



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Pharmakologische Aktivität eines neu
synthetisierten Wirkstoffs (MAH42•HCl) an isolierten
Organen von Meerschweinchen“

verfasst von

Matthias Lalics

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreut von:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

„Wir sind die Guten.“

C.S.

Danksagung

Ich möchte mich euphorisch und überaus herzlich bei meinen Eltern Gaby und Bert, bei meiner zukünftigen Frau Maria (Meri, ich liebe dich!), bei meiner restlichen Familie und bei meinen Freunden bedanken. Danke für die Unterstützung sowohl im Studium als auch abseits davon!

Spezieller Dank gilt natürlich auch meinem einzigartigen Diplomarbeitsbetreuer Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik für Beistand und Motivation.

1.	Einleitung	1
1.1.	Zielsetzung.....	1
1.2.	Allgemeines	1
1.3.	Arterielle Hypertonie	3
1.4.	Pulmonale arterielle Hypertonie	4
1.5.	Koronare Herzkrankheit	6
2.	Methodik	7
2.1.	Versuchstiere.....	7
2.2.	Verwendete Organe bzw. Organteile	7
2.2.1.	Truncus pulmonalis	7
2.2.2.	Aorta descendens	8
2.2.3.	Terminales Ileum	8
2.2.4.	Musculus papillaris	9
2.2.5.	Atrium dextrum	9
2.3.	Testsubstanz	10
2.4.	Versuchsanordnung.....	11
2.4.1.	Allgemeines.....	11
2.4.2.	Apparatur 1.....	12
2.4.3.	Apparatur 2.....	14
2.4.4.	Schreibgerät.....	15
2.4.5.	Nährlösung	16
2.4.6.	Gasgemisch	17
2.4.7.	Kaliumchlorid-Lösung	17
2.4.8.	Lösung der Testsubstanz	17
2.4.9.	Glibenclamid	18
2.5.	Entnahme und Präparation der Organe	19
2.5.1.	Allgemeines.....	19
2.5.2.	Präparation der absteigenden Hauptschlagader (Aorta descendens)	19
2.5.3.	Präparation des Lungenstammes (Truncus pulmonalis).....	19
2.5.4.	Präparation des terminalen Ileums	20
2.5.5.	Präparation des Musculus papillaris.....	20
2.5.6.	Präparation des Atrium dextrum	20
2.6.	Versuchsablauf	21
2.6.1.	Allgemeines.....	21
2.6.2.	Versuchsablauf Truncus pulmonalis	22
2.6.3.	Versuchsablauf Aorta descendens	22
2.6.4.	Versuchsablauf Terminales Ileum.....	22
2.6.5.	Versuchsablauf Musculus papillaris.....	23
2.6.6.	Versuchsablauf Atrium dextrum	24
2.6.7.	Versuchsablauf Wirkmechanismus.....	24
2.7.	Datenauswertung	25

3.	Ergebnisse	26
3.1.	Allgemeines	26
3.2.	Wirkung von MAH42•HCl an der Aorta descendens	27
3.2.1.	Konzentrations-Wirkungs-Kurve	28
3.2.2.	Kontraktionskurve	29
3.3.	Wirkung von MAH42•HCl am Truncus Pulmonalis.....	30
3.3.1.	Konzentrations-Wirkungs-Kurve	31
3.3.2.	Kontraktionskurve	32
3.4.	Wirkung von MAH42•HCl am terminalen Ileum.....	33
3.4.1.	Konzentrations-Wirkungs-Kurve	34
3.4.2.	Kontraktionskurve	35
3.5.	Wirkung von MAH42•HCl am Musculus papillaris.....	36
3.5.1.	Konzentrations-Wirkungs-Kurve	37
3.5.2.	Kontraktionskurven	38
3.6.	Wirkung von MAH42•HCl am Atrium dextrum.....	39
3.6.1.	Konzentrations-Wirkungs-Kurve	40
3.6.2.	Kontraktionskurven	41
3.7.	Ergebnisse der Versuchsreihen zur Untersuchung des Wirkmechanismus	42
3.7.1.	Balkendiagramm der Kontraktionskraft (Glibenclamid 30 µmol/l)	44
3.7.2.	Balkendiagramm der Kontraktionskraft (Glibenclamid 100 µmol/l)	45
3.7.3.	Kontraktionskurve (Glibenclamid 30 µmol/l)	46
3.7.4.	Kontraktionskurve (Glibenclamid 100 µmol/l)	47
4.	Diskussion	48
4.1.	Beurteilung der Daten	48
4.2.	Wirkmechanismus	49
4.3.	Anwendungspotential	50
5.	Zusammenfassung	51
6.	Literaturverzeichnis.....	53
7.	Curriculum vitae	54

1. Einleitung

1.1. Zielsetzung

Das Ziel dieser Diplomarbeit ist es, eine am Department für Medizinisch/Pharmazeutische Chemie der Universität Wien synthetisierte Substanz (MAH 42•HCl) auf ihre vasodilatierende, spasmolytische, inotrope sowie chronotrope Wirkung an isolierten Organen von Meerschweinchen zu testen und die Ergebnisse zu dokumentieren. Zur Beurteilung der genannten Wirkungen werden an den jeweiligen Organen in verschiedenen Versuchsreihen isometrische Kontraktionsmessungen durchgeführt. Der weitere Zweck der Dokumentation besteht darin, dass, nachdem mit vielen anderen, strukturell sehr ähnlichen, Substanzen in gleicher Weise vorgegangen wird, eine Struktur-Wirkungs-Beziehung erstellt werden kann, was aber selbstverständlich nicht mehr Teil dieser Arbeit ist. Im Idealfall könnte MAH42•HCl sogar als Wirkstoff mit therapeutischem Potential erkannt werden.

1.2. Allgemeines

Das MAH42-Molekül beinhaltet ein Schwefelatom. Es wird angenommen, dass nach hydrolytischer Spaltung des Moleküls Schwefelwasserstoff, auch bekannt als Dihydrogensulfid (H_2S), freigesetzt wird. Zwar ist Schwefelwasserstoff in höheren Konzentrationen als sehr giftiges Gas bekannt, welches zu Bewusstseinsverlust und zentraler Atemlähmung führt (genauer Wirkmechanismus bis dato ungeklärt), allerdings gelangt es immer mehr in den Fokus der pharmazeutischen Forschung. Es wird vom menschlichen Körper endogen beim Cystein-Metabolismus in geringen Konzentrationen hergestellt. Diese Reaktion wird von den Enzymen Cystathionin beta-Synthase (CBS) und/oder Cystathionin gamma-Lyase (CSE) katalysiert. Studien an Mäusen, bei denen ein genetisches Ausschalten von CSE zu einer geringeren H_2S -Konzentration in Geweben und Organen und vermutlich somit zu höherem Blutdruck und verringerter Gefäßrelaxation führte, legen eine physiologische Rolle von Schwefelwasserstoff bei der kardiovaskulären Regulation nahe (Hosoki et al. 1997, Yang et al. 2008).

Durch Studien an isolierten Aorten von Ratten konnte gezeigt werden, dass einer vasodilatierenden Wirkung von Schwefelwasserstoff die Öffnung von ATP-sensitiven Kaliumkanälen zu Grunde liegt (Zhao et al. 2001).

Kaliumkanäle im Allgemeinen sind Ionenkanäle, die ausschließlich für Kaliumionen durchlässig sind. Der Durchtritt erfolgt passiv und die Richtung ist vom Konzentrationsgefälle abhängig (normalerweise vom Zellinneren nach außen). Es gibt mehrere Arten von Kaliumkanälen, welche sich im Mechanismus unterscheiden, der zu ihrer Öffnung bzw. Blockade führt. Neben dem folgend beschriebenen ATP-sensitiven gibt es einen spannungsaktivierten, einen Kalzium-aktivierten, einen mechanisch aktivierten und einen G-Protein-aktivierten Kaliumkanal. Der ATP-sensitive Kaliumkanal ist nun prinzipiell geöffnet. Die Bindung von ATP (AdenosinTriPhosphat) an seine regulatorische Untereinheit führt zu dessen Blockade (Mutschler et al. 2008).

In den Beta-Zellen des Pankreas spielen die ATP-abhängigen Kaliumkanäle eine Schlüsselrolle bei der Insulinfreisetzung. Wenn der Blutzuckerspiegel steigt, wird über den Glucosetransporter2 (GLUT2) mehr Glucose in die Zelle transportiert, was deren ATP-Produktion steigert. So werden die ATP-sensitiven Kaliumkanäle vermehrt geschlossen. Dies führt wiederum zu einer Depolarisation der Zellmembran, worauf spannungsabhängige Kalziumkanäle öffnen und Ca^{2+} in die Zelle einströmt. Die erhöhte Kalziumkonzentration bewirkt dann eine Aktivierung der Insulin-haltigen Vesikel, welche mit der Zellmembran verschmelzen und so Insulin freisetzen. Diese Schlüsselrolle wird zum Beispiel durch Sulfonylharnstoffe bei der Therapie von Diabetes mellitus Typ 2 ausgenutzt. Sie blockieren den ATP-abhängigen Kaliumkanal, wodurch es zu einer gesteigerten Insulinausschüttung kommt (Mutschler et al. 2008).

In Muskelzellen führt ein umgekehrtes Offenhalten der ATP-sensitiven Kaliumkanäle zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran. Somit bleiben spannungsabhängige Kalziumkanäle geschlossen und die zelluläre Kalziumkonzentration sinkt ab. Da Ca^{2+} für die Muskelkontraktion von entscheidender Bedeutung ist, kommt es so zu einer Entspannung der Muskulatur.

Kaliumkanalöffner, die therapeutisch genutzt werden, sind etwa Minoxidil und Diazoxid. Minoxidil ist ein Kopexil-Derivat und findet auf Grund der zuvor beschriebenen Wirkung auf (glatte) Muskelzellen orale Anwendung bei therapieresistentem Bluthochdruck, indem es die Gefäßwände von Arteriolen entspannt und somit zu einer Vasodilatation führt. Des Weiteren wird es lokal auf der Kopfhaut gegen Haarausfall verwendet. Der diesbezügliche Wirkmechanismus ist allerdings noch nicht geklärt. Diazoxid, ein Benzothiadiazin-Derivat ohne diuretische Wirkung, wird therapeutisch als Hyperglykämikum eingesetzt, welches rasch und befristet den Blutzuckerspiegel erhöht und somit bei einem hypoglykämischen Schock verabreicht werden kann. Wie aus der vorangegangenen Beschreibung der Insulinfreisetzung aus den Beta-Zellen des Pankreas ersichtlich, wirkt sich eine vermehrte Öffnung der ATP-sensitiven Kaliumkanäle negativ auf die Freisetzung dieses Hormons aus. Ein daraus logischerweise resultierender Abfall der Insulinkonzentration im Blut sorgt letztlich für den Blutzuckeranstieg (Mutschler et al. 2008).

Zwar werden im Laufe dieser Arbeit auch andere Daten gewonnen – wie Aussagen über spasmolytische, inotrope bzw. chronotrope Wirkung – jedoch liegt der Fokus auf der vasodilatierenden Wirkung. Aus diesem Grund werden folgend die wichtigsten Krankheitsbilder inklusive ihrer bisherigen Therapie beschrieben, für deren Behandlung ein Wirkstoff mit vasodilatierendem Effekt von Interesse wäre.

1.3. Arterielle Hypertonie

Von arterieller Hypertonie, im Allgemeinen oft Bluthochdruck genannt, spricht man bei einer chronischen Erhöhung des Blutdrucks im arteriellen System. Laut WHO-Definition liegen die Grenzwerte bei einem systolischen Wert von 140 mm Hg und bei einem diastolischen Wert von 90 mm Hg. Sind die Ursachen, wie zum Beispiel Störungen des Hormonhaushalts oder Nierenschäden, bekannt, handelt es sich um eine sekundäre Hypertonie (als Folge einer primären Erkrankung sozusagen). Um ein Vieles häufiger (90 – 95 %) sind die Ursachen jedoch weitgehend unbekannt. In diesem Fall spricht man von einer primären bzw. essentiellen Hypertonie.

Eine arterielle Hypertonie bleibt sehr oft asymptomatisch (ohne erkennbare Symptome) und wird erst an den Folgeschäden erkannt. Bluthochdruck führt zu einer Hypertrophie und einer verringerten Elastizität der Blutgefäße und des Herzens. In weiterer Folge kommt es zu Arteriosklerose und Herzinsuffizienz.

Zur Therapie der arteriellen Hypertonie stehen neben der Lebensstiländerung (wie zum Beispiel Reduktion von Tabak- und Alkoholkonsum, Gewichtsreduktion, Steigerung der körperlichen Aktivität, kochsalzarme Ernährung) einige Wirkstoffgruppen zur Verfügung. Zu den wichtigsten gehören die ACE-Hemmer, die Sartane, die Betablocker, die Diuretika und die Kalziumantagonisten. ACE-Hemmer bzw. Sartane greifen direkt in das „Renin-Angiotensin-Aldosteron-System“ (RAAS genannt) ein. Sie führen zu einer Weitstellung der Gefäße, indem sie die Konvertierung von Angiotensin I zu Angiotensin II verhindern bzw. den zugehörigen Rezeptor blockieren, und somit zu einer Blutdrucksenkung. Kalziumantagonisten wirken ebenfalls über eine Weitstellung der Gefäße. Sie blockieren Kalzium-spezifische Ionenkanäle an der Oberfläche glatter Muskelzellen der Gefäßwände. Durch den folglich verringerten Kalziumeinstrom in die Zelle kommt es zu einer Relaxierung der Gefäßmuskulatur. Betablocker greifen am Herz an und führen über Ökonomisierung der Herzarbeit zur Senkung des Blutdruckes. Sie blockieren in erster Linie die Beta-Adreno-Rezeptoren am Herz und wirken damit negativ chronotrop, negativ dromotrop und negativ inotrop, wodurch es zur erwähnten Ökonomisierung kommt. Diuretika veranlassen die Niere über unterschiedliche Mechanismen dazu, vermehrt Wasser auszuscheiden, und reduzieren dadurch das Blutvolumen. So senken auch diese letztlich den Blutdruck (Mutschler et al. 2008).

1.4. Pulmonale arterielle Hypertonie

Laut WHO gehört die (primäre) pulmonale arterielle Hypertonie zu den „Orphan Diseases“ („seltene Krankheiten“ - davon spricht man, wenn statistisch von 2000 Personen weniger als eine davon betroffen ist). Es handelt sich um eine chronische Erhöhung des Blutdruckes im Lungenkreislauf. Definiert ist sie über einen Grenzwert des mittleren Blutdruckes in der Pulmonalarterie von 25 mm Hg in Ruhe bzw. 30 mm Hg bei körperlicher Belastung. Wie bei der arteriellen Hypertonie gibt es hier eine sekundäre pulmonale arterielle Hypertonie, oftmals ausgelöst durch eine chronisch obstruktive

Lungenerkrankung (COPD), und die primäre oder idiopathische pulmonale arterielle Hypertonie, deren genaue Ursachen ebenfalls noch nicht zur Gänze geklärt sind (Eddahibi et al. 2002, Mutschler et al. 2008).

Zu den Symptomen gehören eingeschränkte körperliche Leistungsfähigkeit, Angina Pectoris (Herzenge), Kreislaufstörungen, Müdigkeit und Ödeme. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer Hypertrophie der Gefäßmuskulatur und später zu einer irreversiblen Umwandlung von Muskulatur zu Bindegewebe. Die Gefäßwände verlieren an Elastizität und der Widerstand, gegen den das Herz das Blut in den Kreislauf pumpen muss, steigt. Dadurch verringert sich auch die Auswurfleistung des Herzens und es wird immer weniger Sauerstoff aufgenommen. Die Überlebenschancen für Patienten, die an pulmonaler arterieller Hypertonie leiden, sind schlecht, vor Allem wenn diese nicht früh genug erkannt wird. Etwa 50 – 80 % sterben innerhalb der ersten fünf Jahre (Mutschler et al. 2008).

Zur medikamentösen Therapie stehen Endothelin-Antagonisten wie Bosentan bzw. Phosphodiesterase-5-Hemmer (PDE-5-Hemmer) wie Sildenafil zur Verfügung. Bosentan, wirkt vasodilatierend und konkurriert mit Endothelin um die Bindungsstelle an dessen Rezeptor, wodurch es seine extrem stark gefäßverengende Wirkung verhindert. Sildenafil, bekannt vor allem als Wirkstoff des Medikaments Viagra® zur Behandlung der erektilen Dysfunktion, führt über eine Hemmung der Phosphodiesterase-5, welche hauptsächlich in der glatten Muskulatur des Peniswellkörpers und der Lungenarterien vorkommt, zu einer Gefäßerweiterung. Durch die Hemmung des Enzyms kommt es zu einer verringerten Abbaurate von cGMP (cyclischem GuanosinMonoPhosphat), einem Second Messenger, der in glatten Muskelzellen an deren Relaxation beteiligt ist (Mutschler et al. 2008).

1.5. Koronare Herzkrankheit

Als koronare Herzkrankheit (KHK) oder auch ischämische Herzkrankheit (IHK) bezeichnet man eine Erkrankung der Herzkranzgefäße, die meistens durch arteriosklerotische Veränderungen eben jener Gefäße ausgelöst wird. Da die Koronargefäße den Herzmuskel selbst versorgen, kommt es nun bei einer Verengung dieser zu einem Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffbedarf des Myokards und Sauerstoffangebot. Risikofaktoren, die eine Manifestation begünstigen, sind sowohl genetische Prädisposition, Alter und Geschlecht, als auch Fettstoffwechselstörungen, Übergewicht, Tabakkonsum, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Bewegungsmangel.

Das Hauptsymptom ist mit Angina pectoris ein anfallsartiger Brustschmerz. In weiterer Folge kann es zu Herzrhythmusstörungen, Herzinsuffizienz, einem Herzinfarkt bzw. einem plötzlichen Herztod kommen. In Industrieländern ist die koronare Herzkrankheit auf Grund der Risikofaktoren Todesursache Nummer eins.

Für die medikamentöse Behandlung stehen mit Nitraten (bzw. anderen Stickstoffmonoxid-freisetzenden Substanzen) und ACE-Hemmern hauptsächlich Wirkstoffe mit gefäßerweiternder Wirkung, aber auch Beta-Blocker mit Wirkung auf das Herz selbst und Diuretika mit blutdrucksenkender Wirkung zur Verfügung. Nitrate setzen Stickstoffmonoxid (NO), welches auch als „endothelium-derived relaxing Factor“ (EDRF) bekannt ist, frei. Dieses Molekül steigert die Aktivität des Enzyms Guanylylcyclase, welches die Umwandlung von Guanosintriphosphat in das zuvor bereits erwähnte cGMP katalysiert. Somit kommt es einerseits durch eine Erweiterung der Koronargefäße zu einer besseren Sauerstoffversorgung des Herzmuskels, und andererseits durch generelle Vasodilatation und daraus resultierender Senkung der Vor- und Nachlast des Herzens zu einem verminderten Sauerstoffbedarf des Myokards (Mutschler et al. 2008).

Aus den nun angeführten Wirkmechanismen der für die verschiedenen Therapieansätze der drei dargestellten Krankheitsbilder verwendeten Substanzen lässt sich die enorme Bedeutung eines gefäßerweiternden Effekts von bislang nicht untersuchten Substanzen erkennen.

2. Methodik

2.1. Versuchstiere

Die für die Tests verwendeten Organe stammen ausschließlich von Hausmeerschweinchen (*Cavia porcellus*) der TRIK-Linie. Hierbei handelt es sich um eine Auszucht. Somit kann durch Inzucht entstandenen Gen-Defekten vorgebeugt werden. Die besondere Eignung der Organe von Hausmeerschweinchen für die durchgeführten Versuche beruht auf der Ähnlichkeit der auf deren Zelloberflächen exprimierten Ionenkanäle und Rezeptoren zu denen des Menschen. Um die Versuche möglichst reproduzierbar zu gestalten, werden nur Tiere im Alter zwischen vier bis acht Wochen mit einem Körpergewicht zwischen 300 g und 600 g verwendet.

2.2. Verwendete Organe bzw. Organteile

2.2.1. Truncus pulmonalis

Als Lungenstamm (*Truncus pulmonalis*) wird die dem Herzen entspringende Arterie des Lungenkreislaufs vor der Teilung in die Pulmonalarterien (*Arteria pulmonalis sinistra* bzw. *Arteria pulmonalis dextra*) bezeichnet. Hier wird das sauerstoffarme Blut von der rechten Herzhälfte zu den Pulmonalkapillaren transportiert, um dort vom Körper produziertes Kohlendioxid (CO_2) abzugeben und eingeatmeten Sauerstoff (O_2) aufzunehmen. Eine eventuelle Relaxierung dieser Arterie wäre in Bezug auf die Therapie von pulmonaler arterieller Hypertonie von Interesse (Pries et al. 2008).

2.2.2. Aorta descendens

Die dem linken Ventrikel entspringende Arterie des Körperkreislaufes ist die Hauptschlagader (Aorta). Diese gliedert sich, vom Herzen ausgehend, in aufsteigende Hauptschlagader (Aorta ascendens), Aortenbogen (Arcus aortae) und absteigende Hauptschlagader (Aorta descendens). Über die Aorta gelangt das sauerstoffreiche Blut in weitere Leitungsarterien und über diese zu den verschiedenen Geweben und schließlich in die Kapillaren, in denen der Austausch von Gasen und Nährstoffen stattfindet. Eine relaxierende Wirkung auf die Aorta descendens würde generell auf einen vasodilatierenden Effekt bei großen arteriellen Gefäßen schließen lassen. Dies wäre in Hinsicht auf die Behandlung von arterieller Hypertonie von Interesse (Pries et al. 2008).

2.2.3. Terminales Ileum

Der Dünndarm ist für den Hauptanteil der Verdauung und Nährstoffaufnahme sowie für Ansäuerung und den Weitertransport des Chymus (Speisebrei), aber auch für einen Teil der Immunabwehr verantwortlich. Er teilt sich in drei Abschnitte. Der Zwölffingerdarm (Duodenum) ist vom Magen ausgehend der erste und kürzeste Teil. Auf diesen folgt der deutlich längere Leerdarm (Jejunum). Zu guter Letzt bildet der Krummdarm (Ileum) den längsten Abschnitt des Dünndarms und mündet via Ileozäkalklappe in den Dickdarm. Der letzte Abschnitt des Krummdarms wird als terminales Ileum bezeichnet. Eine mögliche spasmolytische Wirkung auf den Darm ist aus zweierlei Gesichtspunkten betrachtet interessant. Im Hinblick auf eine Therapie von Koliken bzw. Durchfallerkrankungen wäre eine solche erwünscht. Liegt der Fokus allerdings auf der Therapie der arteriellen Hypertonie, muss ein relaxierender Effekt der Substanz auf die Darmmuskulatur ausgeschlossen werden können (Pries et al. 2008).

2.2.4. Musculus papillaris

Im Herzen befindet sich zwischen Vorhof und Ventrikel jeweils eine der beiden Segel- oder Atrioventrikularklappen (Valva atrioventriculares). Die der linken Herzhälfte wird aus zwei Segeln gebildet und heißt davon abgeleitet Bikuspidalklappe (Valva bicuspidalis). Im Gegensatz hierzu wird die Atrioventrikularklappe der rechten Herzhälfte aus drei Segeln gebildet. Der abgeleitete Name ist Trikuspidalklappe (Valva tricuspidalis). Entspannen sich die Ventrikel, kann das Blut über diese Klappen vom Vorhof in die Herzkammer fließen. An ihrem freien Ende sind die Segel über Sehnenfäden (Chordae tendineae) mit den Papillarmuskeln (Musculus papillariae) im jeweiligen Ventrikel verbunden. Diese sind Ausstülpungen (Papillen) der Herzmuskulatur. Kontrahieren sie, werden die Sehnenfäden gespannt und ein Durchschlagen der Segel in den Vorhof wird verhindert. Somit kann es während der Systole zu keinem Rückfluss des Blutes in das Atrium kommen. Die Kraft, mit der die Papillarmuskel kontrahieren, ist mit der Kontraktionskraft des Herzens in Relation zu setzen. Deswegen wäre eine die Kontraktionskraft dieser Präparate beeinflussende Wirkung stellvertretend für eine positiv bzw. negativ inotrope Wirkung zu sehen (Pries et al. 2008).

2.2.5. Atrium dextrum

Der rechte Vorhof des Herzens (Atrium dextrum) wird von drei Venen – der oberen Hohlvene (Vena carva superior), der unteren Hohlvene (Vena carva inferior) und dem Koronarvenensinus (Sinus coronarius) - mit sauerstoffarmen Blut versorgt. Bei seiner Kontraktion wird das Blut über die Trikuspidalklappe in den rechten Ventrikel weiter befördert. Zusätzlich befindet sich auch der Sinusknoten (Nodus sinuatrialis) im Bereich des rechten Vorhofes. Er ist der primäre Taktgeber des Herzens und erzeugt spontan Aktionspotentiale, welche sich in einer gerichteten Bewegung über das Herz ausbreiten und so zu einem geregelten Kontraktionsablauf führen. Versuche am Atrium dextrum sollten den Einfluss der Testsubstanz auf die Schlagfrequenz des Herzens (Chronotropie) zeigen. Im Hinblick auf eine Therapie der arteriellen Hypertonie wäre eine positive bzw. negative chronotrope Wirkung nicht wünschenswert (Pries et al. 2008).

2.3. Testsubstanz

MAH 42•HCl (Nomenklatur: *2-(Diethylamino)ethyloxy-octyloxy-methanthioat Hydrochlorid*) hat eine molekulare Masse von 325,94 g/mol und ist eine gelbe, wasserlösliche, hygroscopische Substanz. Sie wurde am Department für Medizinisch/Pharmazeutische Chemie synthetisiert. Ziel dabei war es, eine Substanz zu kreieren, die zum einen über den angestrebten Wirkmechanismus wirkt und zum anderen eine Organselektivität aufweist. Der angestrebte Wirkmechanismus gliedert sich wie folgt: nach einer hydrolytischen Spaltung soll Schwefelwasserstoff freigesetzt werden, welcher indirekt (über einen bis dato nicht geklärten Mechanismus) ATP-sensitive Kaliumkanäle öffnet. Der folgende Kaliumausstrom aus der Zelle bewirkt eine Hyperpolarisation der Zellmembran. Diese wiederum führt zu einer Blockade spannungsabhängiger Calciumkanäle. Daraus ergibt sich eine Relaxation der glatten Muskulatur.

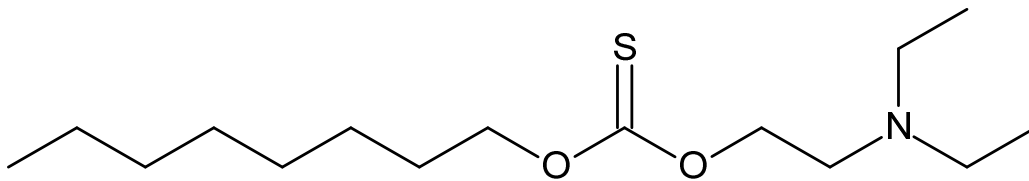


Abb. 2.1.: Strukturformel des MAH42-Moleküls

2.4. Versuchsanordnung

2.4.1. Allgemeines

Mit Hilfe der Apparaturen kann die Kraft, mit der das jeweilige Präparat kontrahiert, gemessen und über einen angeschlossenen Schreiber aufgezeichnet werden. Dafür wird das Präparat an einer Seite fixiert. An der anderen Seite ist es über einen Silberdraht mit dem Kraftwandler verbunden. Dieser enthält einen Dehnungsmessstreifen, durch den stetig Strom fließt. Kommt es hier zu einer Längenänderung, ändert sich auch der elektrische Widerstand. So kann die mechanische Kontraktion des Präparats in ein elektrisches Signal umgewandelt werden. Dieses wird über einen Verstärker an das Schreibgerät weitergeleitet. Mittels einer Feintriebsschraube, welche die Höhe des Kraftwandlers in Bezug auf die der Organhalterung verändert, wird das Anlegen einer, für das jeweilige Präparat individuellen, Grundspannung (Vorspannung) ermöglicht. Diese Vorspannung ist notwendig, um die Reproduzierbarkeit der Versuche zu gewährleisten. Die jeweilig angelegte Vorspannung basiert auf Erfahrungswerten vorangegangener Versuche. Um physiologische Bedingungen zu generieren, befindet sich das Präparat während des Versuchs im sogenannten Organbad, welches mit einer speziellen Nährlösung gefüllt ist, die wiederum apparaturabhängig eine konstante Temperatur von 37 C° bzw. 35 C° hat. Zusätzlich wird das Organbad von einem speziellen Gasgemisch (Oxymix™) durchströmt. Für die Versuche standen zwei verschiedenen Apparaturen zur Verfügung (Reiter M 1967).

2.4.2. Apparatur 1

Apparatur 1 dient zur Durchführung der Versuche an den Präparaten: Truncus pulmonalis, Aorta descendens, terminales Ileum und Atrium dextrum. Sie besteht aus zwei separat an der selben senkrecht positionierten Führungsstange befestigten Elementen. Das erste Element besteht aus: Organhalterung, Aufhängevorrichtung, Kraftwandler und Feintrieb. In der Organhalterung ist das Präparat fixiert. Sie besteht aus einem etwa 10 cm langen, senkrecht positionierten Metallstift. An dessen unterem Ende befindet sich ein Haken, in den das Präparat entweder direkt (Truncus pulmonalis bzw. Aorta descendens) oder mittels eines am Präparat selbst befestigten zweiten Hakens (terminales Ileum bzw. Atrium dextrum) eingehängt wird. Über die Aufhängevorrichtung – sowohl hier als auch in Apparatur 2 ein Silberdraht, dessen unteres Ende (die letzten 2 mm) zu einem Haken umgebogen ist - ist das Präparat mit dem Kraftwandler verbunden. Das etwas mehr als 25 ml fassende Organbad bildet das zweite Element. Es besteht aus einer Doppelwand und besitzt an der Oberseite eine Öffnung, um das Präparat aufnehmen zu können. Weitere Öffnungen dienen dem Zu- bzw. Ablauf der Nährstofflösung und der Gaszufuhr. In der Kammer der Doppelwand verläuft ein Warmwasserkreislauf, der mit einem Heizbecken in Verbindung steht. Durch diesen wird die Nährstofflösung im Organbad auf $37\text{ C}^{\circ} \pm 1\text{ C}^{\circ}$ aufgeheizt bzw. konstant gehalten. Die separate Fixierung der beiden Elemente an der Führungsstange ermöglicht ein Verschieben entlang der selbigen. Dadurch kann das Präparat problemfrei zwischen Organhalterung und Silberdraht eingebracht werden und anschließend in das bereits auf 37 C° aufgewärmte Organbad eingeführt werden.

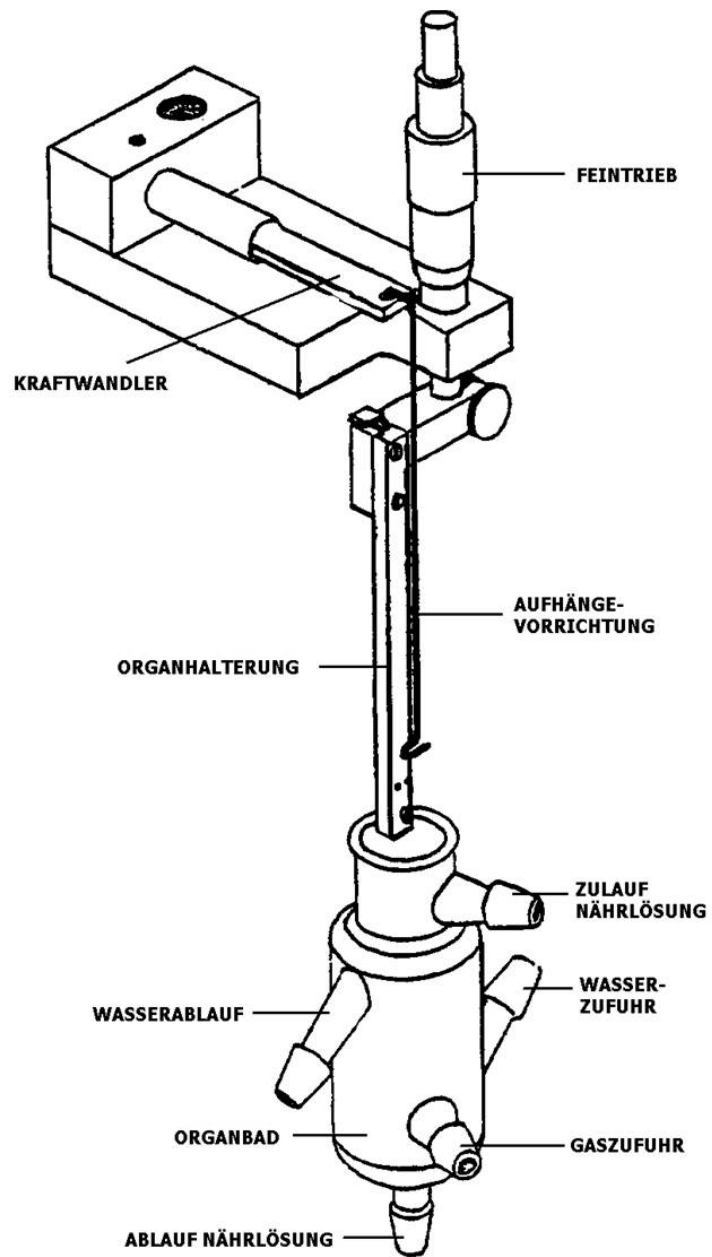


Abb. 2.2.: Apparatur 1

2.4.3. Apparatur 2

Apparatur 2 dient ausschließlich zur Durchführung der Versuche am Musculus papillaris. Abgesehen von einigen kleinen Unterschieden ist sie wie Apparatur 1 aufgebaut. Das Organbad, welches ebenfalls knapp mehr als 25 ml fasst, besitzt keine Doppelwand, sondern wird zwecks Temperierung direkt in das 35 C° warme Wasserbad getaucht. Die einzigen beiden Öffnungen befinden sich an der Ober- und Unterseite. Die obere Öffnung dient dem Einführen des Präparats, dem Befüllen mit Nährstofflösung, der Zufuhr der Testsubstanz bzw. dem Entleeren des Organbades. Die untere, deutlich kleinere Öffnung ist mit einer Fritte versehen und ermöglicht die Gaszufuhr. Das Element, welches Kraftwandler, Feintrieb, Organfixierung und Aufhängevorrichtung enthält, befindet sich wiederum auf einer Führungsstange, die auf einem frei beweglichen Stativ mit Fuß montiert ist und vertikal bewegt werden kann. So ist es ebenfalls möglich, das Organ zuerst zwischen Organfixierung und Aufhängevorrichtung einzubringen und anschließend in das 35 C° warme Organbad einzuführen. Ein weiterer Unterschied zu Apparatur 1 ergibt sich bei der Organfixierung, da der Papillarmuskel elektrisch gereizt werden muss, um zu kontrahieren. Sie besteht aus einer quadratischen, 5x5 mm großen Platinelektrode und einer gleich großen Plexiglasscheibe, die sich mittels einer Schraube gegeneinander pressen lassen. Dazwischen wird ein Ende des Papillarmuskels eingeklemmt. Am anderen Ende ist der Muskel über einen an ihm selbst befestigten Haken mit einem Silberdraht verbunden. Dieser wiederum stellt die Verbindung zum Kraftwandler her. Über die Platinelektrode kann der Papillarmuskel nun elektrisch gereizt werden.

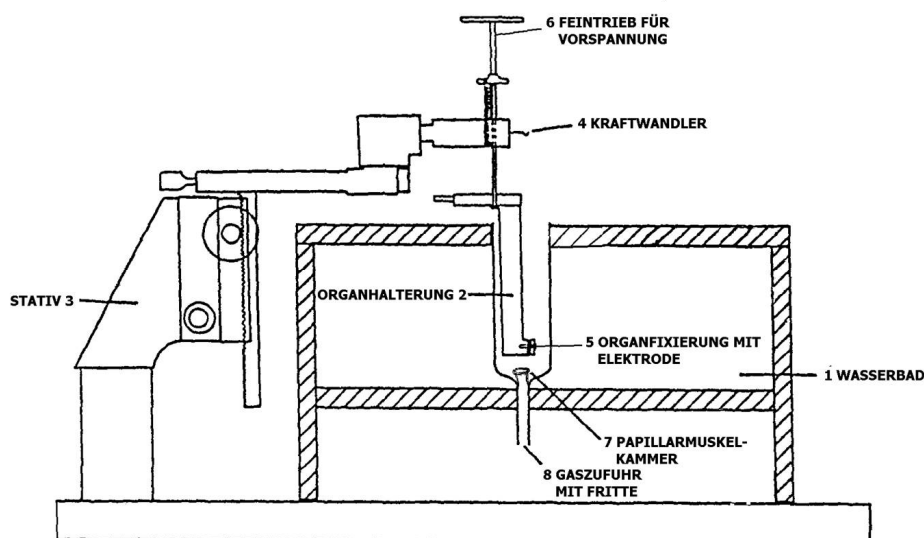


Abb. 2.3.: Apparatur 2

2.4.4. Schreibgerät

Die Sensibilität des Schreibgerätes kann reguliert werden und ist für jeden Präparatstyp individuell. In weiterer Folge wird sie mit „1 mV“, „2 mV“, „5 mV“ und „10 mV“ bezeichnet, was sich auf die Anzahl der Millivolt des vom Verstärker kommenden elektrischen Signals bezieht, welche einer Auslenkung des Schreibers von einem Zentimeter entsprechen. Aufgezeichnet wird auf Endlosmillimeterpapier, mit einer Schreibgeschwindigkeit von entweder 5 mm/sek oder 1 mm/min. Die Versuche an den beiden Blutgefäßen sowie am Darm werden mit der langsameren Geschwindigkeit (1 mm/min) aufgezeichnet, da sich hier die Kontraktionsintensität nur relativ langsam ändert. Der rechte Vorhof und der Papillarmuskel kontrahieren rhythmisch und das jeweils nur im Sekundenbereich. Um am Millimeterpapier die einzelnen Kontraktionen unterscheiden zu können, wird bei diesen beiden Präparaten die höhere Geschwindigkeit (5 mm/sek) gewählt.

Sensibilität des Schreibgerätes [mV]	Auslenkung des Schreibers [cm]	Kontraktionskraftänderung des Präparates [mN]
10	1	1,96
5	1	0,98
2	1	0,39
1	1	0,20

Tabelle 2.1.: Sensibilitätseinstellung des Schreibgeräts

2.4.5. Nährlösung

Während der Versuche und der Präparation müssen sich die Organe in einer physiologischen Umgebung befinden, mit Glucose, Elektrolyten und Sauerstoff versorgt bzw. vor dem Austrocknen geschützt werden. Zu diesem Zweck wird eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung angefertigt. Diese ist aus hygienischen Gründen an jedem Versuchstag frisch herzustellen. Dafür werden die in Tabelle 2.2 aufgelisteten Lösungen und Substanzen gemischt und mit destilliertem Wasser auf das entsprechende Volumen aufgefüllt. Es ist darauf zu achten, die CaCl_2 -Lösung als letzten Bestandteil langsam hinzu zu tropfen, damit ein Ausfallen verhindert wird. Danach muss die Nährlösung mindestens zehn Minuten mit dem Gasgemisch (in Kapitel 2.4.6. beschrieben) begast werden.

Substanz	Molare Masse [g/mol]	Stammlösung	Menge an Stammlösung/ Substanz pro Liter Nährlösung	Konzentration [mmol/l]
NaCl	58,442	1000,25 g/5 l	33,60 ml	115,01
KCl	74,550	50,33 g/5 l	35,00 ml	4,73
NaHCO_3	84,010	125,00 g/5 l	83,70 ml	24,91
MgSO_4	120,370	147,02 g/5 l	1,18 ml	0,29
KH_2PO_4	136,090	62,00 g/250 ml	1,18 ml	2,15
CaCl_2	110,980	34,00 g/250 ml	3,20 ml	3,92
D-Glucose	180,160	Reinsubstanz	1,98 g	10,99

Tabelle 2.2.: Zusammensetzung der Nährlösung

2.4.6. Gasgemisch

Die Nährlösung muss während der Versuche und, wie bereits erwähnt, vor deren ersten Verwendung von einem Gasgemisch (Oxymix™) durchströmt werden. Dieses setzt sich zu 95 Prozent aus O₂ und zu 5 Prozent aus CO₂ zusammen. Die Versorgung der Organe mit Sauerstoff ist notwendig, um sie vor dem Absterben zu bewahren. Das Kohlendioxid sorgt für einen konstant physiologischen pH-Wert (ca. 7,4). Des Weiteren bewirkt der Gasstrom im Organbad eine schnellere Verteilung des Wirkstoffes.

2.4.7. Kaliumchlorid-Lösung

Da die Versuche Aufschluss über eine eventuelle Relaxierung der Muskulatur geben sollen, ist es notwendig, die Präparate vor der Zugabe der Testsubstanz maximal zu kontrahieren. Der Papillarmuskel bzw. der rechte Vorhof stellen hier eine Ausnahme dar. Ersterer wird über die Platinelektrode von Apparatur 2 kontinuierlich elektrisch gereizt und kontrahiert dadurch. Zweiterer kontrahiert wegen des Sinusknotens selbstständig. Die restlichen Präparate werden mit einer Kaliumchlorid-Lösung zur Kontraktion gebracht. Die unterschiedliche Konzentration (90 mmol/l für Aorta descendens und Truncus pulmonalis bzw. 60 mmol/l für das terminale Ileum) ergeben sich aus Erfahrungswerten vorangegangener Versuche. Zur Herstellung werden entweder 670 mg KCl (für die 90 mmol/l), oder 450 mg KCl (für die 60 mmol/l) in einen 100 ml-Messkolben eingebracht. Danach ist mit Nährlösung auf 100,00 ml aufzufüllen.

2.4.8. Lösung der Testsubstanz

Um MAH 42•HCl in das Organbad einbringen zu können muss es in Lösung gebracht werden. Da bei maximaler Wirkstoffgabe eine Konzentration von 100 µmol/l im Organbad zu erreichen ist, werden entsprechend dem Molekulargewicht (325,94 g/mol) und den 25 ml Nährlösung bzw. Kaliumchlorid-Lösung, welche sich während des Versuchs im Organbad befinden, 0,81 mg Substanz eingewogen und in 100 µl Wasser gelöst.

2.4.9. Glibenclamid

Um herauszufinden, ob die Testsubstanz über den angenommenen Wirkmechanismus zur Muskelrelaxierung führt, muss nach der Auswertung der Ergebnisse der eigentlichen Tests noch eine entsprechende Versuchsreihe durchgeführt werden. Dabei werden zunächst die ATP-sensitiven Kaliumkanäle mit dem irreversiblen Antagonisten Glibenclamid blockiert. Danach wird die Testsubstanz zugeführt, welche die blockierten Kanäle nun nicht mehr öffnen kann. Kommt es dennoch zu einer relevanten Entspannung des Präparates, so muss diese über einen anderen Wirkmechanismus zustande gekommen sein. Glibenclamid gehört zur Gruppe der Sufonylharnstoffe, welche als orale Antidiabetika zur Therapie von Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt werden. Um ins Organbad eingebracht zu werden, muss eine Lösung hergestellt werden. Da in 25 ml Nährlösung bzw. 25 ml Kaliumchlorid-Lösung eine Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ erreicht werden soll, müssen 1,24 mg Glibenclamid (Molekulare Masse: 494,00 g/mol) genau eingewogen und in 100 μl Dimethylsulfoxid gelöst werden (Aktories et al. 2009).

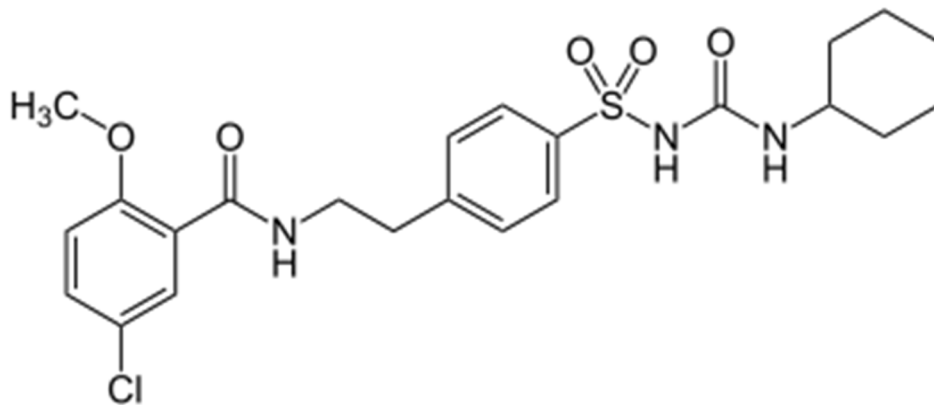


Abb. 2.4.: Strukturformel des Glibenclamid-Moleküls

2.5. Entnahme und Präparation der Organe

2.5.1. Allgemeines

Die Meerschweinchen werden mit einem gezielten Genickschlag getötet. Unmittelbar danach werden Bauch- und Brustraum geöffnet, um die genannten Organe entnehmen zu können. Zwischen der Entnahme und der Präparation, welche mit Ausnahme des terminalen Ileums ebenfalls unmittelbar darauf erfolgt, werden die Organe in Nährlösung gelagert. Die Präparation selbst erfolgt entweder unter einer Stereolupe, oder unter einem Lichtmikroskop (40-fache Vergrößerung), und in jedem Fall in den Präparierschalen. Hierbei handelt es sich um kreisrunde, flache Petrischalen mit einem Durchmesser von zirka 8 cm und einem rechtwinkligen Rand von zirka 1 cm Höhe. Deren Boden ist mit einer 1 bis 2 mm dicken Korkschicht ausgelegt. So können die Präparate mit Stecknadeln fixiert werden. Zur Bearbeitung stehen Federgriffschere und Pinzette zur Verfügung.

2.5.2. Präparation der absteigenden Hauptschlagader (Aorta descendens)

Das entnommene Stück hat eine Länge von zirka 2 bis 3 cm. Als Erstes muss dieses nun von Fett- und Bindegewebe befreit werden. Anschließend wird es in 1 – 2 mm lange Stücke zerschnitten. Daraus ergeben sich je nach Geschicklichkeit des Präparators vier bis sieben Ringe, die bis zum Versuch in begaster (Oxymix™) Nährlösung gelagert werden.

2.5.3. Präparation des Lungenstammes (Truncus pulmonalis)

Der Lungenstamm wird auf selbige Weise wie die Aorta präpariert. Auf Grund der geringeren Länge erhält man allerdings nur 1 bis 2 Stücke.

2.5.4. Präparation des terminalen Ileums

Das Ileum wird direkt an der Mündung zum Dickdarm vor der Ileozäkalklappe abgetrennt und zur späteren Orientierung mit einem Bindfaden markiert. Von dort ausgehend wird ein ungefähr 10 bis 20 cm langes Stück entnommen. Zur Präparation schneidet man zirka 0,5 cm lange Stücke in einem 45° Winkel zur „Darmachse“ ab. Diese Schräge ermöglicht ein Offenbleiben des Darmlumens, obwohl an beide Enden zur Aufhängung jeweils ein Haken gebunden wird. Sowohl Nährlösung als auch Wirkstoff müssen nämlich ins Darmlumen vordringen können.

2.5.5. Präparation des Musculus papillaris

Zuerst wird das Herz als Ganzes entnommen. Danach werden unter dem Mikroskop der rechte Vorhof und die Papillarmuskel herauspräpariert. An ihrer Basis, der zuvor der Herzwand zugewandten Seite, wird mit Bindfaden jeweils ein Haken befestigt.

2.5.6. Präparation des Atrium dextrum

An der dem Herzzentrum gegenüberliegenden Seite verzichtet man auf die totale Entfernung von sämtlichem Fettgewebe am Präparat, was eine korrekte Ausrichtung in der Versuchsanordnung erleichtert. Nun wird hier und auf der zuvor dem Herzzentrum zugewandten Seite auch mit Bindfaden je ein Haken befestigt.

2.6. Versuchsablauf

2.6.1. Allgemeines

Prinzipiell verlaufen die Versuche an allen fünf verschiedenen Präparatstypen nach demselben Grundschema. Nach dem Einspannen bzw. dem Reizen mittels Kaliumchloridlösung muss bis zum Erreichen einer Konstanz der Kontraktionskraft bzw. der Schlagfrequenz (Atrium dextrum) gewartet werden. Anschließend wird eine Messung der selbigen ohne Wirkstoffzusatz durchgeführt, worauf eine kumulative Zugabe der Testsubstanz (in Tabelle 2.3. beschrieben) mit einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ im Organbad folgt. Direkt vor jeder neuen Wirkstoffzugabe kommt es wieder zu einer Messung, um beurteilen zu können, wie sich die vorherige Konzentration auf das Präparat auswirkt. Das jeweilige Einbringen der nächsten Konzentrationsstufe geschieht exakt alle 45 Minuten. Nach der letzten Wirkstoffzugabe (dem Erreichen der Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$) wird ebenfalls 45 Minuten bis zur letzten Messung gewartet. Wie schon in Kapitel 2.4.1. erwähnt, muss, um die Versuche miteinander vergleichen zu können, an die jeweiligen Präparatstypen die selbe Vorspannung angelegt werden. Dies geschieht nach dem Einführen des bereits in die Apparatur eingespannten Organes in das gefüllte Organbad bzw. bei den mit Kaliumchlorid-Lösung zu reizenden Präparaten vor deren Zugabe.

Zeitpunkt des Einspritzens (angegeben in Minuten nach der Konstanzmessung)	Einzuspritzendes Volumen der Testsubstanz-Lösung [μl]	Konzentration der Testsubstanz im Organbad [$\mu\text{mol/l}$]
0 min	3	3
45 min	7	10
90 min	20	30
135 min	70	100

Tabelle 2.3.: Schema der kumulativen Wirkstoffzugabe

2.6.2. Versuchsablauf Truncus pulmonalis

Zu Beginn muss das ringförmige Präparat unten in den Haken der Organhalterung und oben in den der Aufhängevorrichtung eingehängt werden. Beide Haken greifen nun in den „Ring“. Nach Einführung in das mit Nährlösung gefüllte Organbad wird bei einer Sensibilitätseinstellung des Schreibgerätes von „5 mV“ mittels Feintriebsschraube eine Vorspannung von 9,81 mN angelegt. Dies entspricht einer Auslenkung des Schreibers von 10 cm. Nun folgt eine 20-minütige Akklimatisierungsphase, an deren Ende der Schreiber auf Null zurückgesetzt wird und die Aufzeichnung beginnt. Direkt im Anschluss wird die Nährlösung abgelassen und durch exakt 25 ml Kaliumchloridlösung (90 mmol/l) ersetzt, was, wie bereits erwähnt, zu einer maximalen Kontraktion des Präparates führt. Jetzt muss bis zur ersten Messung und der anschließenden Wirkstoffzugabe mindestens 45 Minuten, aber auf jeden Fall so lange gewartet werden, bis eine konstante Auslenkung des Schreibers gegeben ist (eine konstante Auslenkung des Schreibers unter einer Größe von 5 cm hat zur Folge, dass das Präparat verworfen werden muss). Konstant bedeutet eine geringere Abweichung als ± 1 mm über einen Zeitraum von 15 – 20 Minuten.

2.6.3. Versuchsablauf Aorta descendens

Mit diesem Präparat verfährt man genauso wie mit dem Truncus pulmonalis. Ein Unterschied ergibt sich bei der Sensibilitätseinstellung des Schreibgeräts (10 mV) und bei der Vorspannung (19,6 mN bzw. 10 cm Auslenkung). Weiters wird nach der 20-minütigen Akklimatisierungsphase die Sensibilität auf 5 mV herabgesetzt.

2.6.4. Versuchsablauf Terminales Ileum

Die bei der Präparation angebrachten Haken werden in Organhalterung und Aufhängevorrichtung eingehängt. Bei einer Sensibilitätseinstellung von 5 mV wird eine Vorspannung von 4,92 mN (entspricht 5 cm Auslenkung des Schreibers) angelegt. Der restliche Ablauf entspricht, mit Ausnahme der Konzentration der Kaliumchloridlösung

(hier 60 mmol/l), den beiden zuvor dargestellten Abläufen (sh. Kapitel 2.6.2. bzw. 2.6.3.).

2.6.5. Versuchsablauf Musculus papillaris

Der am Präparat befestigte Haken wird in die Aufhängevorrichtung eingehängt. Die zuvor dem Sehnenfaden bzw. der Segelklappe zugewandte Seite wird zwischen Plexiglasplatte und Platinelektrode (Apparatur 2) eingeklemmt und mittels der vorhandenen Schraube fixiert. Nach Einführung in das mit exakt 25 ml Nährlösung gefüllte Organbad wird bei einer Sensibilitätseinstellung von 5 mV eine Vorspannung von 3,92 mN (entspricht 4 cm Auslenkung des Schreibers) angelegt. Nun wird mit der kontinuierlichen elektrischen Reizung des Muskels begonnen. Dafür wird ein Rechteckimpuls mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Dauer von 10 ms über die Platinelektrode eingeleitet. Da diese Reizung nicht mit voller Stromstärke erfolgen sollte, um ein zu schnelles Entleeren der Katecholaminspeicher des Muskels zu vermeiden, muss die Reizschwelle ermittelt werden. Dies geschieht durch Absenken der Stromstärke vom Maximum. Ist die Reizschwelle unterschritten, kontrahiert der Muskel nicht mehr. Nun wird diese ermittelte Mindeststromstärke um 10 Prozent erhöht. Nach einer 20-minütigen Akklimatisierungsphase wird (wie bei den zuvor beschriebenen Versuchsabläufen mindestens 45 Minuten lang) auf eine konstant bleibende Auslenkung des Schreibers je Kontraktion gewartet. In diesem Fall darf die Größe der aufgezeichneten Amplitude um nicht mehr als 1 mm abweichen. Die Aufzeichnung findet, nicht wie bei den Blutgefäßen und dem Darm durchgehend, sondern alle 5 Minuten für einen Zeitraum von zirka 6 Sekunden statt. Eine durchgehende Aufzeichnung würde eine unnötige und vor allem auch unübersichtliche Datenmenge zur Folge haben. Die Aufzeichnungen können, abhängig von der individuellen Kontraktionskraft des jeweiligen Muskels, bei einer Sensibilitätseinstellung von 1 mV oder 2 mV durchgeführt werden. Allerdings muss die gewählte Einstellung über den gesamten Versuch beibehalten werden, um die aufgezeichneten Amplituden in Relation setzen zu können.

2.6.6. Versuchsablauf Atrium dextrum

Der Vorhof wird mit der zuvor dem Herzzentrum abgewandten Seite nach oben mit je einem Haken in die Aufhängevorrichtung bzw. in die Organhalterung eingehängt. Nach der Einführung in das mit exakt 25 ml Nährlösung gefüllte Organbad wird bei einer Sensibilitätseinstellung von 5 mV eine Vorspannung von 10,19 mN (entspricht 10,4 cm Auslenkung des Schreibers) angelegt. Da der Sinusknoten spontan Aktionspotentiale generiert und der Vorhof dadurch von sich aus rhythmisch kontrahiert, muss dieses Präparat weder elektrisch noch chemisch mittels Kaliumchlorid-Lösung gereizt werden. Nach einer 20-minütigen Akklimatisierungsphase beginnt man mit der Aufzeichnung. Diese erfolgt nicht kontinuierlich, sondern alle 5 Minuten für mindestens 12 Sekunden. Die Messung kann bei einer beliebigen Sensibilitätseinstellung vorgenommen werden. Diese kann auch während des Versuchs geändert werden. Grund dafür ist, dass es sich beim rechten Vorhof um das einzige Präparat handelt, bei dem nicht die Kraft gemessen wird. Das Augenmerk liegt auf der Schlagfrequenz. Wie bei allen Präparaten muss sich vor der ersten Messung bzw. der ersten Wirkstoffzugabe Konstanz einstellen (Mindestwartezeit: 30 Minuten). In diesem Fall ist Konstanz dadurch definiert, dass die Anzahl der Schläge pro 12 Sekunden über 3 Aufzeichnungen – also über zehn Minuten hinweg – nicht um mehr als einen Schlag abweicht.

2.6.7. Versuchablauf Wirkmechanismus

Der Versuch bezüglich des Wirkmechanismus geschieht an jenem Präparat, an dem MAH 42•HCl die größte Wirkung zeigt. Hierfür wird mit dem Präparat bis zur Einstellung von Konstanz und der ersten Messung genau so verfahren wie im jeweiligen Versuchablauf beschrieben. Danach allerdings wird Glibenclamid-Lösung zugegeben. In einer Versuchsreihe verwendet man 30 µl (entspricht einer Konzentration von 30 µmol/l im Organbad), in der anderen Versuchsreihe spritzt man an dieser Stelle 100 µl (entspricht einer Konzentration von 100 µmol/l im Organbad) ein. Nach 45 Minuten folgt abermals eine Messung. Nun wird jene Menge an Testsubstanz zugefügt, welche der EC₅₀ für das jeweilige Präparat entspricht. Nach 45 Minuten wird die letzte Messung durchgeführt und der Versuch beendet.

2.7. Datenauswertung

Durch die kontraktionskraftbedingte Auslenkung des Schreibers werden pro Versuch eine (Truncus pulmonalis, Aorta descendens und terminales Ileum) bzw. mehrere (Musculus papillaris und Artrium dextrum) Kurven aufgezeichnet. Die zu den Messzeitpunkten gegebenen Auslenkungen werden mittels eines Lineals ausgemessen und entsprechend der jeweiligen Sensibilitätseinstellung in mN Kontraktionskraft umgerechnet. Bei den Blutgefäßen und dem Darm wird die Distanz von der Nulllinie bis zur Kurve, beim Papillarmuskel die mittlere Höhe der Amplitude, als Messstrecke herangezogen. Da beim rechten Vorhof nicht die Kontraktionskraft, sondern die Schlagfrequenz im Mittelpunkt steht, wird hier die Anzahl der Schläge pro 12 Sekunden gezählt und mal fünf multipliziert, um auf Schläge pro Minute zu kommen. Anhand der von der Wirkstoff-Dosis abhängigen Daten wird mit Hilfe des PC-Programms „Sigma Plot 9“ für jedes Präparat eine Konzentrations-Wirkungskurve erstellt. Für die statistische Datenauswertung kommt der gepaarte Student-t-Test zum Einsatz, bei dem der P-Wert die Irrtumswahrscheinlichkeit angibt ($P > 0,05$: nicht signifikant; $P < 0,05$: signifikant; $P < 0,01$: hoch signifikant).

3. Ergebnisse

3.1. Allgemeines

Im Folgenden werden die gemittelten Messergebnisse jedes Präparat-Typs in Tabellen angegeben. Diese beinhalten mit dem f_c -Wert [mN] die bei der jeweiligen Konzentration im Organbad vorhandene Kontraktionskraft des Organs und mit dem f_c -Wert [%] die daraus resultierende prozentuelle Abnahme der Kraft. Die Ausnahme bildet logischerweise der Vorhof. Hier ist mit dem f -Wert [Hz] die Anzahl der Kontraktionen pro Minute dokumentiert. Der P-Wert gibt bei allen Präparaten die Irrtumswahrscheinlichkeit an und lässt somit die Signifikanz erkennen. Des Weiteren soll durch die zugehörigen Konzentrations-Wirkungs-Kurven eine etwaige EC_{50} aufgezeigt werden. Außerdem ist pro Präparat eine repräsentative Aufzeichnung des Schreibgeräts eingescannt worden und hier abgebildet. Bei den Präparaten Aorta descendens, Truncus pulmonalis und terminales Ileum stehen die Markierungen an der Nulllinie für die verschiedenen Messzeitpunkte bzw. die zugehörigen Konzentrationen.

3.2. Wirkung von MAH42•HCl an der Aorta descendens

Auf die vier Präparate der Aorta zeigt MAH42•HCl die geringste Wirkung. Bei der Höchstkonzentration von 100 μmol nimmt die vosokonstriktorische Kraft im Mittel um nur 29,83 % ab. Dadurch ergibt sich, wie in der Konzentrations-Wirkungskurve (Abb. 3.1.) ersichtlich, dass keine EC_{50} ermittelt werden konnte und diese größer als 100 μmol ist. Die vom Schreibgerät aufgezeichnete Kurve verdeutlicht ebenfalls die relativ geringe vasodilatorische Wirkung.

Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche	P-Wert
0 (Kontroll- wert)	$13,04 \pm 2,57$	0 ± 0	4	---
3	$12,74 \pm 2,56$	$-2,56 \pm 1,39$	4	n.s.
10	$12,19 \pm 2,69$	$-8,01 \pm 4,90$	4	n.s.
30	$10,80 \pm 2,63$	$-18,31 \pm 8,15$	4	0,05
100	$9,29 \pm 2,51$	$-29,83 \pm 9,78$	4	0,05

Tabelle 3.1.: Messergebnisse der Wirkung von MAH42•HCl auf die Präparate der Aorta descendens.
[f_c ...force of contraction; SEM...Standard Error of the Mean]

3.2.1. Konzentrations-Wirkungs-Kurve

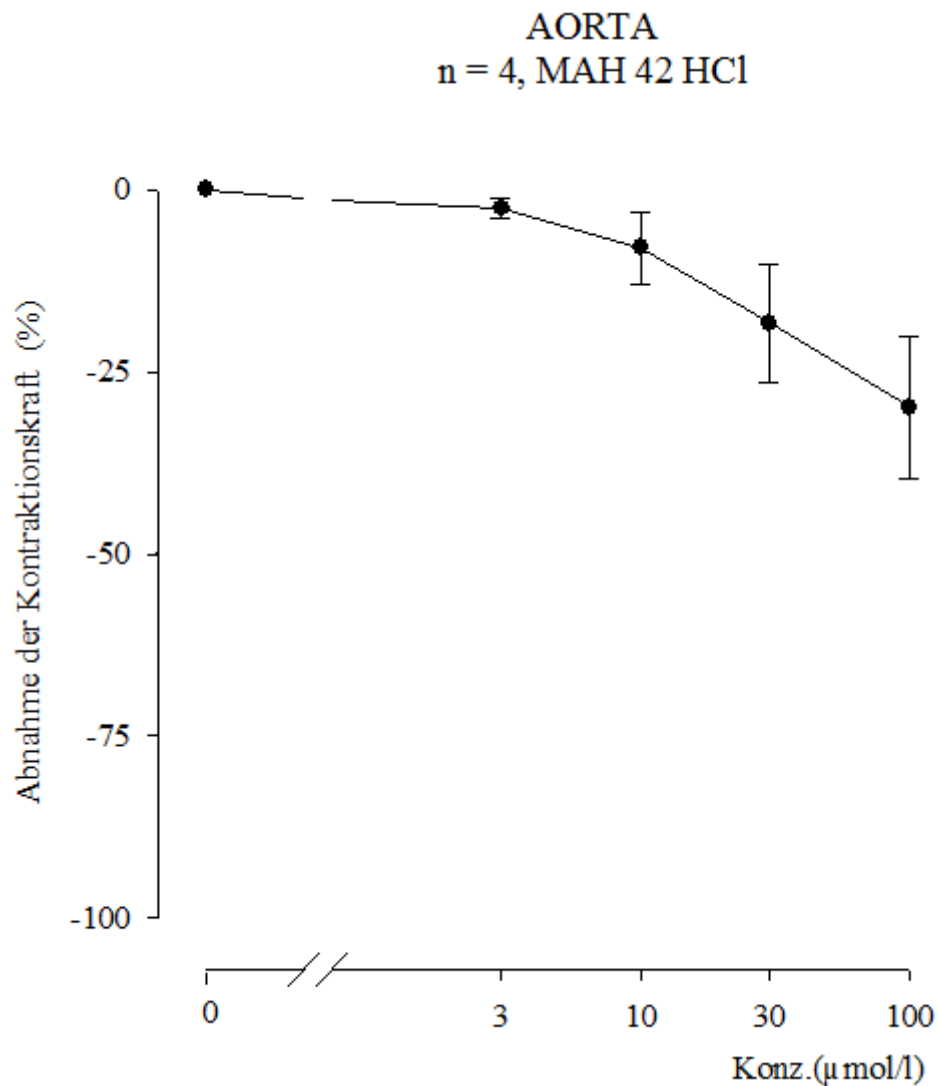


Abb. 3.1.: Gemittelte Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MAH42•HCl an den Präparaten der Aorta descendens. An der Abszisse ist semilogarithmisch die Wirkstoffkonzentration in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen. An der Ordinate ist die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent aufgetragen. Die Punkte markieren die Mittelwerte, während die Balken den Standardfehler des jeweiligen Mittelwerts angeben.

3.2.2. Kontraktionskurve

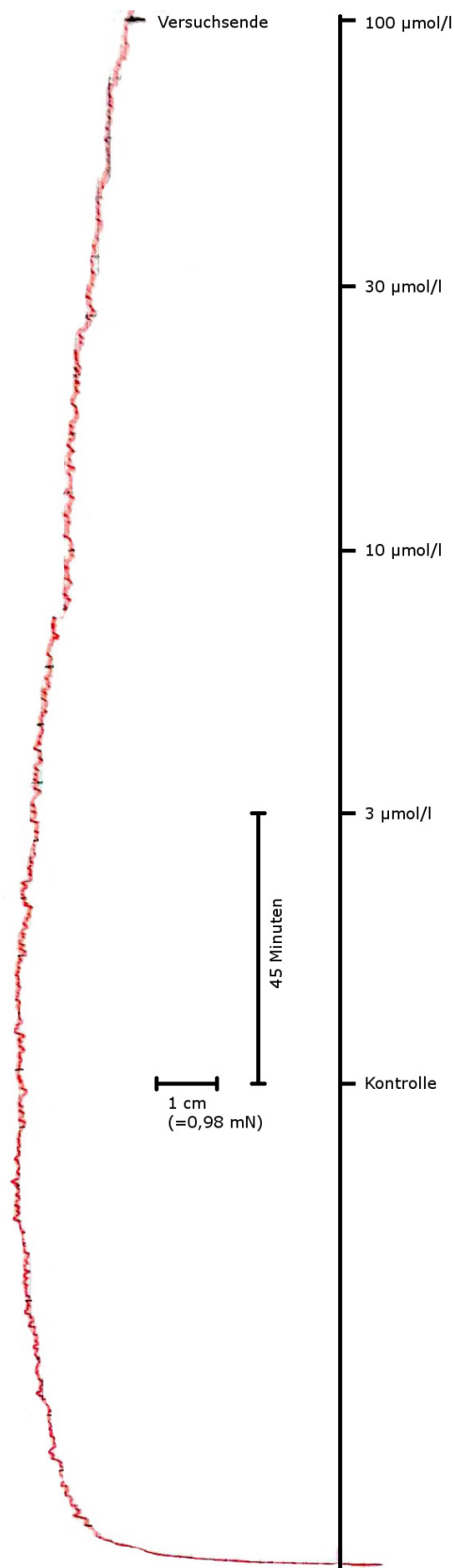


Abb. 3.2.: Vom Schreibgerät aufgezeichnete Kurve des Versuchs an der Aorta descendens vom 21.02.2012 mit digital eingefügter Nulllinie. An der Nulllinie sind die Messzeitpunkte mit der jeweiligen MAH42•HCl-Konzentration markiert.

3.3. Wirkung von MAH42•HCl am Truncus Pulmonalis

Auf die vier Präparate des Lungenstammes zeigt MAH42•HCl mehr Wirkung als auf die Aortenringe, doch ist diese ebenfalls relativ gering. Bei der Höchstkonzentration von 100 µmol nimmt die vosokonstriktorische Kraft im Mittel zwar um 51,97 % ab. Betrachtet man aber die Konzentrations-Wirkungskurve (Abb. 3.3.) wird ersichtlich, dass eine eher hohe EC₅₀ von 87 µmol/l vorliegt. Anhand der vom Schreibgerät aufgezeichneten Kurve wird ebenfalls die relativ geringe vasodilatorische Wirkung verdeutlicht.

Konzentration [µmol/l]	f _c ± SEM [mN]	f _c ± SEM [%]	Anzahl der Versuche	P-Wert
0 (Kontrollwert)	12,94 ± 1,57	0 ± 0	4	---
3	12,25 ± 1,72	-6,08 ± 3,19	4	n.s.
10	10,73 ± 1,93	-19,10 ± 7,11	4	0,05
30	8,74 ± 1,88	-35,08 ± 8,97	4	0,05
100	6,57 ± 1,73	-51,97 ± 9,66	4	0,01

Tabelle 3.2.: Messergebnisse der Wirkung von MAH42•HCl auf die Präparate des Truncus pulmonalis.
[f_c...force of contraction; SEM...Standard Error of the Mean]

3.3.1. Konzentrations-Wirkungs-Kurve

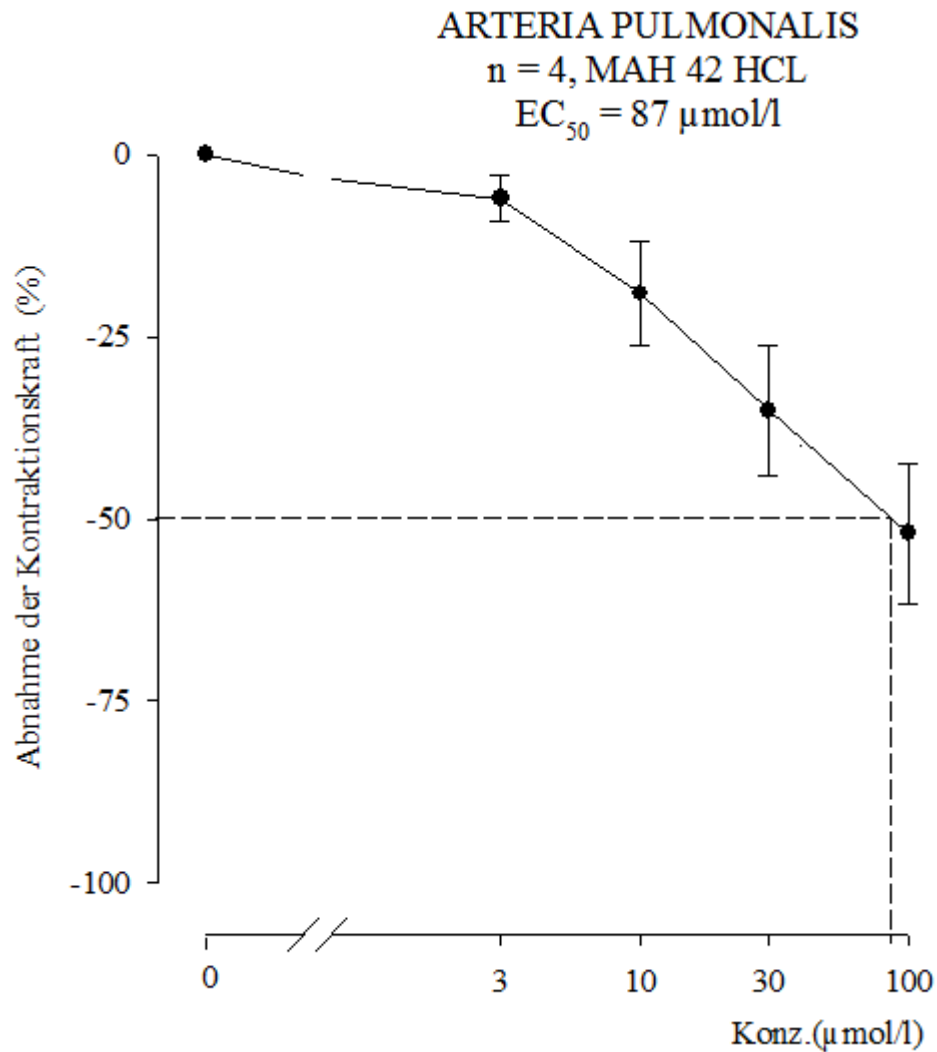


Abb. 3.3.: Gemittelte Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MAH42•HCl an den Präparaten des Truncus pulmonalis. An der Abszisse ist semilogarithmisch die Wirkstoffkonzentration in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen. An der Ordinate ist die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent aufgetragen. Die Punkte markieren die Mittelwerte, während die Balken den Standardfehler des jeweiligen Mittelwerts angeben.

3.3.2. Kontraktionskurve

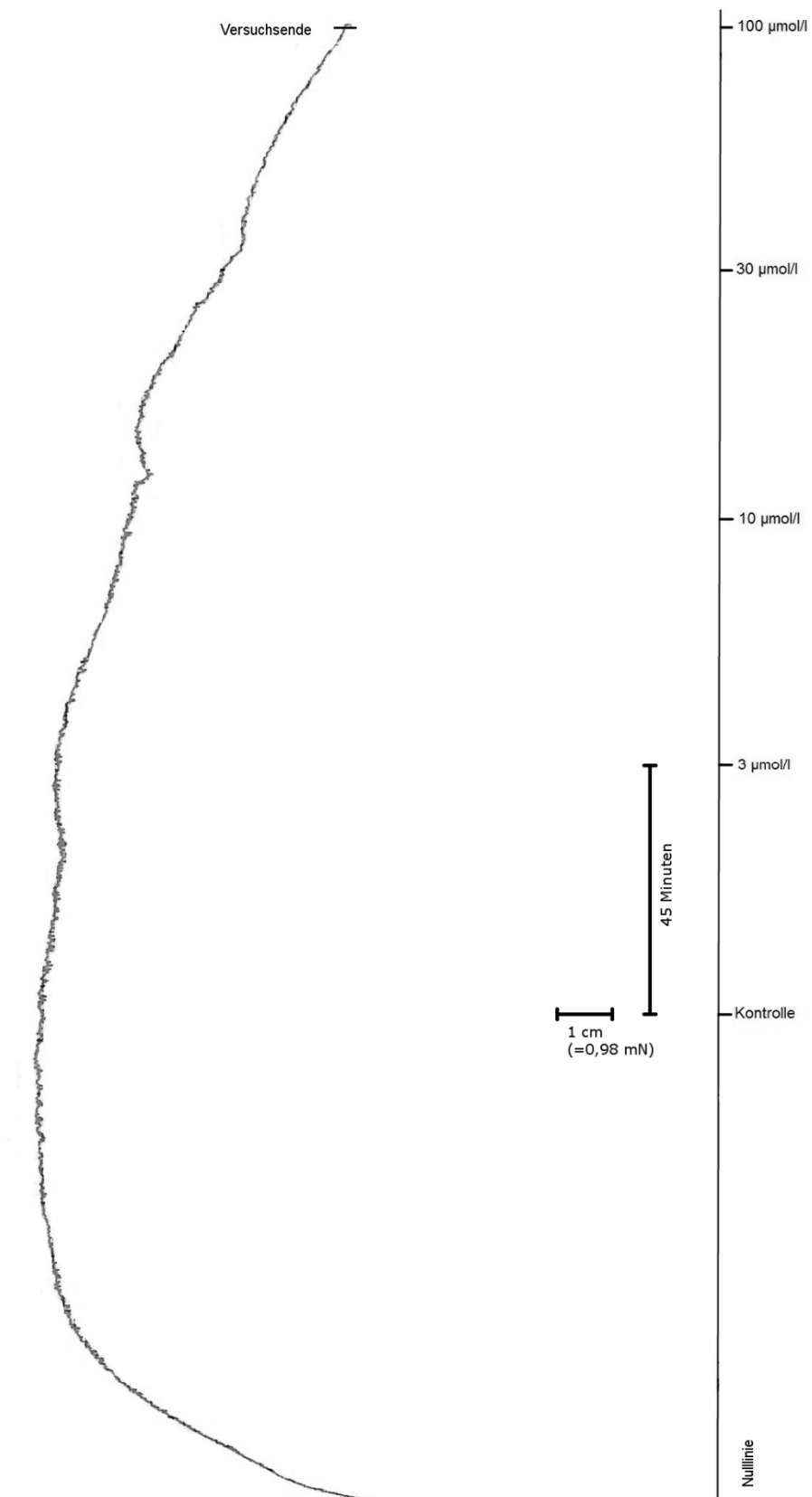


Abb. 3.4.: Vom Schreibgerät aufgezeichnete Kurve des Versuchs am Truncus pulmonalis vom 22.02.2012 mit digital eingefügter Nulllinie. An der Nulllinie sind die Messzeitpunkte mit der jeweiligen MAH42•HCl-Konzentration markiert.

3.4. Wirkung von MAH42•HCl am terminalen Ileum

Auf die fünf Präparate des Krummdarms zeigt MAH42•HCl eine ausgeprägte Wirkung. Bei der Höchstkonzentration von 100 µmol nimmt die Kontraktionskraft im Mittel um 85,76 % ab. Beim Betrachten der Konzentrations-Wirkungskurve (Abb. 3.5.) wird ersichtlich, dass eine niedrige EC₅₀ von 19,5 µmol/l vorliegt. Die vom Schreibgerät aufgezeichnete Kurve zeigt die stark ausgeprägte muskelrelaxierende Wirkung auf den Darm.

Konzentration [µmol/l]	f _c ± SEM [mN]	f _c ± SEM [%]	Anzahl der Versuche	P-Wert
0 (Kontroll- wert)	10,39 ± 1,03	0 ± 0	5	---
3	8,72 ± 1,36	-17,56 ± 4,40	5	0,05
10	6,80 ± 1,54	-27,11 ± 7,10	5	0,05
30	3,94 ± 1,37	-64,95 ± 8,40	5	0,01
100	1,74 ± 1,06	-85,76 ± 7,47	5	0,001

Tabelle 3.3.: Messergebnisse der Wirkung von MAH42•HCl auf die Präparate desterminalen Ileums.
[f_c...force of contraction; SEM...Standard Error of the Mean]

3.4.1. Konzentrations-Wirkungs-Kurve

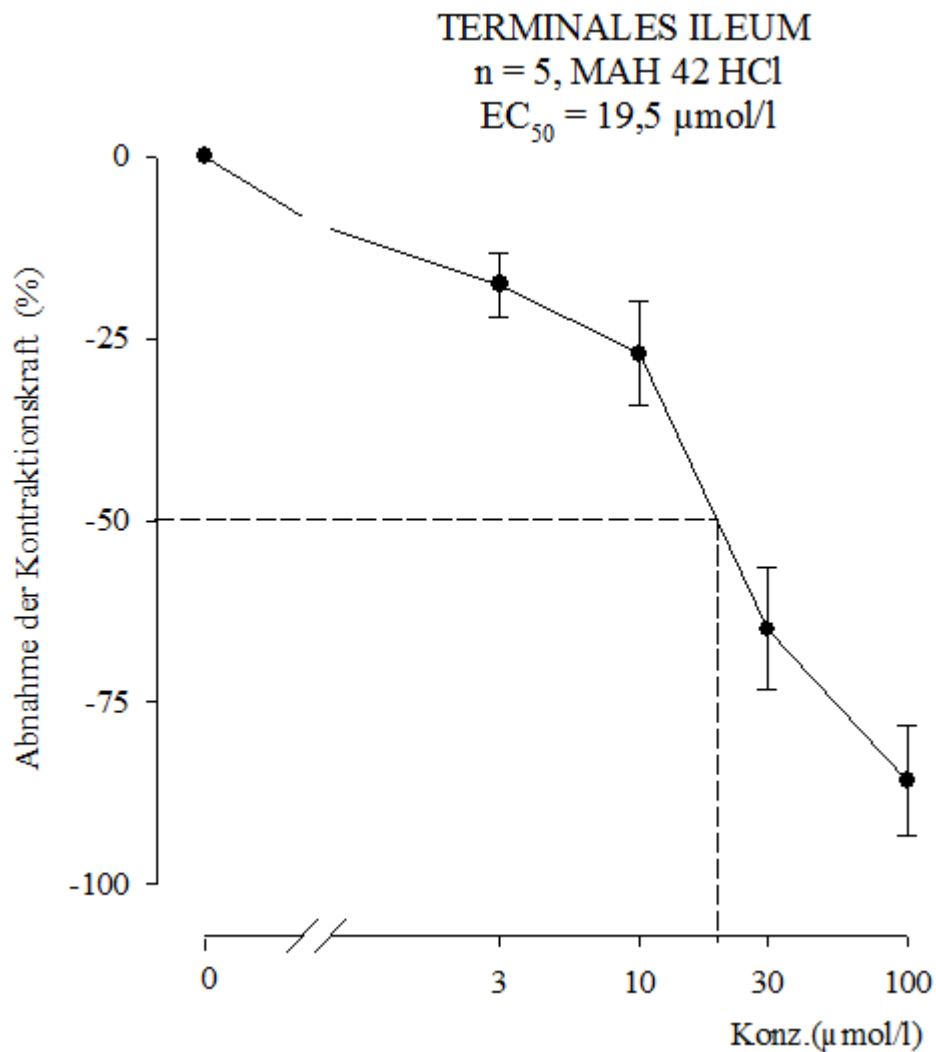


Abb. 3.5.: Gemittelte Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MAH42•HCl an den Präparaten des terminalen Ileums. An der Abszisse ist semilogarithmisch die Wirkstoffkonzentration in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen. An der Ordinate ist die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent aufgetragen. Die Punkte markieren die Mittelwerte, während die Balken den Standardfehler des jeweiligen Mittelwerts angeben.

3.4.2. Kontraktionskurve

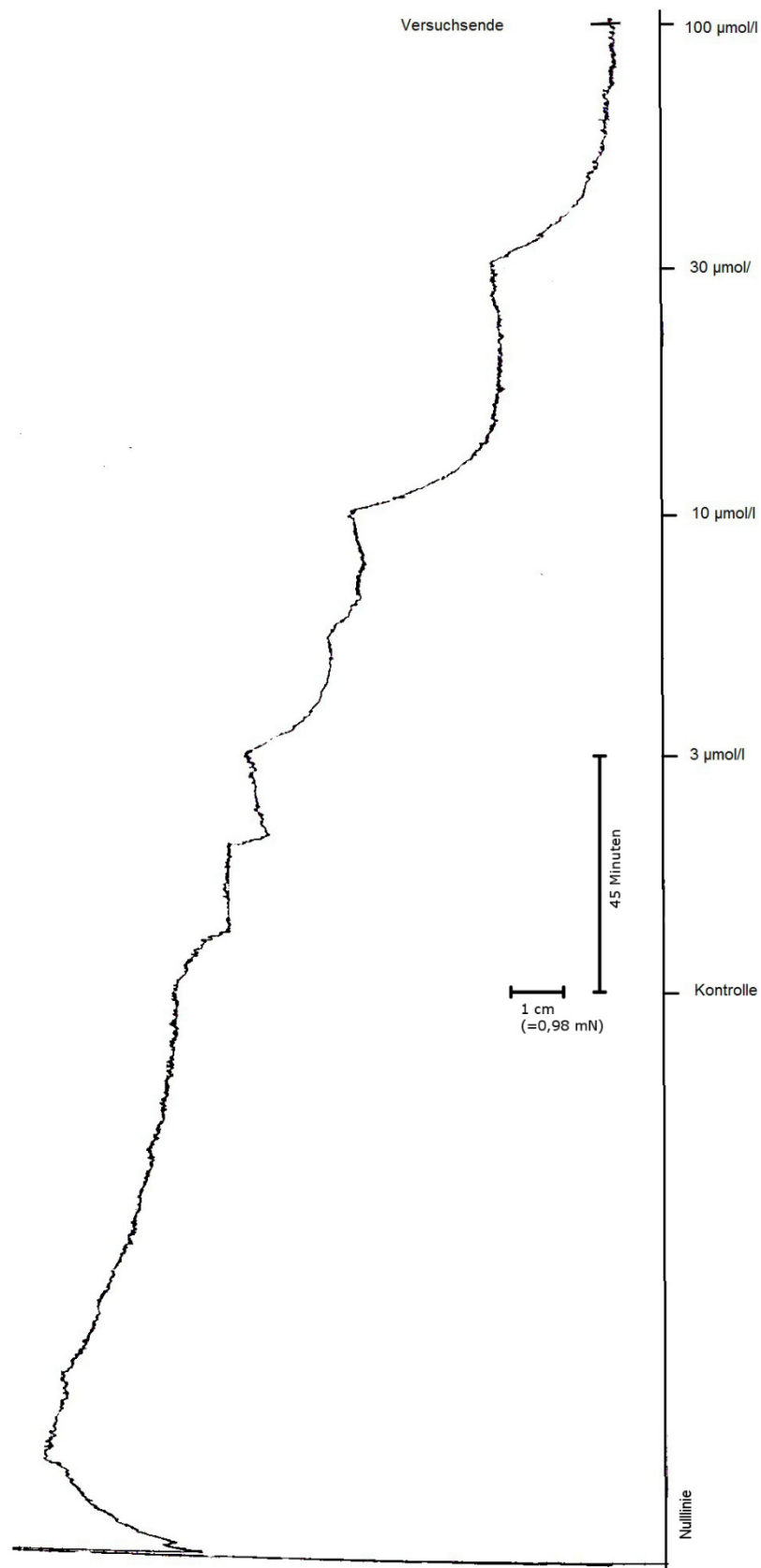


Abb. 3.6.: Vom Schreibgerät aufgezeichnete Kurve des Versuchs am terminalen Ileum vom 17.04.2012 mit digital eingefügter Nulllinie. An der Nulllinie sind die Messzeitpunkte mit der jeweiligen MAH42•HCl-Konzentration markiert.

3.5. Wirkung von MAH42•HCl am Musculus papillaris

Auf die vier Präparate des Papillarmuskels zeigt MAH42•HCl die stärkste Wirkung. Bei der Höchstkonzentration von 100 µmol nimmt die Kontraktionskraft im Mittel um 91,19 % ab. Die Konzentrations-Wirkungskurve (Abb. 3.7.) zeigt, dass eine sehr niedrige EC₅₀ von 7,35 µmol/l vorliegt. Die vom Schreibgerät aufgezeichneten Kurven verdeutlichen die stark ausgeprägte muskelrelaxierende Wirkung auf den Papillarmuskel.

Konzentration [µmol/l]	f _c ± SEM [mN]	f _c ± SEM [%]	Anzahl der Versuche	P-Wert
0 (Kontrollwert)	1,56 ± 0,25	0 ± 0	4	---
3	1,07 ± 0,12	-29,28 ± 4,36	4	0,05
10	0,67 ± 0,15	-56,61 ± 8,61	4	0,01
30	0,30 ± 0,05	-78,48 ± 4,85	4	0,001
100	0,13 ± 0,03	-91,19 ± 1,96	4	0,001

Tabelle 3.4.: Messergebnisse der Wirkung von MAH42•HCl auf die Präparate der Aorta descendens.
[f_c...force of contraction; SEM...Standard Error of the Mean]

3.5.1. Konzentrations-Wirkungs-Kurve

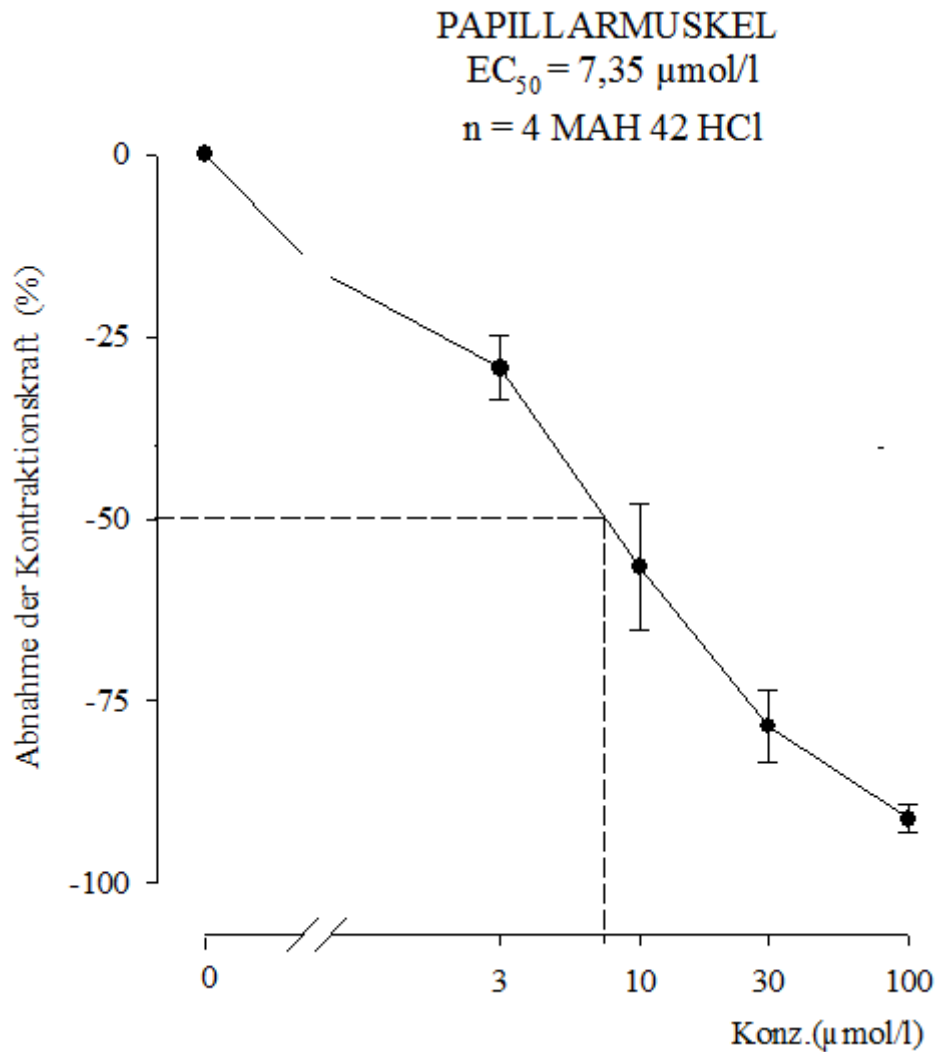


Abb. 3.7.: Gemittelte Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MAH42•HCl an den Präparaten des Papillarmuskels. An der Abszisse ist semilogarithmisch die Wirkstoffkonzentration in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen. An der Ordinate ist die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent aufgetragen. Die Punkte markieren die Mittelwerte, während die Balken den Standardfehler des jeweiligen Mittelwerts angeben.

3.5.2. Kontraktionskurven

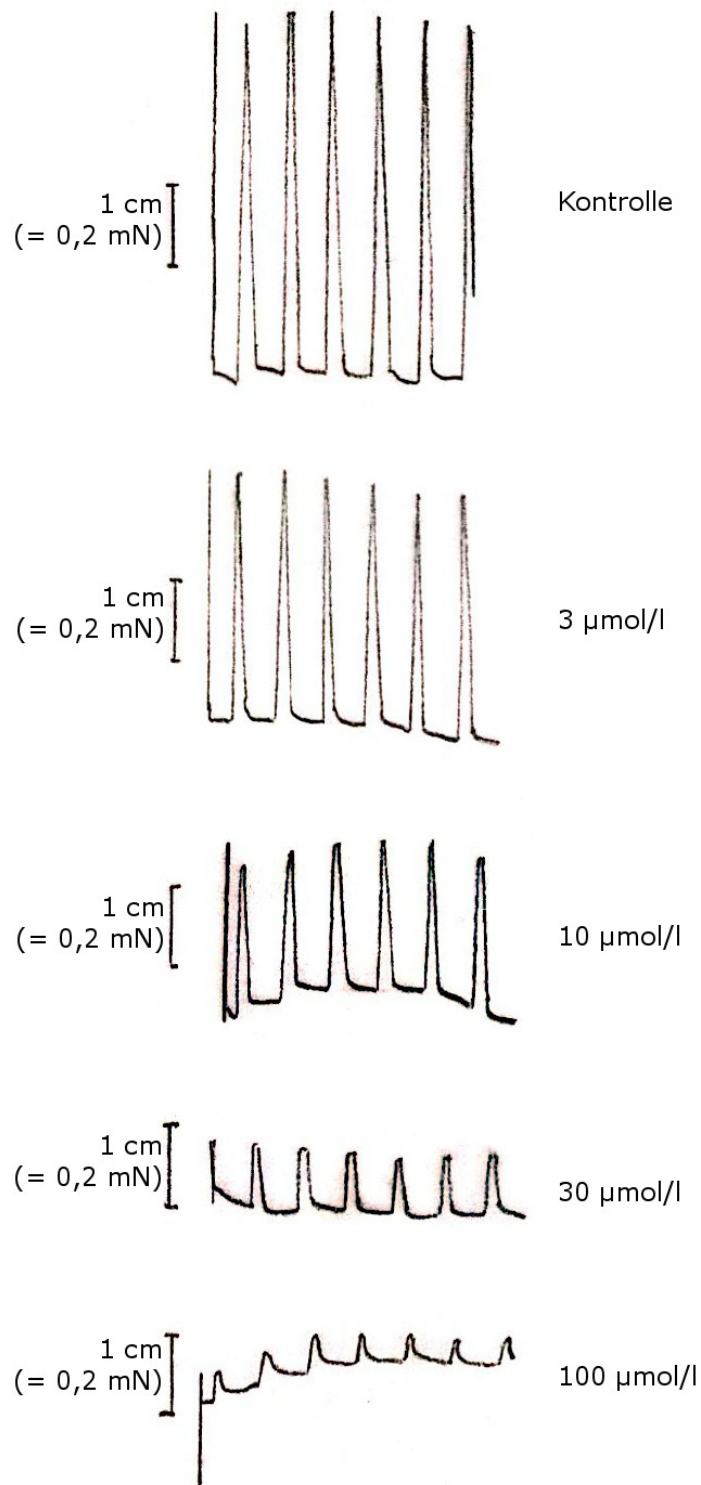


Abb. 3.8.: Vom Schreibgerät aufgezeichnete Kurven des Versuchs am Musculus papillaris vom 17.04.2012. Die einzelnen Kurven sind mit der jeweiligen MAH42•HCl-Konzentration markiert. Da bei einer Sensibilitätseinstellung des Schreibgeräts von 1 mV aufgezeichnet wurde, entspricht 1 cm Auslenkung einer Kraftänderung von 0,2 mN.

3.6. Wirkung von MAH42•HCl am Atrium dextrum

Auf die drei Präparate des Vorhofes zeigt MAH42•HCl eine ausgeprägte Wirkung. Bei der Höchstkonzentration von 100 µmol nimmt die Schlagfrequenz bei allen Versuchen gar um 100 % ab. Die Konzentrations-Wirkungskurve (Abb. 3.9.) zeigt allerdings, dass mit 40,8 µmol/l eine dafür doch recht hohe EC₅₀ vorliegt. Die vom Schreibgerät aufgetragenen Kurven veranschaulichen die negativ chronotrope Wirkung auf den Vorhof.

Konzentration [µmol/l]	f ± SEM [Hz]	f ± SEM [%]	Anzahl der Versuche	P-Wert
0 (Kontrollwert)	206,67 ± 3,33	0 ± 0	3	---
3	196,67 ± 3,33	-4,87 ± 0,07	3	n.s
10	163,33 ± 9,28	-11,37 ± 3,16	3	0,05
30	140 ± 12,85	-32,43 ± 5,08	3	0,05
100	0 ± 0	-100 ± 0	3	0,001

Tabelle 3.5.: Messergebnisse der Wirkung von MAH42•HCl auf die Präparate der Aorta descendens.
[f...frequency; SEM...Standard Error of the Mean]

3.6.1. Konzentrations-Wirkungs-Kurve

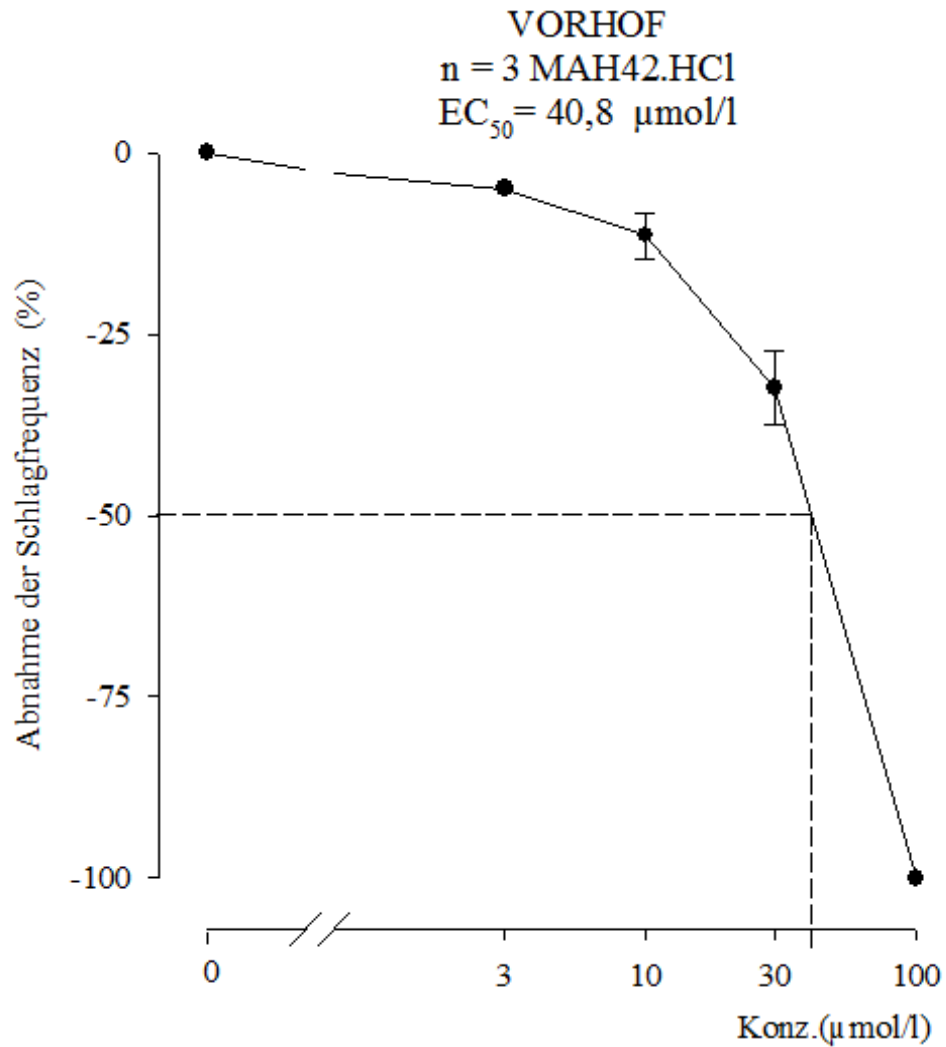


Abb. 3.9.: Gemittelte Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MAH42•HCl an den Präparaten des Vorhofes. An der Abszisse ist semilogarithmisch die Wirkstoffkonzentration in µmol/l aufgetragen. An der Ordinate ist die Änderung der Schlagfrequenz in Prozent aufgetragen. Die Punkte markieren die Mittelwerte, während die Balken den Standardfehler des jeweiligen Mittelwerts angeben.

3.6.2. Kontraktionskurven

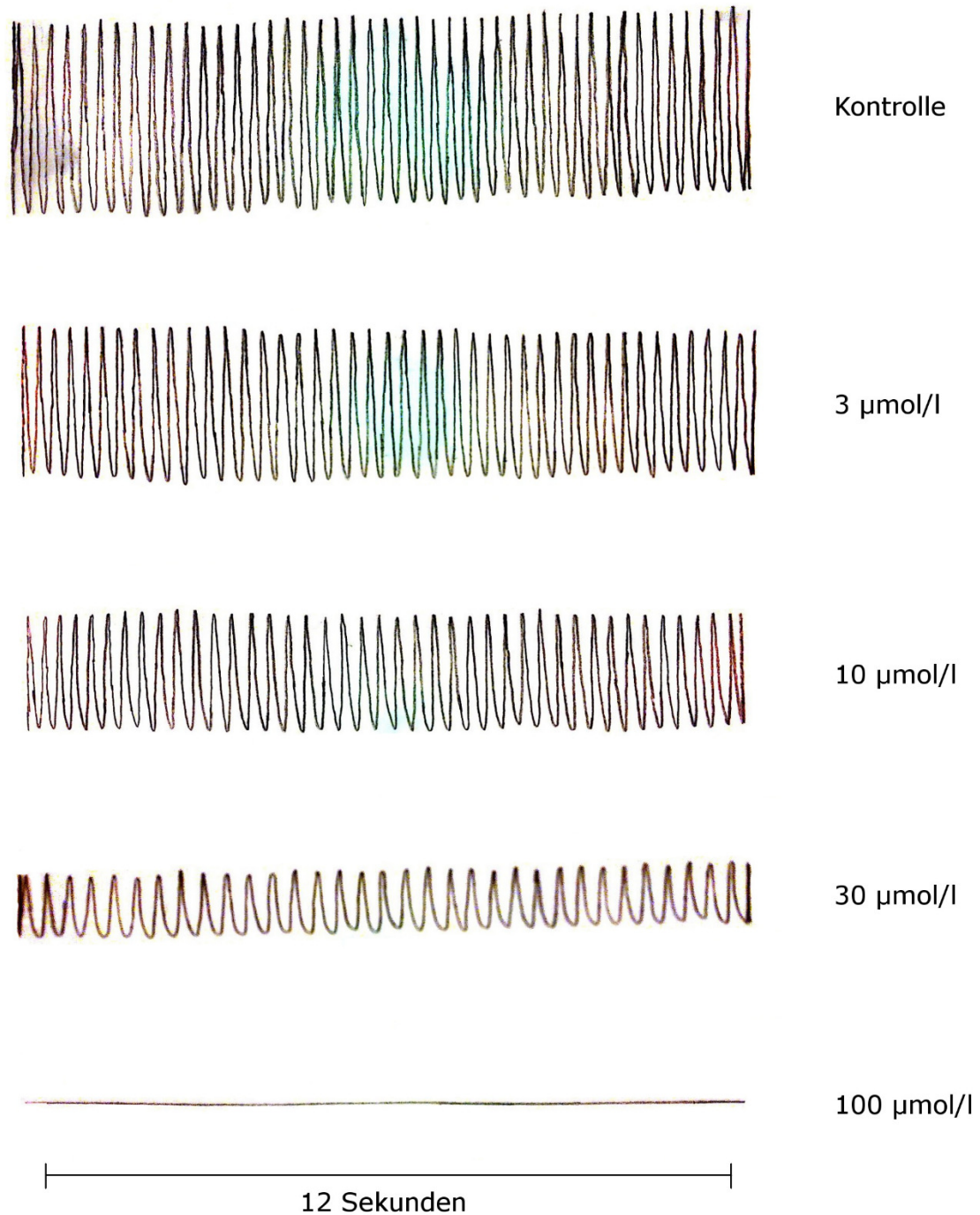


Abb. 3.10.: Vom Schreibgerät aufgezeichnete Kurven des Versuchs am Atrium dextrum vom 14.02.2012. Die einzelnen Kurven sind mit der jeweiligen MAH42·HCl-Konzentration markiert. Gemessen wurde 12 Sekunden lang und die Anzahl der Schläge mal 5 multipliziert, um auf Schläge pro Minute zu kommen.

3.7. Ergebnisse der Versuchsreihen zur Untersuchung des Wirkmechanismus

Zwar zeigt MAH42•HCl am Papillarmuskel vor allem in Bezug auf die EC_{50} die größte Wirkung, allerdings liegt der Fokus auf einem Effekt auf die glatte Muskulatur. Da mit einer EC_{50} von 19,5 $\mu\text{mol/l}$ die Wirkung auf das terminale Ileum ebenfalls sehr stark ist, werden die Versuche, anhand derer eine Aussage über den postulierten Wirkmechanismus getroffen werden kann, an diesem Präparat durchgeführt.

Es kommt sowohl in der Versuchsreihe mit einer Glibenclamid-Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$, als auch in der Versuchsreihe mit einer Glibenclamid-Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ nach der Einstellung der EC_{50} (19,5 $\mu\text{mol/l}$) von MAH42•HCl im Organbad trotz Blockade der ATP-sensitiven Kaliumkanäle zu einer mehr als deutlichen muskelrelaxierenden Wirkung. Bei einer Glibenclamid-Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ sinkt die durchschnittliche Kontraktionskraft von 6,86 mN auf 1,50 mN. Bei einer Glibenclamidkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ sinkt sie von 6,30 mN auf 0,88 mN. Die hier statt Konzentrations-Wirkungskurven abgebildeten Balkendiagramme und die eingescannten Aufzeichnungen des Schreibgerätes sollen diese Wirkung noch einmal verdeutlichen.

Zugegebene Substanz	$f_c \pm \text{SEM}$ [Hz]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche	P-Wert
Keine (Kontrollwert)	$8,59 \pm 0,62$	0 ± 0	3	---
Glibenclamid (30 $\mu\text{mol/l}$)	$6,86 \pm 0,78$	$-21,57 \pm 5,39$	3	---
MAH42•HCl (20 $\mu\text{mol/l}$)	$1,50 \pm 0,79$	$-83,66 \pm 7,99$	3	0,05

Tabelle 3.6.: Messergebnisse Versuchsreihe am terminalen Ileum bezüglich des Wirkmechanismus mit einer Glibenclamid-Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$.

[f_c ...force of contraction; SEM...Standard Error of the Mean]

Zugegebene Substanz	$f_c \pm \text{SEM}$ [Hz]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Anzahl der Versuche	P-Wert
Keine (Kontrollwert)	$9,76 \pm 1,16$	0 ± 0	3	---
Glibenclamid (30 $\mu\text{mol/l}$)	$6,30 \pm 1,22$	$-36,58 \pm 5,29$	3	---
MAH42•HCl (20 $\mu\text{mol/l}$)	$0,88 \pm 0,57$	$-91,25 \pm 4,94$	3	0,05

Tabelle 3.7.: Messergebnisse Versuchsreihe am terminalen Ileum bezüglich des Wirkmechanismus mit einer Glibenclamid-Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$.

[f_c ...force of contraction; SEM...Standard Error of the Mean]

3.7.1. Balkendiagramm der Kontraktionskraft (Glibenclamid 30 $\mu\text{mol/l}$)

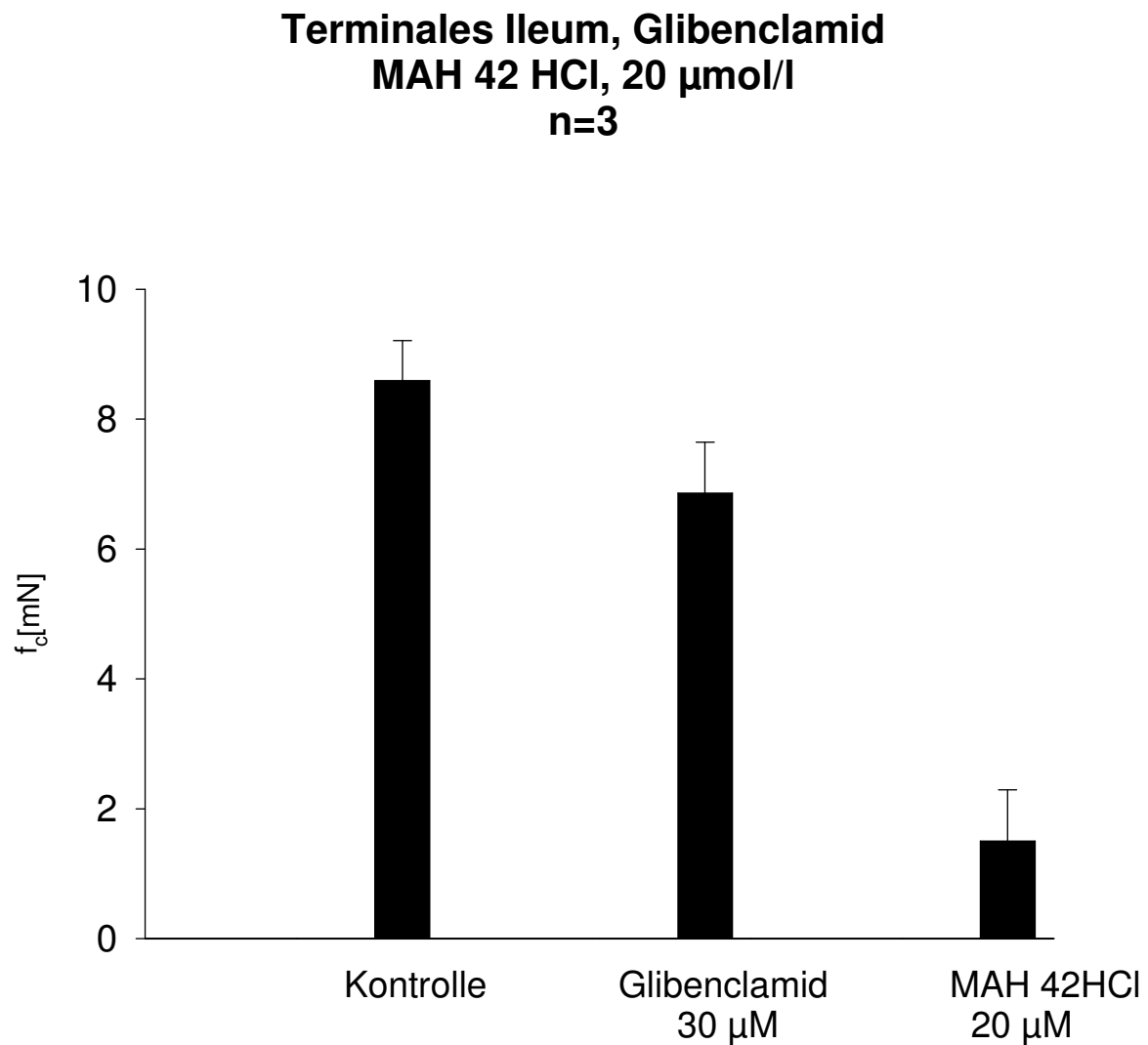


Abb. 3.11.: Durchschnittliche Kontraktionskraft der Präparate des terminalen Ileums unter Einwirkung von Glibenclamid (30 $\mu\text{mol/l}$) und MAH42•HCl (20 $\mu\text{mol/l}$).
[f_c ...force of contraction]

3.7.2. Balkendiagramm der Kontraktionskraft (Glibenclamid 100 $\mu\text{mol/l}$)

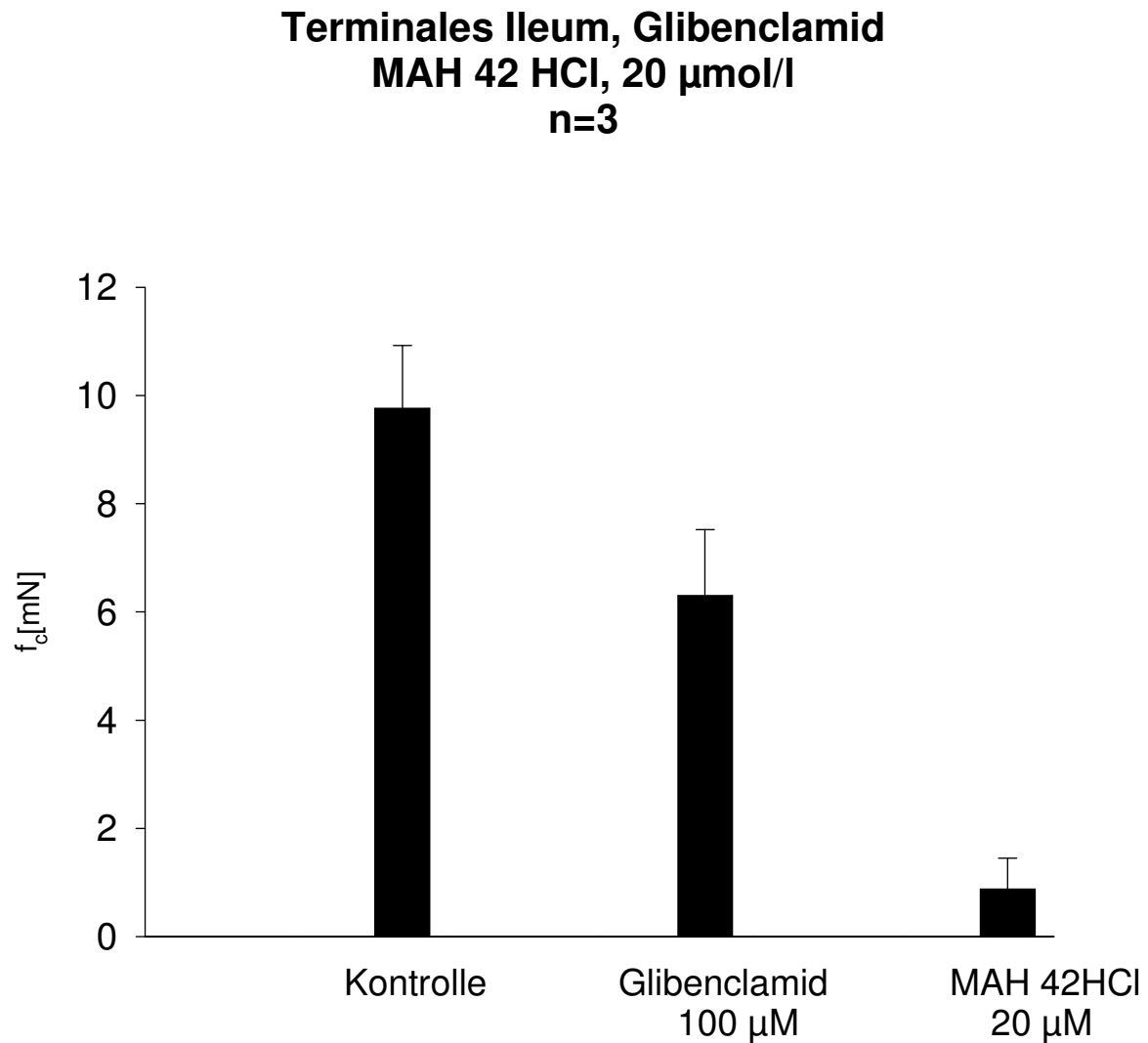


Abb. 3.12.: Durchschnittliche Kontraktionskraft der Präparate des terminalen Ileums unter Einwirkung von Glibenclamid (100 $\mu\text{mol/l}$) und MAH42•HCl (20 $\mu\text{mol/l}$).
[f_c ...force of contraction]

3.7.3. Kontraktionskurve (Glibenclamid 30 $\mu\text{mol/l}$)

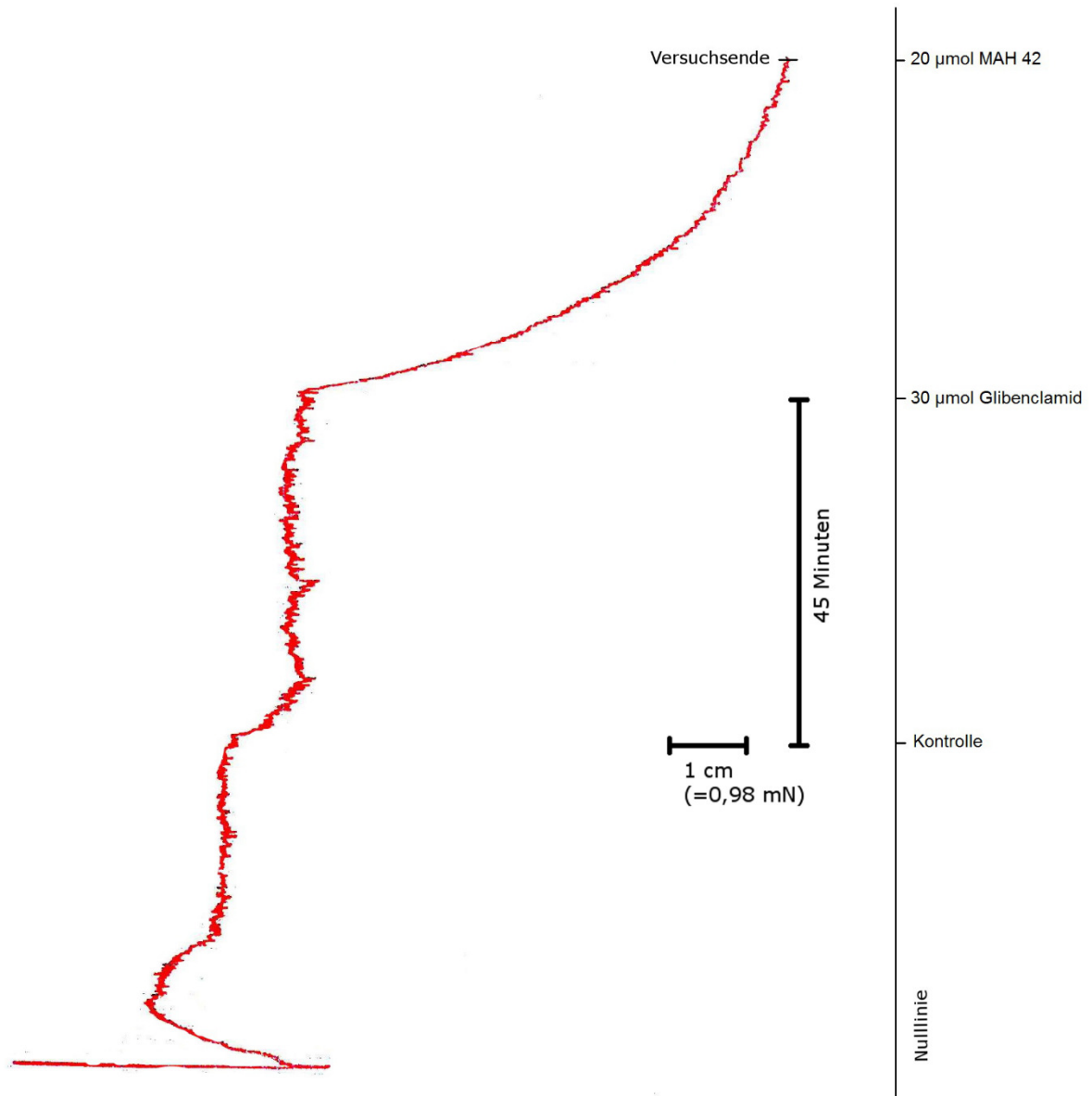


Abb. 3.13.: Vom Schreibgerät aufgezeichnete Kurve des Versuchs zur Untersuchung des Wirkmechanismus am terminalen Ileum vom 03.05.2012 mit digital eingefügter Nulllinie. An der Nulllinie sind die Messzeitpunkte mit der jeweiligen Glibenclamid- bzw. MAH42•HCl-Konzentration markiert.

3.7.4. Kontraktionskurve (Glibenclamid 100 $\mu\text{mol/l}$)

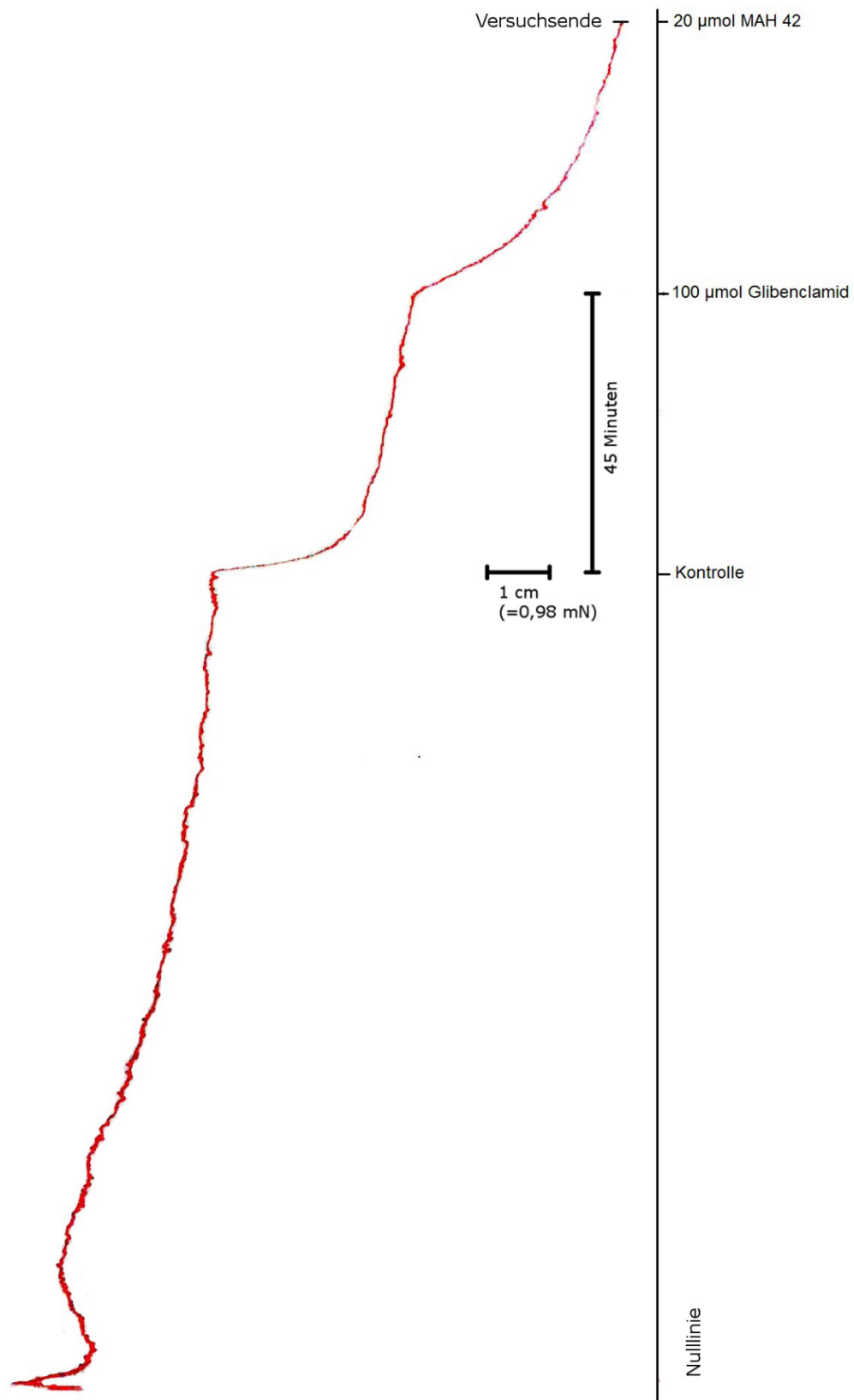


Abb. 3.14.: Vom Schreibgerät aufgezeichnete Kurve des Versuchs zur Untersuchung des Wirkmechanismus am terminalen Ileum vom 08.05.2012 mit digital eingefügter Nulllinie. An der Nulllinie sind die Messzeitpunkte mit der jeweiligen Glibenclamid- bzw. MAH42•HCl-Konzentration markiert.

4. Diskussion

4.1. Beurteilung der Daten

Das Ziel war es, die Testsubstanz MAH42•HCl vor allem auf ihre Wirkung auf die glatte Muskulatur, also auf die Präparate der Aorta descendens, des Truncus pulmonalis und des terminalen Ileums, aber auch auf die chrono- und inotrope Wirkung (Atrium dextrum und Musculus papillaris) zu untersuchen. Alle Ergebnisse sind signifikant und reproduzierbar. Die Substanz zeigt auf alle Organe eine Wirkung. Es kommt sogar bei allen Präparat-Typen, mit Ausnahme der Aorta descendens, zu mehr als 50 % der möglichen Wirkung. Und selbst bei der Hauptschlagader ist mit knapp 30 % ein Effekt zu erkennen. Abgesehen von der Aorta konnte auch bei allen anderen Präparaten eine EC_{50} graphisch ermittelt werden, die somit unter 100 $\mu\text{mol/l}$ liegt. Diese ist am terminalen Ileum mit 19,5 $\mu\text{mol/l}$ und vor allem am Papillarmuskel mit 7,35 $\mu\text{mol/l}$ relativ gering, was in Hinblick auf eine therapeutische Verwendung wünschenswert wäre. Bei den Ergebnissen vom rechten Vorhof fällt auf, dass zwar eine starke Wirkung vorhanden ist. Allerdings setzt diese nicht gleich ein, sondern ist erst bei höheren Konzentrationen der Testsubstanz (ab 30 $\mu\text{mol/l}$) ausgeprägt. Das schlägt sich in einer zu Beginn recht flachen und erst später steil abfallenden Konzentrations-Wirkungskurve nieder. Ähnlich, aber nicht ganz so ausgeprägt, verhält es sich beim terminalen Ileum. Hier verläuft die Konzentrations-Wirkungskurve ebenfalls zuerst relativ flach, um erst ab einer Konzentration der Testsubstanz von 30 $\mu\text{mol/l}$ steiler abzufallen. Insgesamt zeigt sich bei der glatten Muskulatur der Blutgefäße wenig Wirkung. Hingegen kommt es beim gleichen Muskeltyp des Darms zu einer, wie erwähnt, sehr starken Wirkung. Zusätzlich wirkt MAH42•HCl auch auf die Muskulatur des Herzens am stärksten.

Organpräparat	f_c (%) bzw. f (%) $\pm$ SEM bei einer MAH42•HCl- Konz. von 100 $\mu\text{mol/l}$	EC_{50} (MAH42•HCl)
Aorta descendens	-29,83 $\pm$ 9,78	> 100 $\mu\text{mol/l}$
Truncus pulmonalis	-51,97 $\pm$ 9,66	87 $\mu\text{mol/l}$
terminales Ileum	-85,76 $\pm$ 7,47	19,5 $\mu\text{mol/l}$
Muskulus papillaris	-91,19 $\pm$ 1,96	7,35 $\mu\text{mol/l}$
Atrium dextrum	-100 $\pm$ 0	40,8 $\mu\text{mol/l}$

Tabelle 4.1.: Prozentuelle Abnahme von f_c bzw. f (inklusive Standardfehler des Mittelwerts) bei einer Konzentration der Testsubstanz von 100 $\mu\text{mol/l}$ und EC_{50} am jeweiligen Organpräparat.

[f_c ...force of contraction; f ...frequency; SEM...Standard Error of the Mean]

4.2. Wirkmechanismus

Der angenommene Wirkmechanismus – das Öffnen von ATP-sensitiven Kaliumkanälen – kann auf Grund der Ergebnisse der Versuchsreihen zur Bestätigung des Wirkmechanismus annähernd zur Gänze ausgeschlossen werden. Auf jeden Fall ist die Beteiligung der ATP-sensitiven Kaliumkanäle wenn überhaupt vorhanden, dann so gering, dass sie außer Acht gelassen werden kann. Diese Behauptung beruht auf folgendem Umstand: Nachdem die ATP-sensitiven Kaliumkanäle mit Glibenclamid irreversibel blockiert wurden, und zwar sowohl bei einer Konzentration von $30\mu\text{mol/l}$, als auch bei einer Konzentration von $100\mu\text{mol/l}$, kommt es trotzdem zu einer starken Wirkung durch MAH42•HCl. Diese kann somit nicht über ein Öffnen der ATP-abhängigen Kaliumkanäle zustande kommen, da diese ja blockiert waren. Somit kommen etliche andere Wirkmechanismen in Frage, an dem von der Testsubstanz MAH42•HCl verursachten Effekt beteiligt zu sein. Dazu zählen die Blockade von α -Adrenorezeptoren, die Blockade von Serotoninrezeptoren, eine histaminerge Wirkung, eine kalziumantagonistische Wirkung und etliche andere. Auch ein unbekannter Wirkmechanismus ist selbstverständlich denkbar (Aktories et al. 2009).

4.3. Anwendungspotential

In Bezug auf eine gefäßerweiternde Wirkung und damit auf eine Therapie von arterieller bzw. pulmonaler arterieller Hypertonie hat die Testsubstanz kaum Potential. Der Grund hierfür ist, dass abgesehen davon, dass der Effekt auf die beiden Blutgefäße mit einer EC_{50} von $>100 \mu\text{mol/l}$ (Aorta descendens) und $87 \mu\text{mol/l}$ (Truncus pulmonalis) relativ gering ausgeprägt ist, keine organspezifische Wirkung vorliegt. Somit würde man zum einen bei der Therapie der arteriellen Hypertonie auch den Blutdruck im Lungenkreislauf und bei der Therapie der pulmonalen arteriellen Hypertonie ebenfalls den systemischen Blutdruck senken. Zum anderen würden auf Grund des negativ chronotropen und des stark negativ inotropen Effekts gravierende Nebenwirkungen am Herzen auftreten. Nicht zuletzt würde es auch wegen der Muskelrelaxierung am Darm zu schweren Nebenwirkungen im Gastrointestinaltrakt kommen.

Die ausgeprägte Wirkung auf den Papillarmuskel lässt an den Einsatz der Substanz in der Bluthochdrucktherapie ähnlich den Betablockern denken. Diese wirken ebenfalls negativ inotrop aber auch negativ dromotrop. Doch auch dies ist auf Grund der fehlenden Organspezifität nicht denkbar.

Aus dem gleichen Grund ist der Einsatz von MAH42•HCl, trotz des starken spasmolytischen Effekts auf das terminale Ileum, bei Durchfallerkrankungen oder Koliken ausgeschlossen. Nebenwirkungen im Bereich der Gefäßerweiterung und schwere Nebenwirkungen am Herzen wären vorprogrammiert.

Somit weist MAH42•HCl, ganz abgesehen von seinen nicht bekannten Auswirkungen auf verschiedenste Parameter wie zum Beispiel Bioverfügbarkeit oder gar Toxizität, keine Eignung zur therapeutischen Anwendung auf.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Testsubstanz MAH42•HCl auf ihre Wirkung auf isolierte Organe von Meerschweinchen bezüglich eines vasodilatierenden, eines spasmolytischen, eines inotropen als auch eines chronotropen Effekts untersucht. Die dafür notwendigen isometrischen Kontraktionsmessungen wurden an Präparaten der Hauptschlagader, der Pulmonalarterie, des Dünndarms, des Papillarmuskels und des Vorhofes durchgeführt. Diese wurden unter physiologischen Bedingungen in Organbäder, welche mit einer Nährlösung gefüllt waren, eingebracht. Durch kumulative Wirkstoffzugabe wurden verschiedene Konzentrationen (3 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 100 $\mu\text{mol/l}$) der Testsubstanz erreicht und die jeweilige Veränderung der verschiedenen Parameter aufgezeichnet. Die Versuche bezüglich Vasodilatation fanden an den Präparaten der Aorta descendens und am Truncus pulmonalis statt. Am terminalen Ileum wurde die spasmolytische Wirkung untersucht. Und während für die Tests bezüglich Chronotropie Präparate des Atrium dextrum verwendet wurden, untersuchte man im Hinblick auf eine inotrope Wirkung Präparate des Musculus papillaris.

Ziel war es, diese Effekte zu dokumentieren, eine etwaige organspezifische Wirkung aufzudecken und den vermuteten Wirkmechanismus zu bestätigen oder auszuschließen.

MAH42•HCl zeigte an allen Organpräparaten eine teils deutliche Wirkung. Der spasmolytische Effekt auf den Dünndarm und vor allem die negativ inotrope Wirkung auf das Herz sind besonders hervorzuheben. Der Effekt am terminalen Ileum und noch mehr am Atrium dextrum, bei dem es zu einer hundertprozentigen Wirkung (also zu einer kompletten Einstellung der Spontanaktivität) kommt, setzt allerdings nicht gleich bei der ersten im Organbad eingestellten Wirkstoffkonzentration (3 $\mu\text{mol/l}$) ein, sondern ist erst bei höheren Konzentrationen (ab 30 $\mu\text{mol/l}$) zu erkennen. Die negativ inotrope Wirkung am Musculus papillaris setzt gleichmäßig ab der ersten Wirkstoffzugabe ein. Hier kommt es, wenn auch nicht zu einer hundertprozentigen Wirkung, mit 7,35 $\mu\text{mol/l}$ aber jedenfalls zur niedrigsten EC_{50} .

Der vermutete Wirkmechanismus - das Öffnen von ATP-sensitiven Kaliumkanälen - konnte anhand mehrerer Versuchsreihen nicht bestätigt und sogar mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Bei den diesbezüglichen Versuchsreihen wurden am terminalen Ileum eben jene Kaliumkanäle mittels 30 bzw. 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid blockiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 20 μl der Lösung der Testsubstanz (entspricht annähernd der EC_{50}). Es kam zu einer signifikanten Abnahme der Kontraktionskraft und somit kann nicht von einer Beteiligung der ATP-sensitiven Kaliumkanäle ausgegangen werden.

Auf Grund einer recht breiten Wirkung auf alle Organpräparate und somit fehlender Organspezifität konnte der Testsubstanz MAH42•HCl kein Potential für eine therapeutische Anwendung zugeschrieben werden.

6. Literaturverzeichnis

Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (2009): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10 überarbeitete Auflage. Urban & Fischer-Verlag München

Eddahibi S, Morrell N, d'Ortho MP, Naeije R, Adnot S (2002) Pathobiology of pulmonary arterial hypertension. Eur Resp J 20: 1559-1572

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

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

Pries A R, Tortora G J, Derrickson B H (2008) Anatomie und Physiologie. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

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

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

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

7. Curriculum vitae

Zur Person

Name	Matthias LALICS
Geboren am	15.02.1983
Wohnhaft in	Wien

Schul Ausbildung

1989-1991	Volksschule Stollhof
1991-1993	Volksschule Baumkirchnerring, Wiener Neustadt
1993-2001	Bundesgymnasium Babenbergerring, Wiener Neustadt
2001	Matura

Studium

2002-2003	Diplomstudium der Internationalen Betriebswirtschaftslehre an der WU Wien
2004-2005	Diplomstudium der Biologie an der Universität Wien
seit 2005	Diplomstudium der Pharmazie an der Universität Wien

Berufspraxis

seit 2004 Ordination Dr. Rupert Lalic, Hietzinger Hauptstasse 7,
1130 Wien

Funktion geringfügig Angestellter

seit 2012 Universität Wien, Department für Pharmakologie und
Toxikologie

Funftion Tutor im Praktikum „Erste Hilfe“