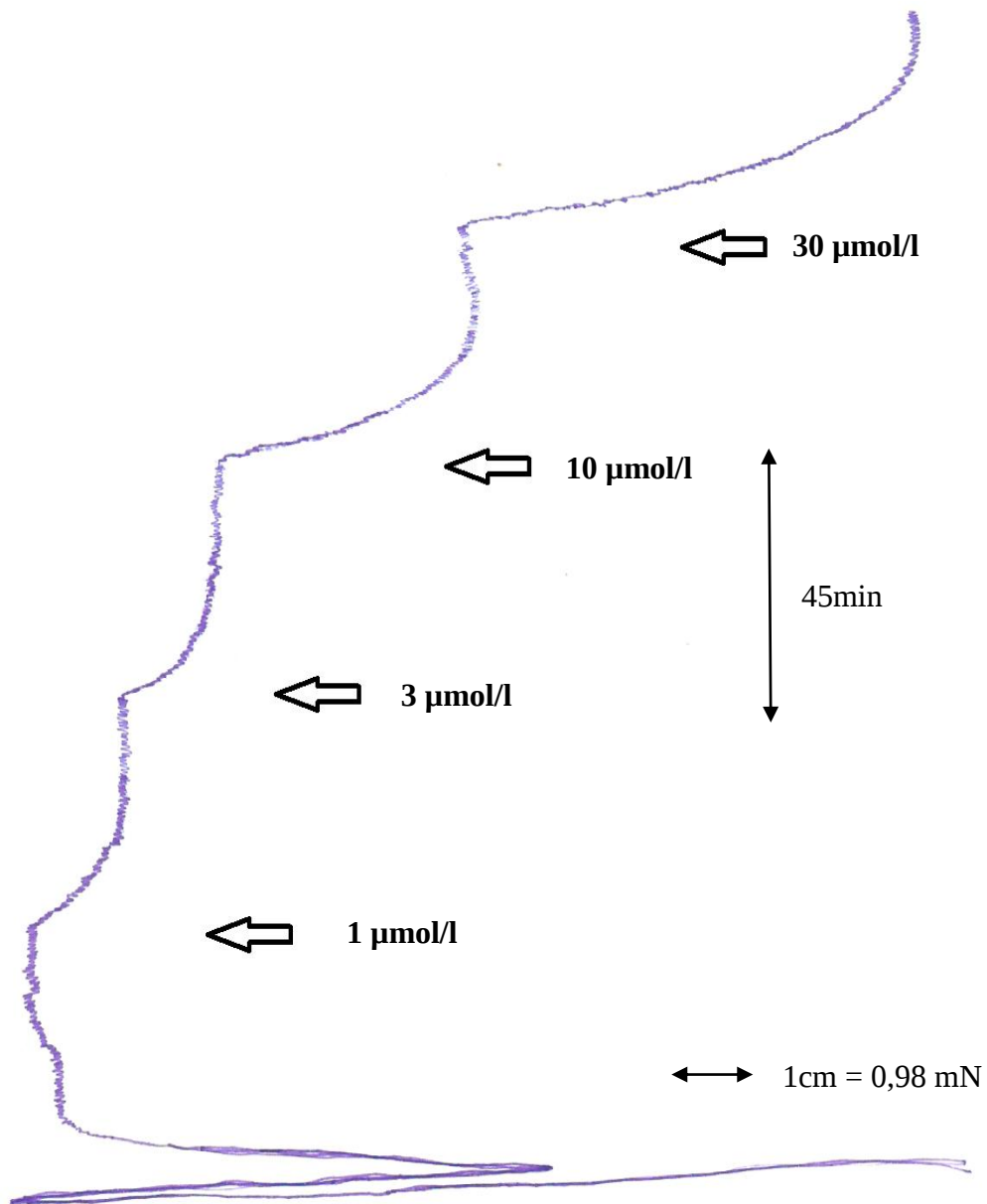
Abbildung 23: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH 3 HCl auf den Darm



Die verwendete Konzentration wurde an der x-Achse in $\mu\text{mol/l}$ und die Abnahme der Kontraktionskraft in % auf der y-Achse eingetragen. Die senkrechten Balken stellen die Standardfehler dar und die strichlierte Linien stehen für die effektive Konzentration bei der es zu einer 50%igen Abnahme kommt (EC_{50}).

Bei einer Konzentration von $9.3 \mu\text{mol/l}$ wurde ein EC_{50} -Wert erreicht.

Abbildung 24: Originalaufzeichnung von MAH 3HCl auf den Darm



Die Abbildung 24 zeigt die Originalregistrierung des Schreibers, woraus eine deutliche spasmolytische Wirkung (Abnahme der Kontraktionskraft) von MAH 3 HCl auf den Dünndarm sichtbar ist.

3.5. Wirkung von MAH 3 HCl auf die Aorta

Die dilatierende Wirkung von Testsubstanz MAH 3 wurde auf die glatte Muskulatur der Aorta untersucht. Man sieht eine signifikante Abnahme der Kontraktionskraft und eine starke dilatierende Wirkung auf die glatte Muskulatur der Aorta.

Der arithmetische Mittelwert (f_c) und Standardfehler wurden aus den erhaltenen Ergebnissen ausgerechnet und in der Tabelle 8 zusammengefasst:

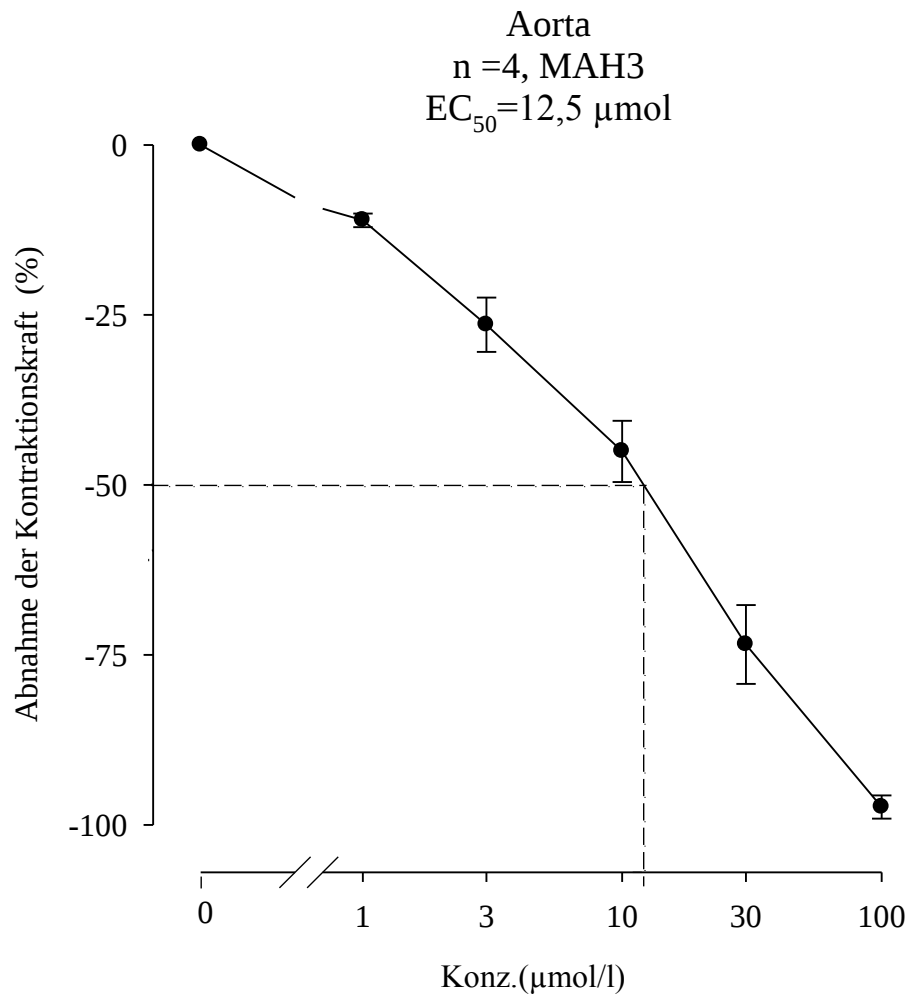
Tabelle 8: Wirkung von MAH 3 HCl auf die Aorta

MAH 3 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuchsanzahl	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$13,92 \pm 1,38$	$0,00 \pm 0,00$	4	-
1	$12,59 \pm 1,66$	$-11,09 \pm 1,00$	4	0,05
3	$10,11 \pm 1,06$	$-26,45 \pm 3,98$	4	0,05
10	$7,49 \pm 0,39$	$-45,07 \pm 4,51$	4	0,01
30	$3,60 \pm 0,74$	$-73,47 \pm 5,79$	4	0,001
100	$0,35 \pm 0,24$	$-97,38 \pm 1,70$	4	0,001

Legende zu Tabelle 8:

- f_c = arithmetische Mittelwert der Kontraktionsänderung
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes

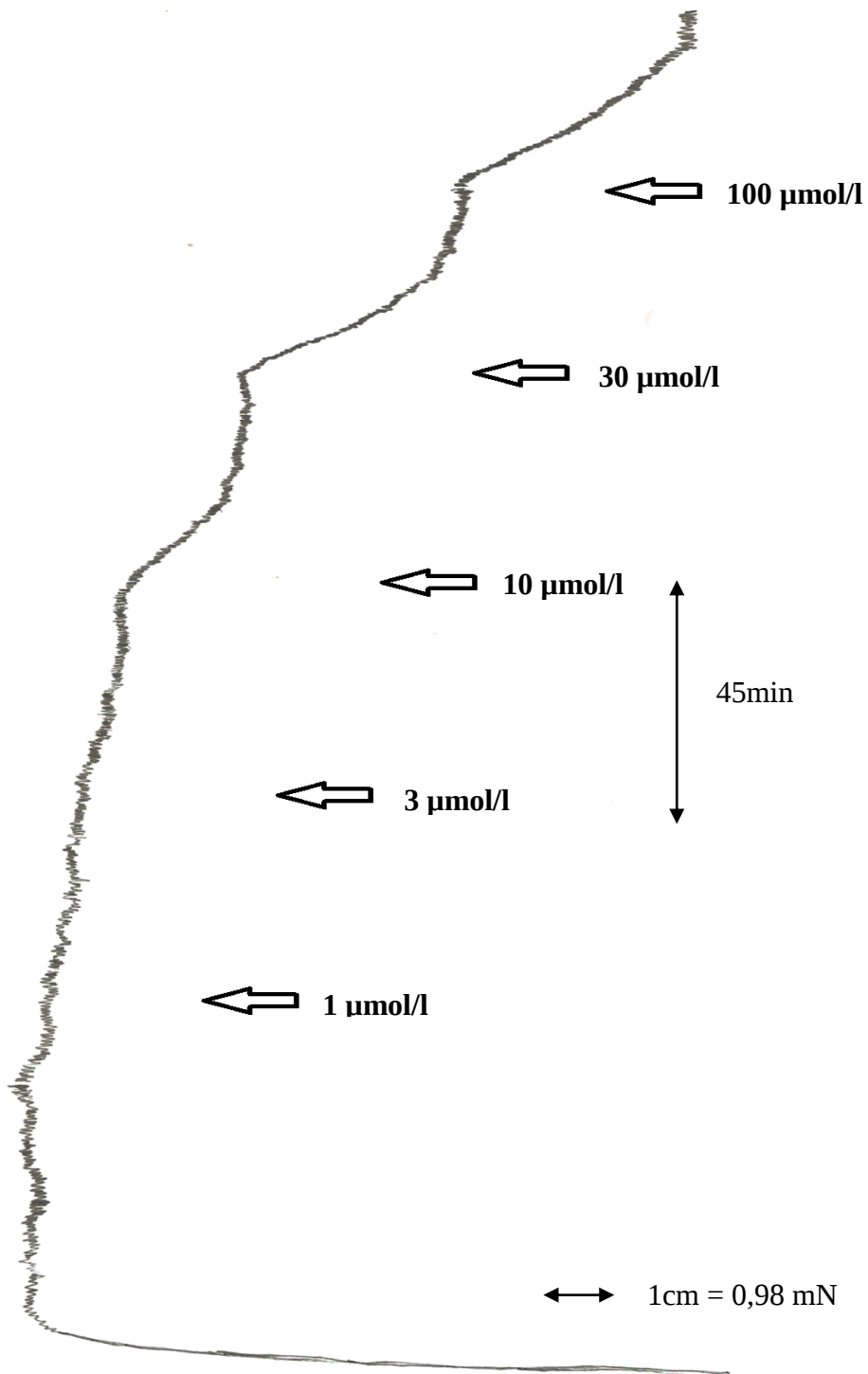
Abbildung 25: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH 3 HCl auf die Aorta



Auf der x-Achse wurde die verwendete Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ angegeben und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in %. Die senkrechten Balken stellen die Standardfehler dar und die strichlierte Linien stehen für die effektive Konzentration bei der es zu einer 50%igen Abnahme kommt (EC_{50}).

Bei einer Konzentration von $12,5 \mu\text{mol/l}$ wurde ein EC_{50} -Wert erreicht.

Abbildung 26: Originalaufzeichnung von MAH 3 HCl auf die Aorta



Die Abbildung 26 zeigt die Originalregistrierung des Schreibers, woraus eine deutliche dilatierende Wirkung von MAH 3 HCl auf die Aorta sichtbar ist.

3.6. Untersuchung mit Glibenclamid (Wirkmechanismus)

Die Testsubstanz MAH 3 HCl hat die stärkste Wirkung auf die glatte Muskulatur der Aorta gezeigt ($EC_{50} = 12.5 \mu\text{mol/l}$). Deswegen wurde der Wirkmechanismus an der Aorta descendes untersucht. Die Präparation und die Einspannung an der Apparatur 2, der Versuchsablauf, sowie die maximale Vorkontraktion mit KCl-Lösung wurden schon im Kapitel 2.3. beschrieben. Die Untersuchungen des Wirkmechanismus erfolgt mit einem K_{ATP} -Kanalblocker, Glibenclamid, wobei seinen Einfluss auf die Aorta in zwei verschiedenen Konzentrationen ($30 \mu\text{mol/l}$ und $100 \mu\text{mol/l}$) getestet wurde. Nach 45 Minuten wurde $15 \mu\text{mol/l}$ Testsubstanz MAH 3 HCl eingespritzt und die dilatierende Wirkung durch eine Öffnung der ATP-abhängigen K^+ -Kanäle beobachtet.

3.6.1. Ergebnisse der Versuche mit $30 \mu\text{mol/l}$ Glibenclamid

Der mögliche Wirkmechanismus der Testsubstanz MAH 3 wurde an drei Präparate der Aorta untersucht. Als erstes wurde $30 \mu\text{mol/l}$ Glibenclamid verwendet.

Die Ergebnisse sind in folgende Tabelle zusammengefasst:

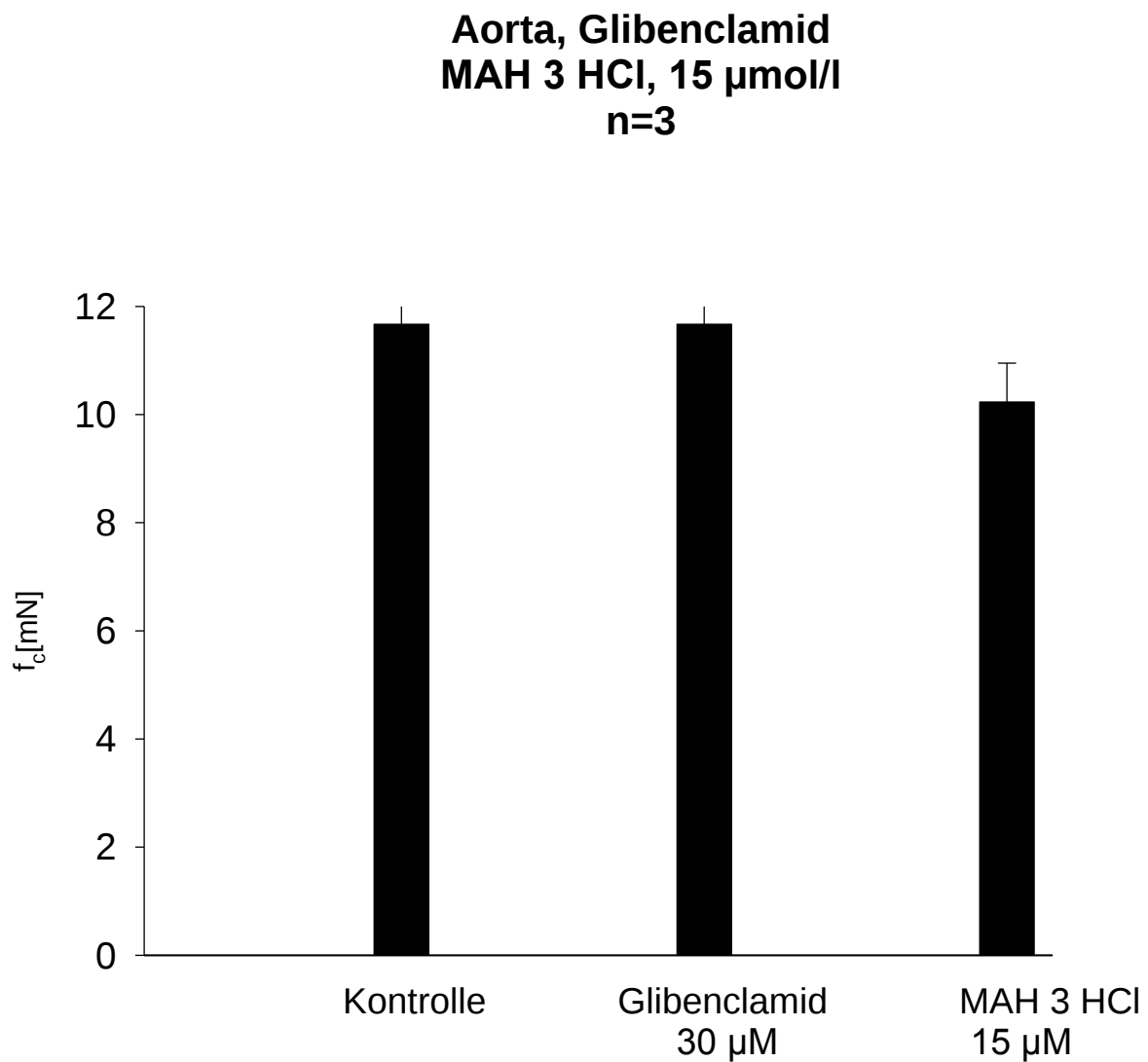
Tabelle 9: Ergebnisse der Versuche von MAH 3 HCl mit $30 \mu\text{mol/l}$ Glibenclamid auf die Aorta

Glibenclamid	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Versuchszahl	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle (0)	$11,67 \pm 0,81$	3	-
$30 \mu\text{mol/l}$	$11,67 \pm 0,81$	3	-
+ $15 \mu\text{mol/l}$ MAH 3 HCl	$10,23 \pm 0,72$	3	n.s.

Legende zu Tabelle 9:

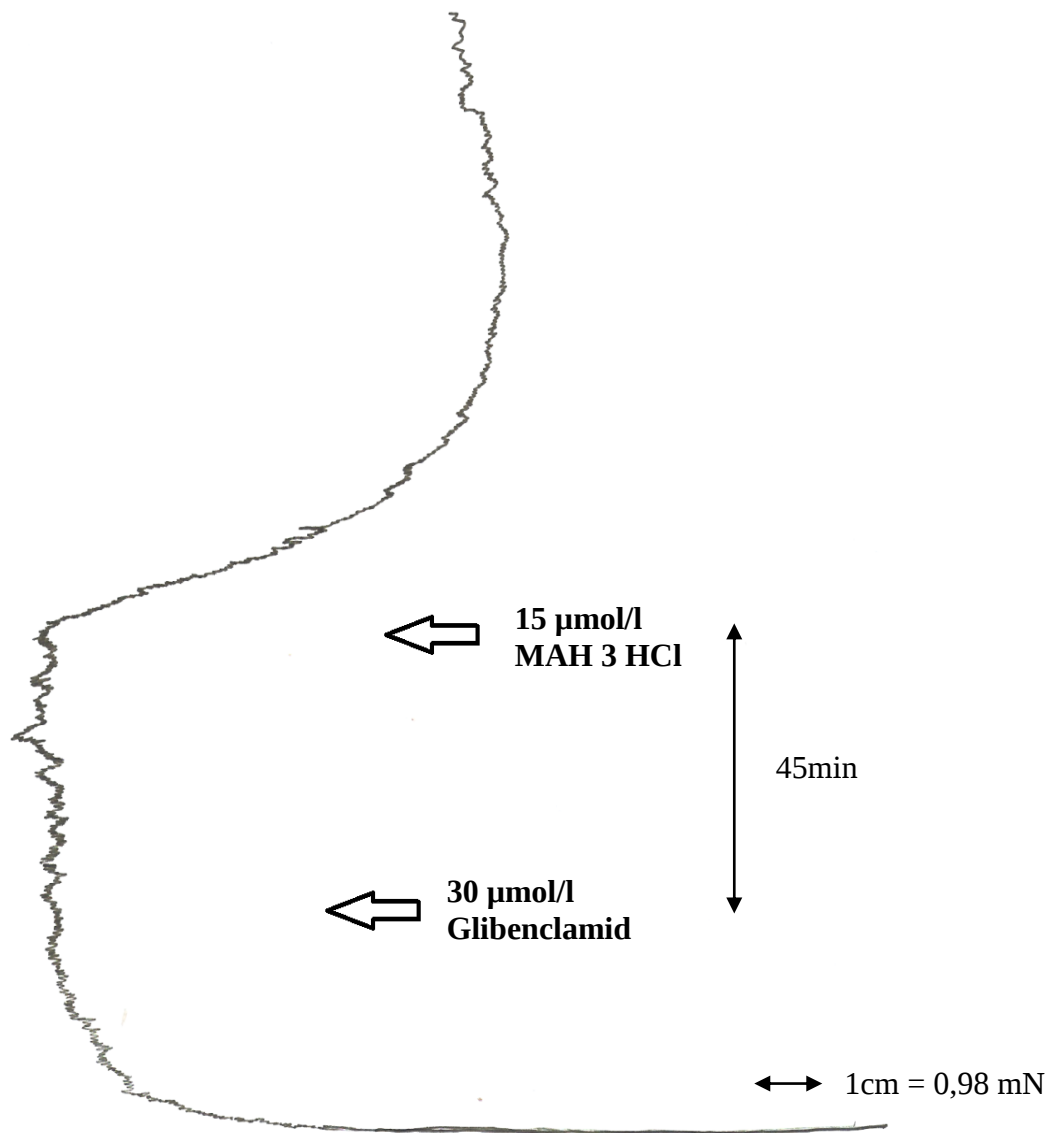
- f_c = arithmetische Mittelwert der Kontraktionsänderung
- SEM = Standardfehler des Mittelwert

- Abbildung 27: Balkendiagramm von MAH 3 HCl auf die Aorta mit 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid



Auf der x-Achse wurde die verwendete Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ angegeben und auf der y-Achse die Kontraktionskraft in mN. Die senkrechten Balken stellen den Mittelwert dar und die strichförmigen Verlängerungen stehen für die Standardfehler.

Abbildung 28: Originalaufzeichnung von MAH 3 HCl-Wirkung an die Aorta unter Einwirkung von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid



Die Abbildung 28 zeigt die Wirkung von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und nachfolgende Gabe von 15 $\mu\text{mol/l}$ der Testsubstanz MAH 3 HCl an der Aorta descendes.

3.6.2. Ergebnisse der Versuche mit 100 µmol/l Glibenclamid

Neben dem Versuche mit 30 µmol/l Glibenclamid an der Aorta wurde auch der Wirkmechanismusuntersuchungen mit 100 µmol/l Glibenclamid durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in folgende Tabelle zusammengefasst:

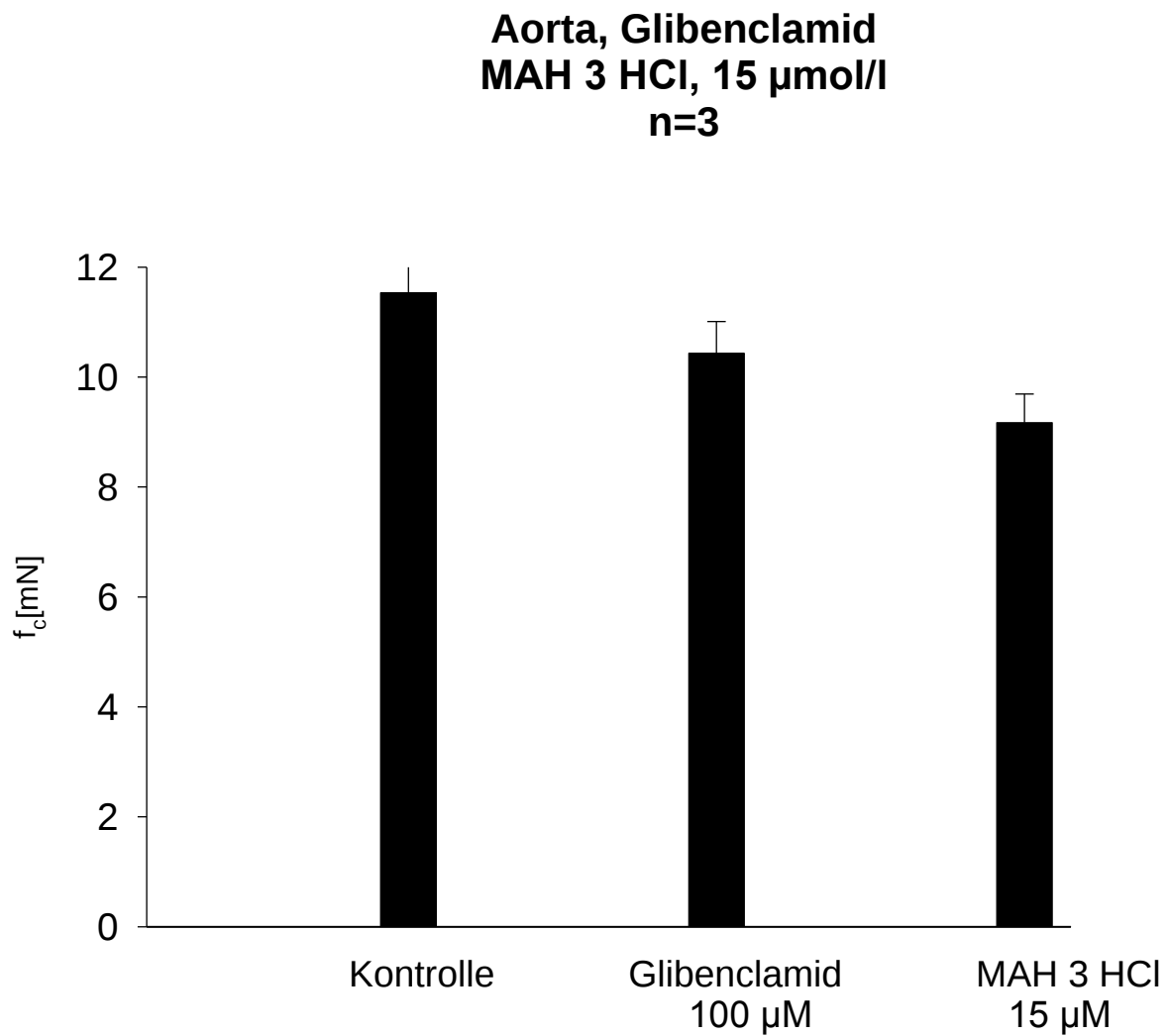
Tabelle 10: Ergebnisse der Versuche von MAH 3 HCl mit 100 µmol/l Glibenclamid auf die Aorta

Glibenclamid	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Versuchsanzahl	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle (0)	11,53 $\pm$ 0,54	3	-
100 µmol/l	10,43 $\pm$ 0,58	3	-
+ 15 µmol/l MAH 3 HCl	9,17 $\pm$ 0,52	3	n.s.

Legende zu Tabelle 10:

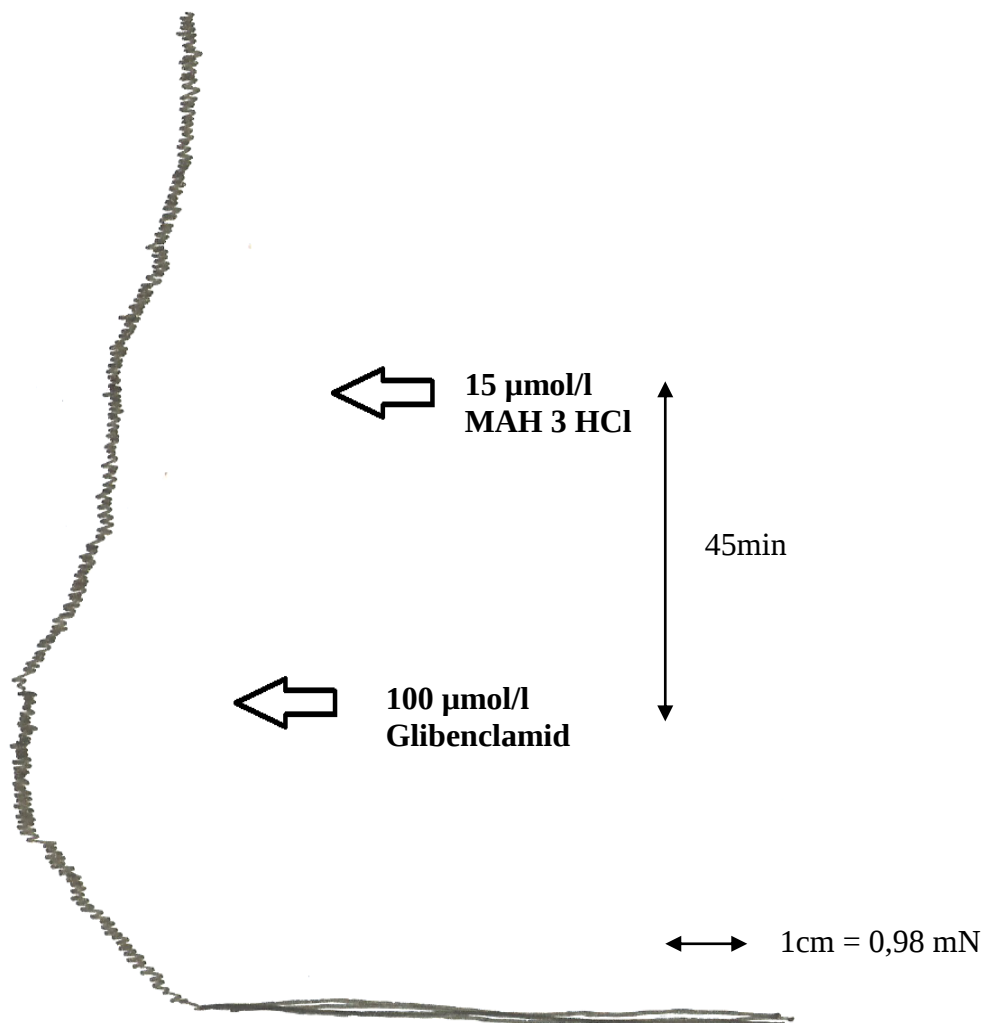
- f_c = arithmetische Mittelwert der Kontraktionsänderung
- SEM = Standardfehler des Mittelwerte

Abbildung 29: Balkendiagramm von MAH 3 HCl auf die Aorta mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid



Auf der x-Achse wurde die verwendete Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ angegeben und auf der y-Achse die Kontraktionskraft in mN. Die senkrechten Balken stellen die Mittelwerte dar und die strichförmigen Verlängerungen stehen für die Standardfehler.

Abbildung 30: Originalaufzeichnung von MAH 3 HCl-Wirkung an die Aorta unter Einwirkung von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid



Die Abbildung 30 zeigt die Wirkung von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und nachfolgende Gabe von 15 $\mu\text{mol/l}$ der Testsubstanz MAH 3 HCl in einem Abstand von 45 Minuten an der Aorta descendes.

4. DISKUSSION

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde die Wirkung und der mögliche Wirkmechanismus der neu synthetisierten Testsubstanz MAH 3 HCl an der glatten Muskulatur (Aorta descendes, Arteria pulmonalis und Ileum terminale) bzw. quergestreiften Muskulatur (Musculus papillaris und Atrium cordis dexter) von isolierten Meerschweinorganen untersucht.

Da die Testsubstanz MAH 3 HCl ein H_2S Derivat ist, kommt es durch hydrolytische Spaltung zu H_2S Freisetzung und damit zur Wirkung auf die Herzmuskelpräparate und die glatte Muskulatur.

Die erwartete Wirkung war eine dilatierende bzw. spasmolytische Wirkung auf die glatte Muskulatur und ein negativ chronotroper bzw. inotroper Effekt auf die quergestreifte Muskulatur.

In den vorangegangenen Kapiteln wurde schon die Isolierung und Präparation der Organe und der Versuchsaufbau beschrieben und auf den nachkommenden Seiten werden die Ergebnisse analysiert und diskutiert.

4.1. Versuchsreihen an glattemuskulären Organen

Die glattemuskulären Präparate (Aorta, Dünndarm und Lungenarterie) mussten, damit man die Versuche überhaupt durchführen konnte, vorher chemisch mit einer Kaliumchlorid-Lösung maximal vorkontrahiert. Bei den Versuchen an den Darmpräparaten wurde eine 60 mmolare KCL-Lösung, während für die Aorta und die Lungenarterie 90 mmolare verwendet.

Sobald die Organe die Plateauphase erreicht hatten, erfolgte die kumulative Zugabe der Testsubstanz MAH 3 nach Pipettierschema in 45-minütigen Abständen, um die möglichen dilatierenden (Blutgefäße) bzw. spasmolytischen (Darmmuskulatur) Effekte zu untersuchen.

Tabelle 11: Wirkungen von MAH 3 HCl auf die glatte Muskulatur

Organpräparat	MAH 3 HCl $f_c \pm \text{SEM} (\%)$ bei Endkonzentration	EC₅₀ ($\mu\text{mol/l}$)
Aorta	$-97,38 \pm 1,70$	12,50
Lungenarterie	$-99,50 \pm 3,43$	13,70
Darm	$-77,59 \pm 3,06$	9,30

Anhand der Werte in der Tabelle 11 ist gut ersichtlich, dass die Wirkung der Testsubstanz MAH 3 sehr stark in allen drei Fällen ausgeprägt ist, wobei der Effekt am terminalen Ileum am stärksten ist.

Der Kontrollwert vor der Substanzzugabe bei der Aorta betrug $13,92 \pm 1,38 \text{ mN}$ bzw. 100%. Durch die Zugabe der Substanzkonzentration nimmt die Kontraktionskraft stetig ab, wobei der Endwert bei einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ $0,35 \pm 0,24 \text{ mN}$ bzw. $-97,38 \pm 1,70 \%$ betrug. Die effektive Konzentration (EC₅₀) wurde schon bei $12,5 \mu\text{mol/l}$ erreicht.

Eine etwas schwächere Wirkung im Vergleich zur Aorta wurde die Testsubstanz auf die Lungenarterie ausgeübt.

Der durchschnittliche Kontrollwert betrug $9,17 \pm 1,87$ mN und fiel dann auf einem Wert von $0,62 \pm 0,53$ mN bzw. $-99,50 \pm 3,43$ % ab. Die effektive Konzentration (EC_{50}) wurde bei $13,7$ $\mu\text{mol/l}$ erreicht.

Bei terminalem Ileum wurde auch eine starke Wirkung ermittelt. Der Mittelwert der Kontraktionskraft in der Kontrollphase betrug $10,42 \pm 2,48$ mN, was eigentlich 100% entspricht. Eine Abnahme der Kontraktionskraft wurde vom Kontrollwert bis zur Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ festgestellt und betrug $2,32 \pm 0,55$ bzw. $-77,59 \pm 3,06$ %.

4.2. Versuchsreihe am quergestreiften Herzmuskulatur

Für die Untersuchungen wurde der Papillarmuskel und der rechte Vorhof verwendet.

Tabelle 12: Wirkung von MAH 3 HCl auf die Herzmuskulatur

Organpräparat	MAH 3 HCl $f_c \pm \text{SEM} (\%)$ bei Endkonzentration	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
Rechte Vorhof	$-19,00 \pm 10,50$	48
Papillarmuskel	$-54,05 \pm 2,50 \cdot 10^{-3}$	10

Der Substanz zeigte eine ausgeprägte negativ chronotrope Wirkung, die bei zunehmender Substanzkonzentration, immer stärker wurde.

Ein Stillstand wurde bei allen vier Präparaten bei einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ festgestellt. Vom Kontrollwert $192,00 \pm 8,54 \text{ mN}$ bzw. 100% hat die Kontraktionskraft um $-19,00 \pm 10,50 \%$ abgenommen. Die effektive Konzentration (EC_{50}) lag bei $48 \mu\text{mol/l}$.

Beim Papillarmuskel, der im physiologischen Nährmedium elektrisch gereizt wurde, kam es zu einer stark negativ inotropen Wirkung. Die effektive Konzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ wurde ermittelt. Bei den ersten drei Konzentrationen, $1 \mu\text{mol/l}$ ($-21,70 \pm 6,79\%$), $3 \mu\text{mol/l}$ ($-37,88 \pm 5,98\%$) und $10 \mu\text{mol/l}$ ($-49,70 \pm 3,31\%$) wurde der Kontraktionskraftabfall sehr stark und bei weiteren Konzentrationen, von $30 \mu\text{mol/l}$ ($-56,41 \pm 1,16\%$) und $100 \mu\text{mol/l}$ ($-54,05 \pm 2,50 \cdot 10^{-3}\%$), war er weniger ausgeprägt.

4.3. Versuchsreihen mit MAH 3 HCl in Kombination mit Glibenclamid

Wie schon in den Kapiteln 2.3. und 3.6. beschrieben wurde, wurde Glibenclamid zur Untersuchung des möglichen Wirkmechanismus verwendet.

Da die niedrigste effektive Konzentration (EC_{50}) an die Aorta ($12,5 \mu\text{mol/l}$) war, wurden die Versuche an diesen Präparat durchgeführt.

Insgesamt wurden sechs Aortapräparate getestet, je drei mit zwei verschiedenen Konzentrationen von Glibenclamid.

Die erste Konzentration von $30 \mu\text{mol/l}$ Glibenclamid verursachte nach Zugabe von $15 \mu\text{mol/l}$ MAH 3 HCl eine schwache Veränderung der Kontraktionskraft von $11,67 \pm 0,81 \text{ mN}$ auf $10,23 \pm 0,72$.

Die zweite Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ Glibenclamid verursachte eine stärkere Änderung der Kontraktionskraft und zwar eine Annahme von $11,53 \pm 0,54$ auf $10,43 \pm 0,58 \text{ mN}$ nach Glibenclamidzugabe. Durch die Zugabe von $15 \mu\text{mol/l}$ MAH 3 HCl wurde die Dilatation noch verstärkt und die Kontraktionskraft fiel auf $9,17 \pm 0,52$ ab.

Aus diesen Versuchen kann geschlossen werden, dass die dilatorischen Effekte der Substanz MAH 3 HCl zumindest teilweise durch eine Öffnung der K_{ATP} -abhängigen Kanäle zustande kommen könnte.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In Rahmen meiner Diplomarbeit wurde die neu synthetisierte Testsubstanz, MAH 3 HCl, an fünf isolierten Meerschweinorganen (Aorta, Darm, Lungenarterie, Papillarmuskel und rechte Vorhof) pharmakologisch untersucht.

Die verwendete Testsubstanz wurde in fünf verschiedenen Konzentrationen von 1 $\mu\text{mol/l}$, 3 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ untersucht.

Die erwartete dilatierende bzw. spasmolytische Wirkung auf die glattemuskulären Organe wurde bestätigt. Bei allen drei Organen (Aorta, Lungenarterie und terminalles Ileum) ist es zu einer starken Abnahme der Kontraktionskraft gekommen und alle drei Organe zeigten sehr niedrige Werte der effektiven Konzentration (Aorta = 12,5, Darm = 9,3 und Lungenarterie 13,7).

Der Substanz zeigte eine negativ chronotrope Wirkung auf den rechten Vorhof, die man durch einen Abfall der Schlagfrequenz beobachten konnte. Die effektive Konzentration (EC_{50}) lag bei 48 $\mu\text{mol/l}$.

Am Papillarmuskel zeigte die Substanz MAH 3 HCl einen starken Einfluss auf die Kontraktilität, d.h. eine negativ inotrope Wirkung. Die Kontraktionskraft betrug schon bei erster Substanzzugabe $-21,70 \pm 6,79 \mu\text{mol/l}$. Die effektive Konzentration (EC_{50}) wurde bei 10 $\mu\text{mol/l}$ erreicht.

Der Wirkmechanismus wurde an der isolierten Aorta descendens getestet, da die Testsubstanz eine starke Wirkung auf die Aorta gezeigt hat. Als Antagonist wurde Glibenclamid, ein K_{ATP} -Kanalblocker in zwei verschiedenen Konzentrationen verwendet.

Nach allen durchgeführten Untersuchungen könnte man die dilatierende Wirkung von Testsubstanz MAH 3 HCl durch die Öffnung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen erklären.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Abe K und Kimura H (1996) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous Neuromodulator. *J Neurosci* 16: 1066 – 1071

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

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

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

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

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

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.

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

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

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

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

Li L, Bhatia M, 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

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

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

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

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

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. *Arzneim 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, Roper MD, Posenberg 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.

Winder CV and Winder HO 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 und 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 K (ATP) 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) Hydroden sulphide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats, J Appl Physiol 102: 261 – 268

7. CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name:	Mia Krušić
Geburtsdatum:	02.09.1984.
Geburtsort:	Zagreb (Kroatien)
Staatsangehörigkeit:	Kroatien
Familienstand:	ledig
Adresse:	Tendlergasse 12/612 1090 Wien
Eltern:	Dipl. -Ing. Ankica Krušić und Dipl. -Ing. Boris Krušić

Ausbildung

2004-2013	Universität Wien, Pharmazie
2003-2004	Fakultät für Ernährung und Biotechnologie, Zagreb (Kroatien)
1999-2003	I. Gymnasium, Zagreb (Kroatien)