



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Biologische Aktivität eines neu synthetisierten Triazol-Derivats (MGtr3) an isolierten Organen von Meerschweinchen“

verfasst von

Hatice Kaplan

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreut von:

Ao. Univ.-Prof. Christian Studenik

**Gegenüber der Fähigkeit, die Arbeit eines einzigen
Tagessinnvoll zu ordnen, ist alles andere im Leben ein
Kinderspiel.**

Johann Wolfgang von Goethe

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinen lieben Eltern danken, die während meines Studiums an meiner Seite gestanden sind, mich sowohl finanziell als auch moralisch unterstützt haben und mir den Rücken gestärkt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Schwester Sermin und meinem Schwager Murat, die mich stets durch ihre positive Zusprachen motiviert haben.

Ein riesengroßes Dankeschön gilt meinem Studienkollegen Sanjin, der mir in der technischen Planung der Diplomarbeit tatkräftig geholfen hat.

Ich bedanke mich auch bei all meinen Freunden und Studienkollegen für die freundliche Hilfsbereitschaft, die sie mir entgegenbrachten und die mich mit ihrer positiven Lebensenergie erfüllt haben.

Weiterhin möchte ich vor allem meinem freundlichen Betreuer Herr Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik danken, der mir auf der Suche nach Lösungswegen immer Rede und Antwort stand.

Schließlich bedanke ich mich beim Herrn Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker und bei seiner Arbeitsgruppe des Departments für Pharmazeutische Chemie für die Synthese und Bereitstellung der Substanz.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das menschliche Herz.....	1
1.1.1. Lage, Form, Größe und Gewicht	1
1.1.2. Herzgliederung.....	1
1.1.3. Blutkreislauf	2
2. Zielsetzung	6
3. Material und Methoden	7
3.1. Testsubstanz	7
3.2. Cavia porcellus als Versuchstier	7
3.3. Herstellung der Tyrode	10
3.4. Herstellung der Versuchslösung.....	12
3.5. Kaliumchlorid-Lösung.....	13
3.6. Präparation der Organe.....	14
3.6.1. Präparation des rechten Vorhofs.....	15
3.6.2. Präparation der Papillarmuskeln	16
3.6.3. Präparation des Lungenstamms	17
3.6.4. Präparation des absteigenden Teils der Aorta.....	18
3.6.5. Präparation des terminalen Ileum	19
3.7. Durchführung der Versuche	20
3.7.1. Die Versuchsanordnung A	20
3.7.2. Versuchsanordnung B.....	22
3.8. Kraftwandler, Verstärker und Schreiber	24
3.9. Gasversorgung	25
3.10. Wasserbad	26
3.11. Vorbereitung für die Versuche.....	26
3.11.1. Versuchsablauf - Atrium cordis dextrum	27
3.11.2. Versuchsablauf – Musculus papillaris	28
3.11.3. Versuchsablauf – Aorta descendens.....	29
3.11.4. Versuchsablauf – Arteria pulmonalis	30
3.11.5. Versuchsablauf –Ileum terminalis.....	31
3.12. Auswertung der Daten	32
3.12.1. Auswertung – Atrium cordis dextrum.....	32
3.12.2. Auswertung – Musculus papillaris	32
3.12.3. Auswertung – Aorta descendens, Arteria pulmonalis, Ileum terminalis	33
3.13. Statistik	34
4. Ergebnisse	35
4.1. Wirkung von MGtr3 auf das Atrium cordis dextrum	35

4.2.	Die Wirkung von MGtr3 auf den Musculus papillaris	38
4.3.	Die Wirkung von MGtr3 auf Aorta descendes	41
4.4.	Wirkung von MGtr3 an Arteria pulmonalis	44
4.5.	Wirkung von MGtr3 am Ileum terminalis	47
4.6.	Untersuchung des Wirkmechanismus MGtr3 am Ileum terminalis	50
4.6.1.	Glibenclamid	50
4.6.2.	Wirkung von MGtr3 unter dem Einfluss von Glibenclamid 30 µmol/l	51
4.6.3.	Wirkung von MGtr3 unter dem Einfluss von Glibenclamid 100 µmol/l	54
5.	Diskussion	57
5.1.	Wirkung von MGtr3 auf den quergestreiften Herzmuskel	57
5.2.	Wirkung von MGtr3 auf glattnuskuläre Organe	58
6.	Zusammenfassung	60
7.	Curriculum Vitae	65

1. Einleitung

1.1. Das menschliche Herz

1.1.1. Lage, Form, Größe und Gewicht

Das menschliche Herz befindet sich im vorderen unteren Teil des Mediastinums in Höhe der zweiten bis fünften Rippe. Es ist seitlich von den Brustfellblättern der linken und rechten Lungenflügel begrenzt. Die Untergrenze bildet das Diaphragma, dem das Herz partiell aufsitzt, weshalb sie ihre Position mit den Bewegungen des Atemtrakts ändert (Mutschler et al. 2001).

Das Herz ist kegelförmig, seine Basis liegt oben und seine Spitze zeigt schräg in der Richtung nach unten (Mutschler et al. 2001).

Das menschliche Herz hat eine Größe von der geballten Faust der jeweiligen Person. Das Herz eines erwachsenen Mannes trägt ein Gewicht von ungefähr 320 g und einer erwachsenen Frau ungefähr 280 g (Mutschler et al. 2001).

1.1.2. Herzgliederung

Das Herz ist ein funktionell zweiteiliges Organ, es ist in ein linkes und ein rechtes Herz gegliedert. Beide Herzteile haben jeweils zwei Hohlräume, die von Muskelmassen unterschiedlicher Stärke umgeben sind, jeweils einen Vorhof (Atrium) und eine Kammer (Ventrikel). Die beiden Vorhöfe (Atrium cordis dextrum und Atrium cordis sinistrum) befinden sich im oberen Bereich der Herzteile, zwischen denen eine Trennwand (Septum interatriale) vorhanden ist. Die beiden Kammern sind von den Vorhöfen durch die äußere Herzkranzfurche (Sulcus coronarius cordis) getrennt. Auf dieser Ebene befinden sich AV-Klappen, deren Funktion die Isolierung der Herzkammern von den Vorhöfen ist, und die Verhinderung des Blutrückstroms aus den Herzkammern in die Vorhöfe. Das rechte Herz hat drei und das linke zwei Segelklappen, die wegen des unterschiedlichen Drucks zwischen den Vorhöfen und den Herzkammern geöffnet werden. Eine Druckerhöhung in der Herzkammer kann gefährlich sein, da die Segelklappen in den Vorhof durchschlagen können. Die Kammerinnenwände sind mit

Papillarmuskeln überzogen und bei ihrer Kontraktion werden die Sehnenfäden, welche die Segelzipfel mit Papillarmuskeln verbinden, angespannt. Die Anspannung der Sehnenfäden verhindern das Durchschlagen der Segelklappen (Mutschler et al. 2001).

1.1.3. Blutkreislauf

Das kohlendioxidreiche, sauerstoffarme Blut aus dem Körper wird über der oberen und unteren Hohlvene in den rechten Vorhof geführt. Aus dem rechten Vorhof geht es weiter während der Entspannungsphase in die rechte Kammer, die vollständig mit Blut gepumpt wird (dieser Prozess heißt Diastole), wonach sich der Vorhof zusammenzieht. Von da aus wird das Blut durch kontinuierliche Kontraktionen der rechten Kammer über die Lungenarterie (Truncus pulmonalis) in die Lunge gedrückt. Dort wird das Blut mit Sauerstoff bereichert, wonach es über die Lungenvenen zurück ins Herz fließt, diesmal in den linken Vorhof und dann in die linke Herzkammer. Weiter wird das Blut von der linken Herzkammer über die Aorta in die Körperarterien verteilt. Der Blutstrom ist durch Systole und Diastole der Herzkammern bedingt (Mutschler et al. 2001).

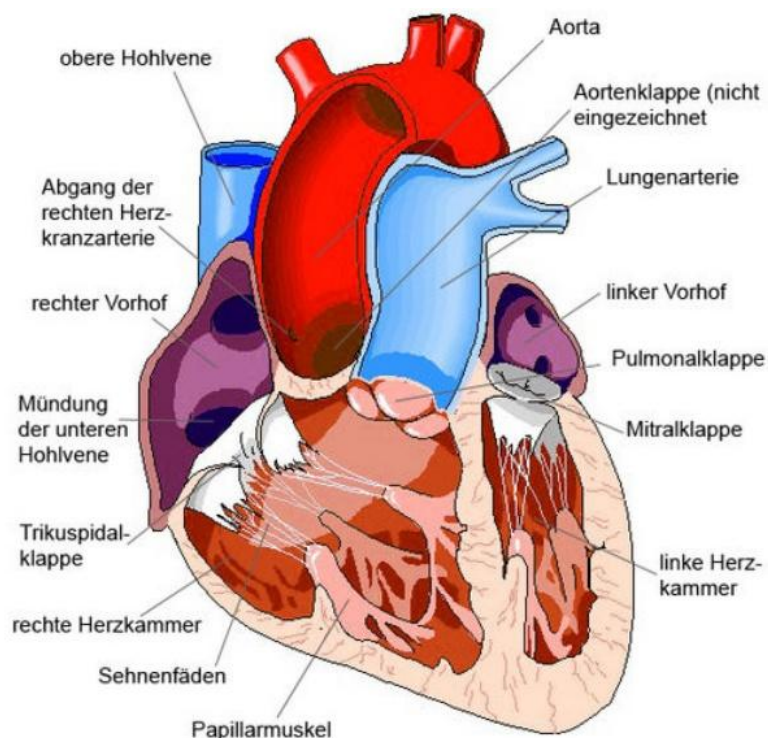


Abbildung 1: Das menschliche Herz

1.2. Schwefelwasserstoff

Da der Schwefelwasserstoff anderen endogenen Gasmolekülen strukturell ähnlich ist, beispielsweise dem Stickstoffmonoxid (NO), dem im Organismus bestehenden Transmitter, konnte davon ausgegangen werden, dass er im Blutkreislauf möglicherweise eine wichtige Rolle spielt (Wang et al. 1997 a,b).

Schwefelwasserstoff (Hydrosulfid, H_2S) ist ein farbloses, stechendes Giftgas, dessen Geruch in geringen Konzentrationen an verfaulte Eier erinnert. H_2S ist brennbar und kann im Ethanol gelöst werden (Winder and Winder, 1933).

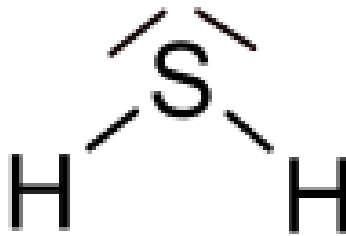


Abbildung 2: Struktur des Schwefelwasserstoffs

Die Inhalation von Schwefelwasserstoff verursacht akute Vergiftung, wobei die lebenswichtigen Organen wie das zentrale und periphere Nervensystem und der Atemtrakt betroffen werden (Hosoki et al. 1997; Kimura 2000; Zhao et al. 2001)..

Höhere Konzentrationen von H_2S bewirken die Betäubung der Geruchsrezeptoren. Wenn eine hohe Konzentration von Schwefelwasserstoff inhaliert wird, wird das Atemzentrum beschädigt, wodurch es zur Atemlähmung, die schon nach einigen Sekunden auftreten kann (apoplektiforme Vergiftung), und dem Verlust des Bewusstseins kommt (Hosoki et al. 1997; Kimura 2000; Zhao et al. 2001).

Niedrige Konzentrationen von Schwefelwasserstoff bewirken Schwäche, Krämpfe, schnelle und tiefe Atmung (Hyperpnoe), Irritationserscheinungen im Atmungsapparat und Lungenödem (Oedema pulmonum). Später erscheinende Folgen sind Lungenentzündung und Degeneration des Herzmuskels (Hosoki et al. 1997; Kimura 2000; Zhao et al. 2001).

Der exakte Wirkungsmechanismus einer Vergiftung mit Schwefelwasserstoff ist trotz mehrerer Studien noch nicht vollständig aufgeklärt worden. Im Jahr 1997 wurde aus den im Reagenzglas durchgeführten Versuchen mit der Aorta von Ratten festgestellt, dass der Schwefelwasserstoff eine relaxierende Wirkung auf das Organ hat (Hosoki et al. 1997). Zur Aufklärung der Ursache des Wirkmechanismus wurde die Verbindung zwischen den bekannten Regulationsmechanismen der glatten Organmuskulatur, K_{ATP} -Kanäle, Kohlenstoffmonoxid (CO) und Stickstoffmonoxid (NO) beobachtet (Lee et al. 2007).

Des Weiteren gibt es Studien, die sich die Aufgabe gestellt haben, die Behandlung einer künstlich bewirkten pulmonalen arteriellen Hypertonie mit Schwefelwasserstoff zu erforschen. Die Studien haben gezeigt, dass die vorhandenen negativen Effekte durch die Beigabe von Natriumhydrogensulfid (NaSH) teilweise wieder entfernt werden können. (Yan et al. 2004). Dementsprechend kann dies ein relevanter Ansatz bei der Behandlungstherapie der seltenen Krankheit (Orphan disease) pulmonale arterielle Hypertonie (PH oder PHT) sein (Hosoki et al. 1997; Yan et al. 2004; Forth et al. 2009)

Arterielle Hypertonie manifestiert sich durch den andauernd erhöhten Blutdruck (nach WHO-Kriterien bei 140/90 mmHg oder höher). Gründe für die Auslösung dieser Krankheit gibt es viele (Forth et al. 2009):

- Bei der Medikamenteneinnahme (z.B. Anorexigene, Amphetamine) ist das Risiko der Auslösung der Krankheit vorhanden.
- Eine gewisse Zeit lang vorhandene Blutklümpchen können zur Verstopfung der pulmonalen Aterien führen.
- Verschiedene Lungenkrankheiten, die Verstopfungen und Narben in den Pulmonalarterien erzeugen.
- Der Grund kann auch die Infektion durch das HIV-Virus sein.
- Manchmal sind die Gründe für den Ausbruch der pulmonalen Hypertonie unklar.

Die seltene Krankheit pulmonale arterielle Hypertonie ist eine ihrer Erscheinungsformen. An dieser Krankheit leidet fast jede fünfte Person pro 10000 Bewohner, und zwar sind Frauen generell viel mehr zur Aufnahme dieser Krankheit

geneigt als Männer. Das Hauptsymptom dieser Krankheit ist der dauerhaft erhöhte Blutdruck (Forth et al. 2009).

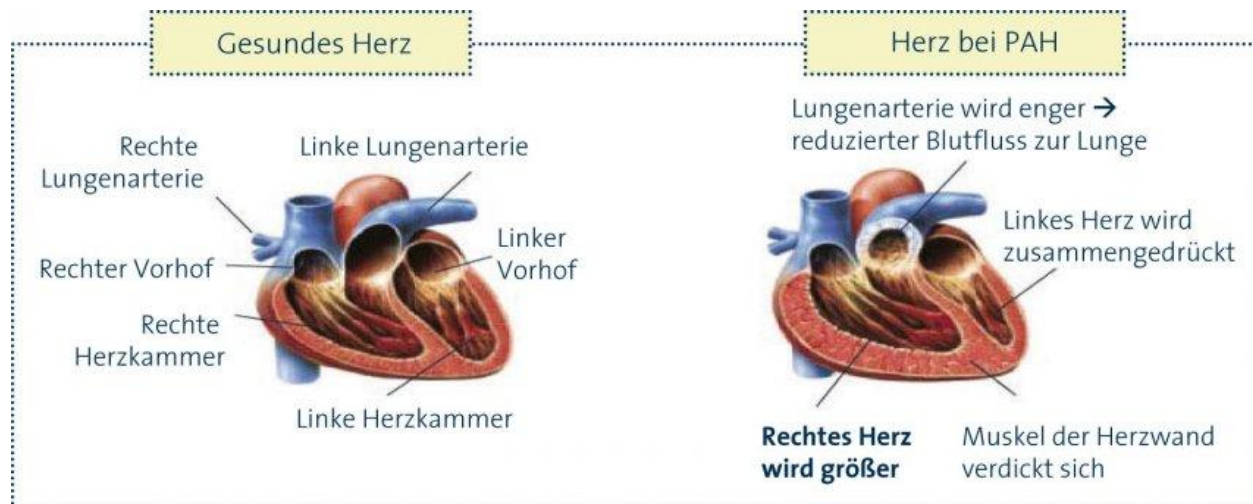


Abbildung 3: Vergleich zwischen dem gesunden Herz und dem Herz bei PAH

Ein normaler Blutdruckwert beträgt nach Kriterien der WHO unter 20 mmHg. Zur Erhöhung des Restlumens der Pulmonalgefäße werden diese vasodilatierenden Substanzen eingesetzt (Forth et al. 2009):

- Prostacyclinderivat
- PDE-5-Inhibitoren: Sildenafil, Tadalafil
- Endothelin-Rezeptorantagonisten: Sitaxentan, Bosentan

Als pharmakologische Monotherapie sind Diuretika, AT_1 - und β -Rezeptorantagonisten, ACE-Inhibitoren und Kalziumkanalblocker besonders geeignet (Forth et al. 2009).

Des Weiteren sind folgende Maßnahmen einzusetzen (Forth et al. 2009):

- Abnahme des Körpergewichts
- Reduktion des Alkoholkonsums
- Zigarettenverzicht
- Beschränkung der Natriumchlorid-Zufuhr
- Reduktion des Konsums fettreicher Nahrung
- Stressreduktion

2. Zielsetzung

Diese Diplomarbeit ist das Produkt der Untersuchung einer am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie der Universität Wien neu synthetisierter Substanz (MGtr3), die auf fünf isolierten Organen der Hausmeerschweinchen (*Caviaporcellus*) getestet wurde.

Dieses Tier wurde für die Untersuchung ausgewählt, weil schlussgefolgert wurde, dass wegen der ähnlichen Struktur der Ionenkanäle beim Hausmeerschweinchen und beim Menschen die Testsubstanz ähnliche Wirkung auf den Menschen wie bei diesem Tier haben wird.

Hierbei wurde als Hauptziel der Nachweis gesetzt, dass diese Testsubstanz vasodilatierende oder spasmolytische Wirkung haben wird. Die Wirkung der MGtr3 wurde an den Präparaten der glatten Organmuskulatur getestet, und zwar an der Pulmonalarterie, der Aorta und dem terminalen Ileum. Das Ziel war es außerdem zu testen, welchen Einfluss diese Substanz auf die Inotropie und die Chronotropie haben wird. Die Wirkung auf die Inotropie wurde am Papillarmuskel und die Chronotropie am rechten Vorhof betrachtet. Während der Untersuchung wurden unterschiedliche Konzentrationen der Versuchssubstanz genommen.

3. Material und Methoden

3.1. Testsubstanz

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie der Universität Wien die Testsubstanz MGtr3 synthetisiert. Diese Substanz wurde an fünf isolierten Organen der Hausmeerschweinchen getestet.

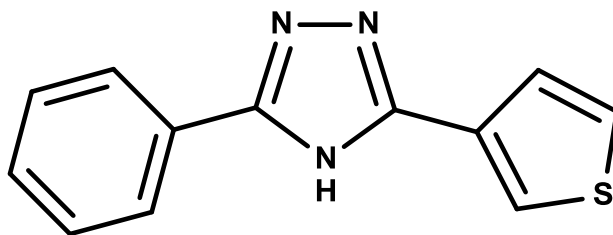


Abbildung 4: chemische Struktur von MGtr3

MG: 227,28 g/mol

Nomenklatur: 3-phenyl-5-(3-thienyl)-4H-1,2,4-triazol

3.2. *Cavia porcellus* als Versuchstier

Die Entscheidung, Hausmeerschweinchen aus dem TRIK-Stamm als Versuchstier für diese Untersuchung zu nehmen, wurde aufgrund folgender zwei Kriterien getroffen: Zum einen ist der Ionenkanälaufbau beim Menschen dem des Hausmeerschweinchens in vielerlei Hinsicht ähnlich, weshalb die Ergebnisse, die sich aus der Untersuchung herausstellten, auf den Menschen bezogen werden können. Zum anderen mussten aufgrund der Beschränktheit der zur Verfügung gestellter

Versuchsapparaturen die Organpräparate weniger als 600 Gramm wiegen, weshalb das Hausmeerschweinchen auch im Bezug auf diese Voraussetzung eine optimale Wahl ist.



Abbildung 5: Hausmeerschweinchen als Versuchstier

Bei der Auswahl mussten folgende drei Kriterien beachtet werden:

- Das Versuchstier ist weiblich.
- Es ist im Alter von vier bis acht Wochen.
- Es hat ein Gewicht zwischen 300 und 600 Gramm.

Für die Untersuchung wurden folgende Organe herausgenommen:

- Atrium cordis dextrum – rechter Vorhof des Herzens
- Arteria pulmonalis - Lungenarterie
- Musculus papillaris - Papillarmuskel
- Ileum terminalis– Endabschnitt des Hüftdarms
- Aorta descendens – absteigende Aorta

Um dem Versuchstier einen schnellen und möglichst schmerzlosen Tod zu ermöglichen, erfolgte die Tötung des Tiers durch einen schnellen Genickschlag. Auf diese Weise wurde er physischem und psychischem Stress nicht ausgesetzt. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde das Tier regelmäßig mit Pflege und Futter versorgt.

Nach der Schlachtung des Versuchstiers wurde mit einer OP-Schere der Brust- und Bauchraum geöffnet. Darauf folgte die Isolierung des Herzens, der Lunge, des ca. 20 cm langen Endabschnitts des Hüftdarms und schließlich der Aorta.

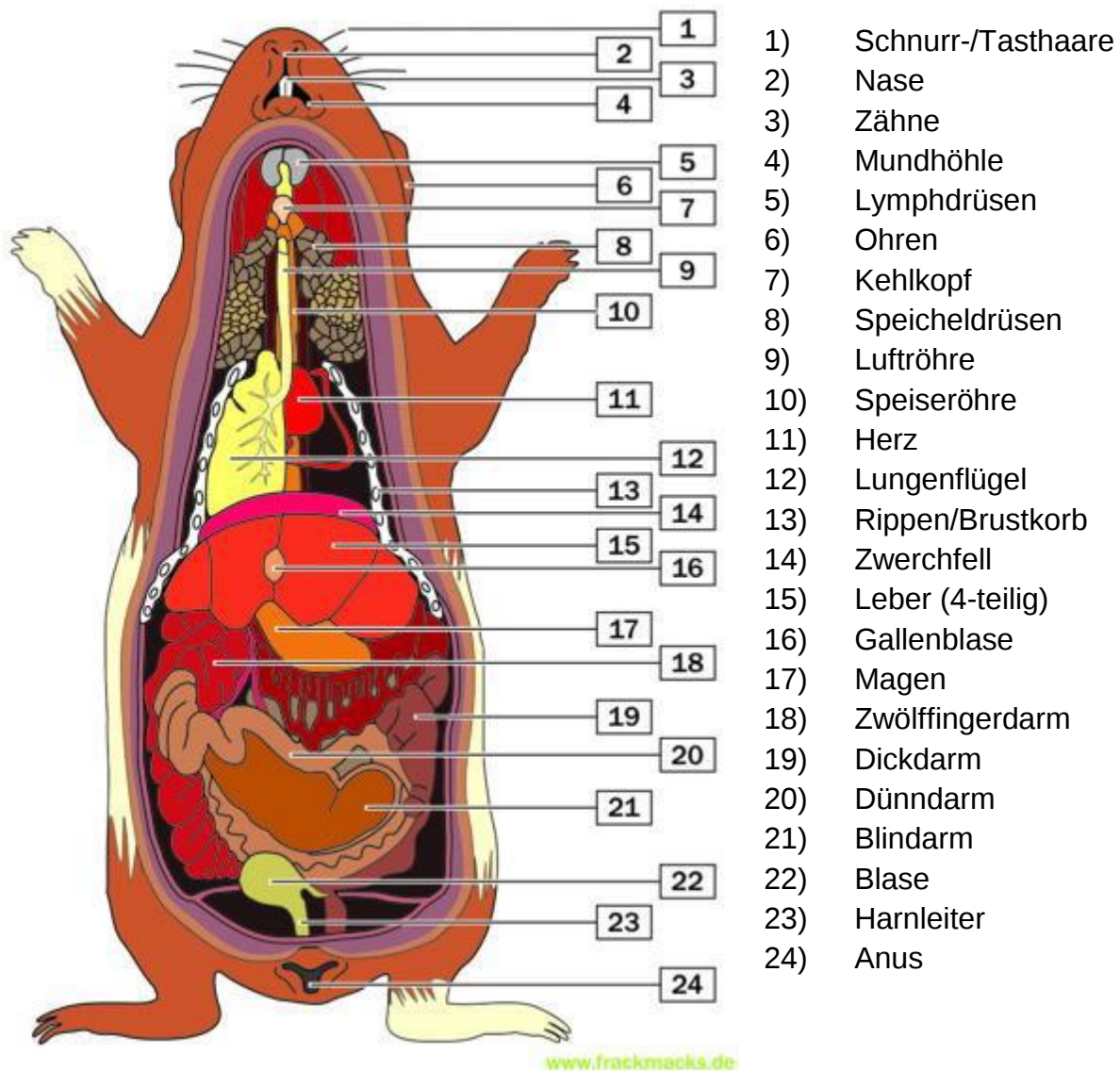


Abbildung 6: Anatomie des Hausmeerschweinchens

3.3. Herstellung der Tyrode

Unter dem Begriff Tyrode wird physiologische Nährlösung verstanden, womit die physiologischen Bedingungen, welche die Organe brauchen, nachgeahmt werden. Sie enthält alle notwendigen Elektrolyten, damit die Organe während der Präparation und der Versuche am Leben erhalten bleiben. Sie wurde nach dem amerikanischen Pharmakologen Maurice Vejux Tyrode genannt und ist für diese Untersuchung von äußerster Bedeutung.

Das Nährmedium wurde jeden Morgen nach Vorschriften von Reiter (1967) frisch zubereitet:

Zuerst wurden die Feststoffe mit einer Waage eingewogen und danach in einem 2-Liter-Messkolben gebracht.

Mit einer Bürette wurden Stammlösungen Natriumchlorid (NaCl), Kaliumchlorid (KCl), Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4), Magnesiumsulfat (MgSO_4) und Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO_3) beigemischt. Mit der Bürette konnte die notwendige Menge präzise abgemessen werden.

Danach wurde Glucose, die einzige Reinsubstanz, hinzugefügt.

In den Messkolben wurde dann $\frac{3}{4}$ Liter destilliertes Wasser gefüllt und mehrmals kräftig durchgeschüttelt, bis der Inhalt homogen wurde.

Hierauf folgte die Begasung der Mischung mit 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid. Die Begasung dauerte 20 Minuten.

Damit die Tyrode am Ende nicht trüb wird, weil sie als solche nicht brauchbar wäre, musste nach 20 Minuten Begasung Kalziumchlorid (CaCl_2) mit einer elektrischen Messpipette vorsichtig und tropfenweise dazugegeben werden.

Schließlich wurde der Messkolben bis zur Eichmarke mit destilliertem Wasser aufgefüllt und ein paar Mal geschwenkt.

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

Tabelle 1: Zusammensetzung der Tyrode

Substanz	Menge (ml)
NaCl	67,2
KCl	70
NaHCO ₃	167,4
MgSO ₄	2,36
KH ₂ PO ₄	2,36
CaCl ₂	6,4
Glucose	3,96 g

Tabelle 2: Herstellung für zwei Liter

3.4. Herstellung der Versuchslösung

Zuerst musste geprüft werden, in welchem Lösungsmittel die Substanz MGtr3 gelöst werden kann. Der erste Versuch mit Aqua bidestillata war erfolglos. Dann wurde ein Versuch mit Dimethylsulfoxid (DMSO) gemacht. Die Substanz löste sich leicht und schnell.

DMSO ist ein farb- und geruchsloses, leicht öliges hygroskopisches Lösungsmittel, es zeigt eine schwache zellgiftige Wirkung auf lebende Organe, weshalb es für chemische Versuche sehr geeignet ist.

DMSO wurde auf isolierten Organen der Hausmeerschweinchen geprüft, als wäre es die Testsubstanz, damit das Ausmaß seiner Wirkung auf die Organe gemessen werden kann. Die Wirkung der DMSO wurde in die Auswertung der Versuche mit einbezogen, um unpräzise Versuchsergebnisse zu vermeiden. Die Wirkung der DMSO wurde in Prozenten ermittelt, die je nach dem Organ entweder addiert oder subtrahiert werden mussten. Beim rechten Vorhof, beispielsweise, hat DMSO keine Wirkung gezeigt.

Die Lösung des Wirkstoffs erfolgte wie folgend: Auf Basis des Molekulargewichts der Testsubstanz musste eine Einwaage kalkuliert werden, die abhängig von der benutzten Apparatur zwei verschiedene Werte annehmen konnte, damit sie in der Organzelle bei der maximalen Wirkstoffgabe eine Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ erreicht.

Folgende Tabelle zeigt berechnete Stammlösungen:

Substanz	Molekulargewicht	Volumen des Organbades	Substanzeinwaage [mg]
MGtr3	227,28 g/mol	8 ml	0,18 mg
		25 ml	0,57 mg

Tabelle 3: Substanzeinwaage

3.5. Kaliumchlorid-Lösung

Damit ein andauernder Muskeltonus der präparierten Organe hervorgerufen wird, musste vor den Versuchen die Vorkontraktion der Organe durchgeführt werden. Dadurch werden die Voraussetzungen für die Untersuchung der vasodilatierenden bzw. spasmolytischen Wirkung der Testsubstanz auf die Versuchsorgane ermöglicht. Die Vorkontraktion wurde mit der Zugabe von Kaliumchlorid-Lösung bewirkt.

Für die Versuche an der Aorta und am Lungenstamm wurde eine 90 mmolare und für den Darm eine 60 mmolare Kaliumchlorid-Lösung gebraucht. Die Durchführung der Vorkontraktion am rechten Vorhof wäre überflüssig gewesen, weil er den primären Taktgeber (Sinusknoten) besitzt. Zwar besitzt der Papillarmuskel kein spontanes Erregungsleitungssystem, die Vorkontraktion hat mittels Kaliumchlorid-Lösung nicht stattgefunden, sondern der Muskel wurde in der Tyrode elektrisch gereizt.

Organpräparat	Kaliumchlorid-Einwaage (g)	Menge de Nährlösung (ml)
Aorta	0,67	100
Arteria pulmonalis	0,67	100
terminales Ileum	0,45	100

Tabelle 4: Menge der Kaliumchlorid-Lösung für die Durchführung der Vorkontraktionen

3.6. Präparation der Organe

Nach der Isolierung und Begasung der Tierorgane mit der Tyrode wurden die Organe für die Versuche präpariert.

Sie wurden in die Petrischale gebracht, in welcher sich eine vom Gummischlauch umgebene Korkscheibe befand, und welche vor dem Beginn der Präparation mit der Nährlösung gefüllt worden ist.

Damit die Lichtverhältnisse optimal werden, wurden die Organe unter einem Stereomikroskop präpariert. Notwendig war auch folgendes Sezierbesteck:

- a) Pinzetten in unterschiedlicher Größe
- b) Spitz- und Federschere
- c) drei Bechergläser
- d) Bindfaden



Abbildung 7: Werkzeuge für die Präparation der isolierten Organe

3.6.1. Präparation des rechten Vorhofs

Das Herz wurde in die Petrischale gebracht und mit zwei Nadeln am Korkboden fixiert. Danach wurden mit höchster Präzision unter dem Stereomikroskop der Herzbeutel und das überflüssige Fett- und Lungengewebe beseitigt.

Als Erstes wurde der rechte Vorhof isoliert, wobei auf den Sinusknoten aufgepasst werden musste, weil er örtlich schwer zu bestimmen ist. Ein nicht gut durchdachter Schritt könnte zu seiner Verletzung führen, aber damit die bevorstehenden Versuche später erfolgreich ablaufen, muss der primäre Impulsgeber unbeschädigt bleiben.

Nach der erfolgreichen Isolierung des rechten Vorhofs wurde er in eine weitere Petrischale überführt, wo die Präparation fortgesetzt wurde. Die beiden Enden des Organs wurden mit Hilfe von zwei Präpariernadeln fixiert und mit farbigen Fäden angebunden. Um das Organ einzuspannen, wurde durch einen weiteren Knoten, der die Bindung stabiler machen sollte, je ein Häkchen aus dem Silberdraht angebracht.

Schließlich wurde der fertig präparierte Vorhof in das Organbad mit der Tyrode gebracht, mit der Spitze nach unten eingespannt und begast.



Abbildung 8: Fertiges Vorhofpräparat



Abbildung 9: Vorhof im Organbad

3.6.2. Präparation der Papillarmuskeln

Nach der Entfernung des rechten Vorhofs ging es weiter mit der Isolierung der Papillarmuskeln.

Das Herz wurde mit zwei Präpariernadeln an die Korkscheibe fixiert. Die Art und Weise, wie das Silberdrahthäkchen angebracht und das Herz mittels der Bindfäden befestigt wurde, ist dieselbe wie beim Vorhof.

Die Papillarmuskeln befinden sich in beiden Herzkammern, aber zuerst wurden die aus der rechten Herzkammer herausgenommen. Damit das regelrecht abläuft, musste vorsichtig mit der Schere entlang der Scheidewand (Septum) der rechten Kammer geschnitten werden. Als Nächstes erfolgte die vollständige Beseitigung der Purkinjefasern, weil sie ein Teil des Erregungsleitungssystems des Herzens sind und ihre spontane Depolarisierung zur Beeinträchtigung der Versuche an diesem Organ führen könnte. Der Papillarmuskel aus der rechten Herzkammer, welcher eine verlässlichere Kontraktionskraft hat als der aus der linken, wurde mit einem blauen Bindfaden befestigt.

Des Weiteren wurden auch die Papillarmuskeln aus der linken Herzkammer isoliert, die zur Unterscheidung mit einem roten Bindfaden angebunden wurde.

Letztendlich wurden die Papillarmuskeln in das mit Tyrode gefüllte Organbad überführt.

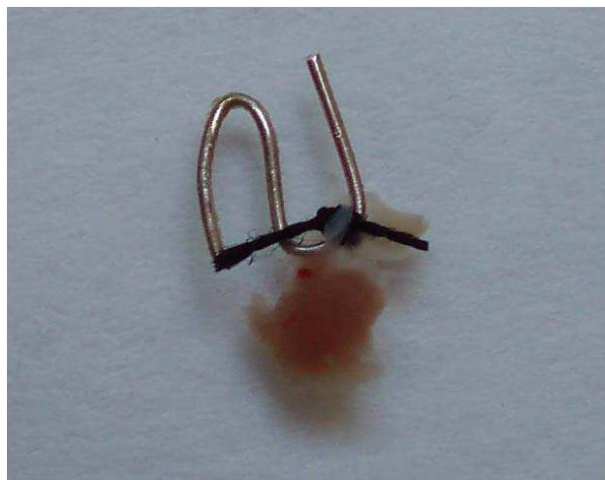


Abbildung 10: Fertiges Papillarmuskelpräparat

3.6.3. Präparation des Lungenstamms

Aus der rechten Herzkammer des Hausmeerschweinchens geht der Lungenstamm (Truncus pulmonalis) hervor, der sich in die linke und rechte Lungenarterie (Arteriae pulmonales) abzweigt.

Für die Versuche wurde nur der Lungenstamm gebraucht. Er wurde vorsichtig herausgenommen, in die Petrischale überführt und dort von überflüssigen Fett- und Muskelgeweben gesäubert.

Nach der Reinigung erfolgte die Schneidung des Lungenstamms in etwa 3 mm breite Ringe.

Schließlich wurde er ohne Bindfäden und Silberdrahthäkchen direkt in das mit Tyrode gefüllte Organbad eingespannt und begast.



Abbildung 11: Fertiges Lungenstammpräparat

3.6.4. Präparation des absteigenden Teils der Aorta

Als Nächstes wurde die Aorta, die sich entlang der Wirbelsäule befindet, isoliert. Der Thorax musste weit geöffnet werden, damit beim Herausschneiden das Organ nicht beschädigt wird.

Nachdem die Aorta erfolgreich entnommen wurde, wurde sie in die Petrischale überführt und mit Stecknadeln an die Korkscheibe befestigt. Für die Versuche wurde nur der absteigende Teil der Aorta benötigt.

Die überflüssigen Reste mussten mittels einer Federschere beseitigt werden, damit sich während der Versuche die Testsubstanz an das Fett nicht anlagern können, was in diesem Fall zu falschen Ergebnissen führen könnte.

Für die bevorstehenden Versuche musste die Aorta in kleine Ringe geschnitten werden, die etwa 3 mm breit sind.

Sowie der Lungenstamm wurde auch die Aorta ohne Silberdrahthäkchen in das Organbad gebracht und eingespannt.

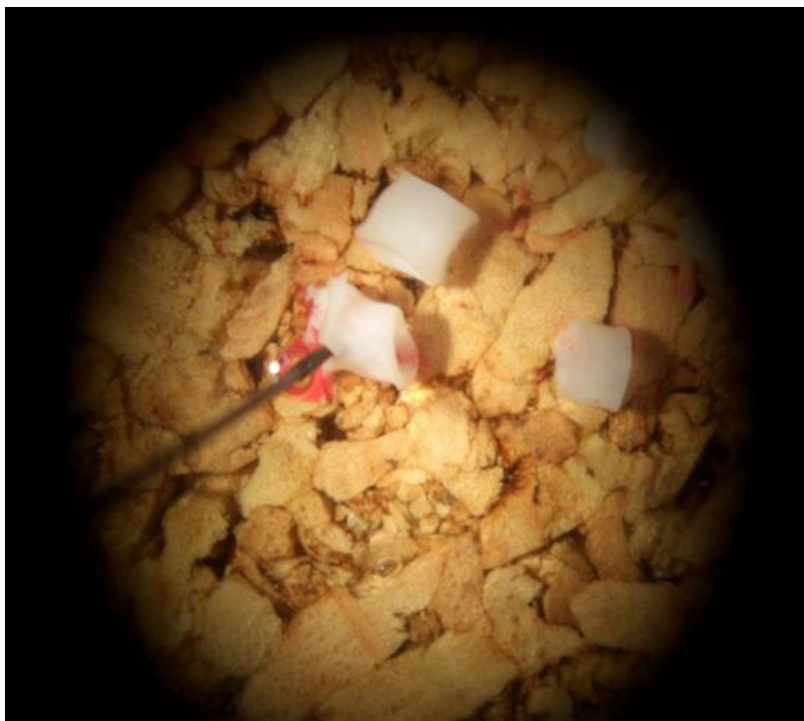


Abbildung 12: Präparierte Aortaringe

3.6.5. Präparation des terminalen Ileum

Das terminale Ileum besteht aus drei Teilen:

- Zwölffingerdarm (Duodenum)
- Leerdarm (Jejunum)
- Krummdarm (Ileum)

Für die Versuche wurde nur das terminale Ileum, welcher sich zwischen Dünn- und Dickdarm befindet, vorgesehen, weshalb zuerst dieser Übergang lokalisiert werden musste. Wenn das terminale Ileum gefunden wurde, wurde ein Stück, das etwa 20 cm lang war, herausgenommen. Er wurde danach in die Petrischale gebracht, wo ein Stück von ca. 5 mm schräg geschnitten wurde und dann an beiden Spitzen auf den Korkboden mittels zwei Präpariernädel befestigt. Der nächste Schritt war die Durchspülung des Darminhaltes mit einer Pasteurpipette, um es von überflüssigen Resten zu befreien. Des Weiteren wurde das Organ in kleinere Stücke schräg geschnitten, um zu sichern, dass die Testsubstanz während der Versuche die Lumenschleimhaut erreicht. Schließlich wurde das Organ an beiden Spitzen mit Bindfäden angebunden und an Silberdrahthäkchen angebracht. Das präparierte Organ wurde in das Organbad gebracht und mit Gas gesättigt.



Abbildung 13: Das präparierte terminale Ileum



Abbildung 14: Ileum im Organbad

3.7. Durchführung der Versuche

Für die Durchführung der Versuche wurden zwei Apparaturen verwendet. In der Apparatur A wurden die Papillarmuskeln getestet, während die Apparatur B für die Durchführung der Versuche am Atrium cordis dextrum, Arteria pulmonalis, Aorta und terminales Ileum vorgesehen wurde.

Damit die Organe am Leben erhalten werden und die Versuche bis zum Ende erfolgreich durchgeführt werden, mussten für die Organe optimale physiologische Bedingungen geschaffen werden und dazu zählen optimale Temperatur (35 – 37°C), Sauerstoff- und Kohlendioxidversorgung, Nährlosung.

3.7.1. Die Versuchsassparatur A

Auf der Versuchsassparatur A wurden vier Präparate getestet:

- die Aorta
- der rechte Vorhof
- der Dünndarm
- der Lungenstamm

Diese Versuchsassparatur (siehe Abbildung 13) ist ein Gestell aus Metall, das aus drei Glasbehältnissen besteht, die eigenständig verwendet werden können. Die Behältnisse haben unterschiedlich großes räumliches Fassungsvermögen, ihre Aufnahmefähigkeit liegt bei 25 ml bzw. 8 ml Flüssigkeit, welche in unserem Fall die Tyrode ist.

Die ringförmigen Präparate – hierzu gehören die Aorta und der Lungenstamm – wurden, ohne die Silberdrahthäkchen anbringen zu müssen, direkt durch Einfädeln der Präparate in die Organbäder überführt.

Bei den restlichen Präparaten – der Dünndarm und der rechte Vorhof – wurden an beiden Spitzen der Organe jeweils ein Silberhäkchen angebracht.

Vor jedem Versuch musste das mit der Tyrode befüllte Organbad auf die optimale Temperatur für die Präparate erwärmt werden. Der Thermostat sorgte für die Erhaltung

einer konstanten Temperatur von 35°C. Das Behältnis wurde mit Hilfe eines Schlauches, das an der Öffnung von Wasserzufuhr und –ablauf angebracht ist, mit Wasser erwärmt. Ein seitlicher Schlauch ermöglichte die Versorgung der Präparate mit Gas.

Nachdem das Präparat in das mit der Nährlösung aufgefüllte Organbad eingespannt worden ist, musste die entsprechende Vorspannung mittels eines Feintriebs eingestellt werden. Dadurch wurde die maximale Muskelkontraktion bewirkt.

Die Muskelkontraktionskraft wurde von dem Silberdraht über den Kraftwandler, wo die Kontraktionskraft in die elektrische Impulse umgewandelt wurde, und den Verstärker bis zum Schreibgerät geleitet und auf einem Millimeterpapier aufgezeichnet.

Bestandteile der Versuchsanordnung A:

- 1) Kraftwandler
- 2) Mikrometerschraube
- 3) Organhalterung
- 4) Silberdraht
- 5) Begasung
- 6) Organbad
- 7) Wasserzufluss
- 8) Wasserabfluss
- 9) Nährlösungszufluss
- 10) Nährlösungabfluss

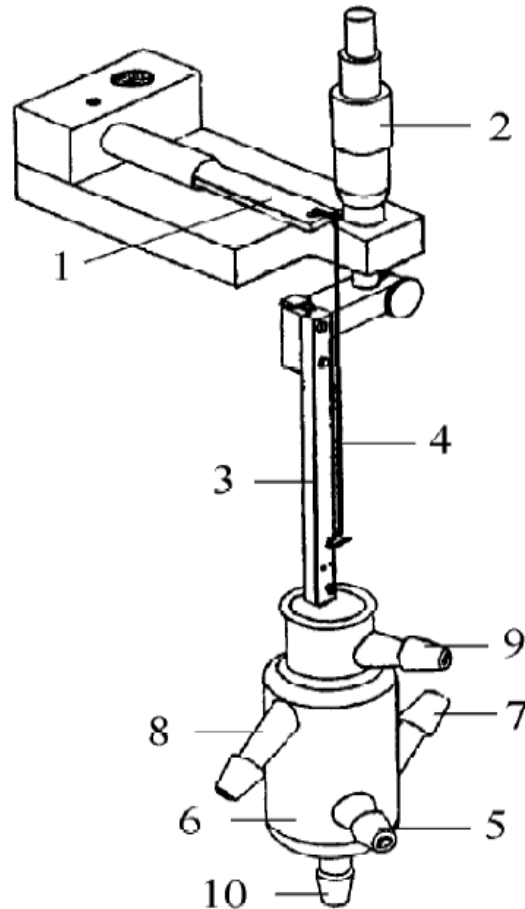


Abbildung 15: Skizzierte Darstellung der Versuchsanordnung A

3.7.2. Versuchsapparatur B

Diese Versuchsapparatur (Abbildung 14) diente der Untersuchung der Papillarmuskel. Nachdem das Präparat ins Organbad überführt worden ist, musste es elektrisch gereizt werden– und zwar mit einem Accupulser Stimulator (Model Isostim 301T, WPI, Hamden, CT, USA) – denn es konnte keine spontane Kontraktionen erzeugen.

Mit der Versuchsapparatur B konnte diese Bedingung erfüllt werden. Im Wasserbad befand sich eine Papillarmuskelkammer, auf deren Boden eine Gasfritte, die für die Zufuhr des Sauerstoffs von großer Bedeutung war, angebracht wurde.

Das Wasserbad musste auf 35°C erwärmt und die Papillarmuskelkammer mit 25 ml Nährlösung aufgefüllt werden. Für die Aufrechterhaltung der optimalen Temperatur war der Thermostat zuständig, während ein angeschlossener Schlauch die Gassättigung der Nährlösung ermöglichte.

Das Organpräparat wurde an einem Ende mit einem Silberhäkchen an die Organhalterung angebracht während es am anderen Ende mit Schrauben zwischen einer Platinkathode und einer rechteckigen Plexiglasscheibe eingeklemmt wurde. Dadurch wurde die Verbindung zum Kraftwandler hergestellt.

Anschließend wurde der Gashahn 15 aufgedreht und die Organhalterung in die mit der Tyrode aufgefüllte Papillarmuskelkammer getaucht.

Mithilfe eines Feintriebs wurde die Vorspannung eingestellt, wodurch beim Papillarmuskel maximale Vorkontraktion erzwungen wurde.

Die Vorkontraktion der Papillarmuskel wurde vom Kraftwandler registriert und in die elektrische Impulse umwandelt. Diese Schläge wurden dann vom Schreiber aufgefasst.

Der Amplifier zwischen dem Kraftwandler und dem Schreiber verstärkte zusätzlich das Signal.

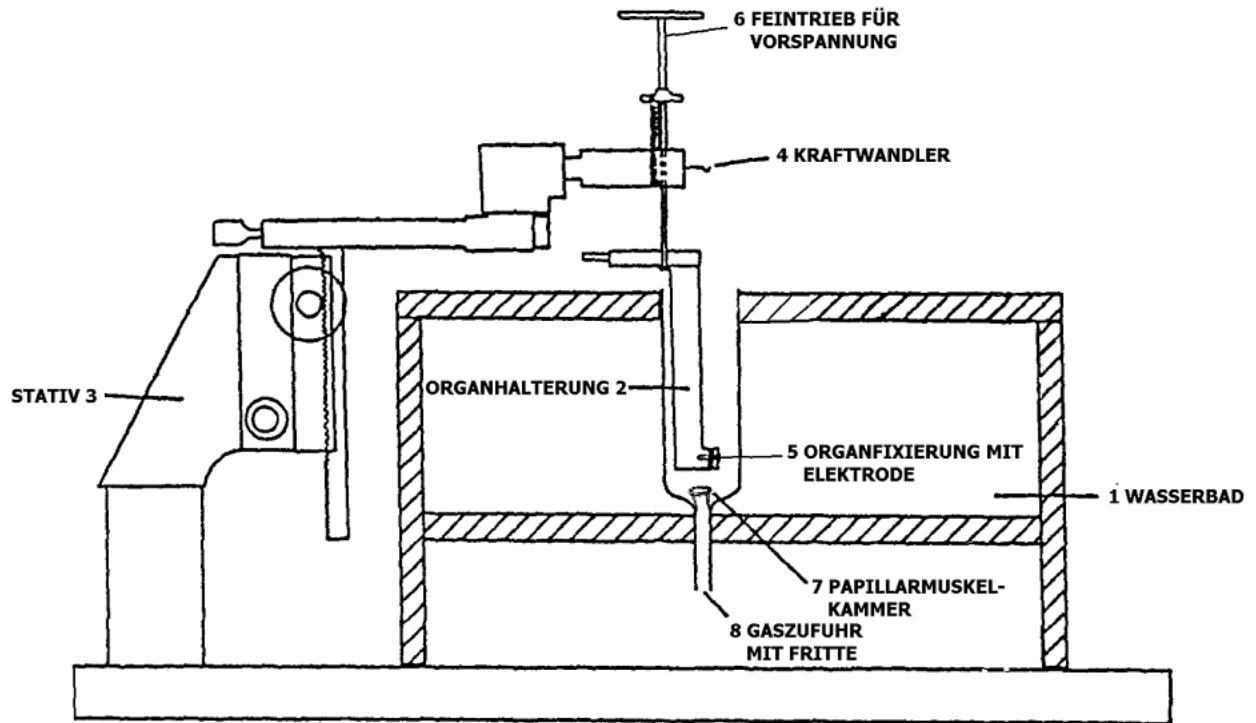


Abbildung 16: Skizzierte Darstellung der Versuchsanordnung B

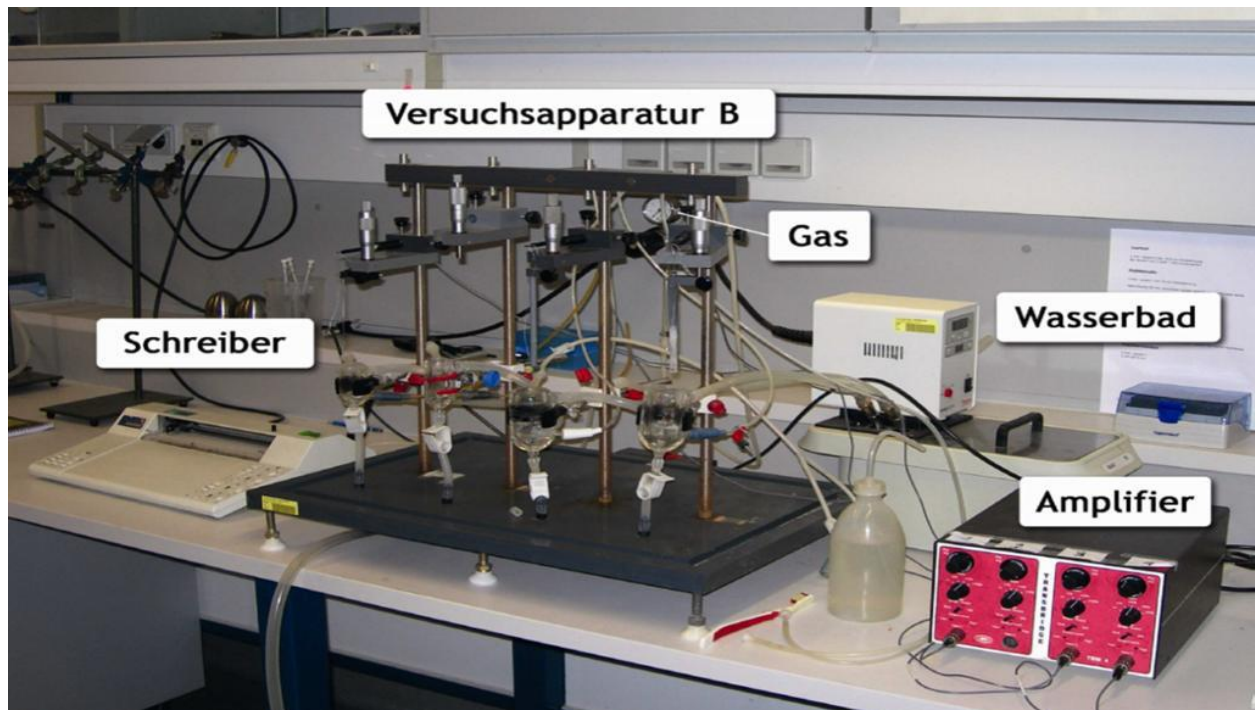


Abbildung 17: Originale Abbildung der Versuchsanordnung B

3.8. Kraftwandler, Verstärker und Schreiber

Der Kraftwandler (Transbridge der Firma World Precision Instruments, USA), der bei beiden Versuchsapparaturen vorhanden ist, dient der Umwandlung der Kontraktionen, welche entweder spontan wie beim rechten Vorhof erzeugt oder von der Organmuskulatur durch elektrische Reizung erzwungen werden, in die elektrische Impulse. Im Kraftwandler wird durch die Spasmolyse oder Kontraktion der Muskulatur der präparierten Organe der elektrische Widerstand an dem im Kraftwandler integrierten Dehnungstreifen durch das Ausdehnen geändert. Mit der Änderung der Muskelkontraktionskraft wird auch der elektrische Widerstand geändert und proportional dazu wird auch die angelegte Stromstärke geändert.

Der Verstärker (4-Channel Transducer Amplifier, Firma WPI) befindet sich zwischen dem Kraftwandler und dem Schreiber und dient der zusätzlichen Verstärkung des Signals.

Der Schreiber (Flatbed Recorder, Modell BD 112 Dual Channel, Firma Kipp & Zohn) registriert das vom Verstärker gesendete Signal und zeichnet die entstandenen Impulse auf dem Millimeterpapier in Form von Kurven auf.

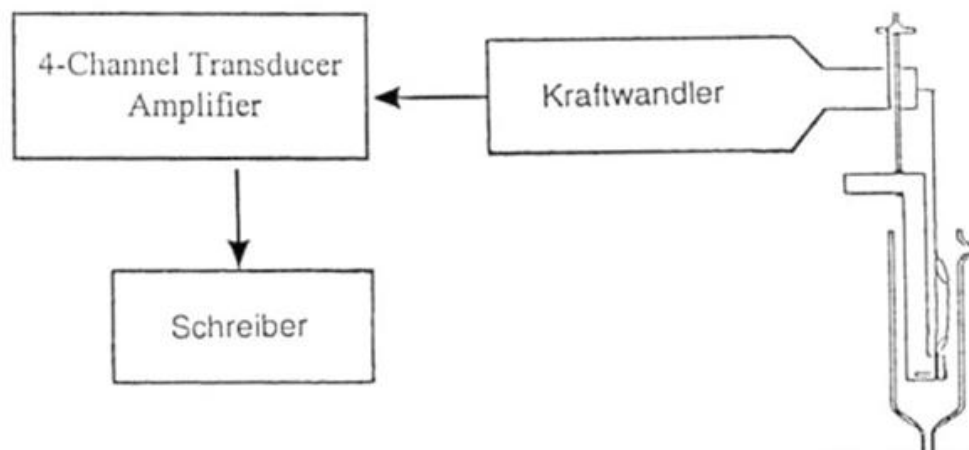


Abbildung 18: Skizzierte Darstellung vom Kraftwandler, Verstärker und Schreiber

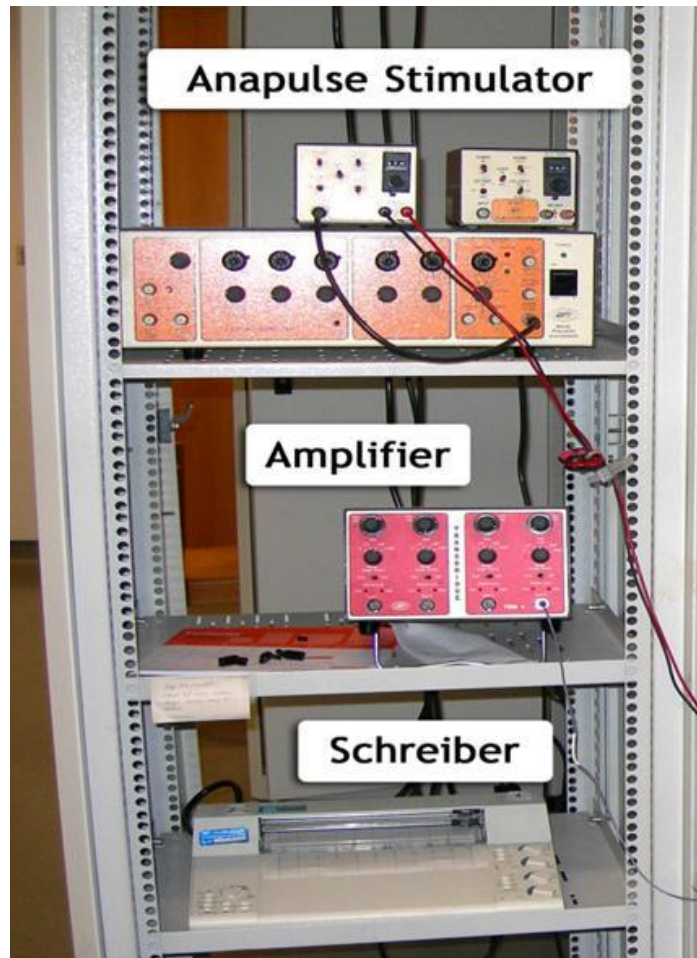


Abbildung 19: Originale Abbildung vom Kraftwandler, Verstärker und Schreiber

3.9. Gasversorgung

Damit optimale physiologische Bedingungen für die präparierten Organe gewährleistet und somit die Organe am Leben erhalten werden könnten, benötigt wurde die Gaszufuhr von Anfang bis zum Ende der Versuchsdurchführung. Sogar vor den Versuchen musste die Nährlösung für 20 Minuten mit Gas gesättigt werden. Die Gasmischung bestand aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid.



Abbildung 20: Der Gashahn

Durch Begasung wurde die Einstellung des physiologischen pH-Wertes von 7,2 – 7,4 ermöglicht. Die Gasmischung befand sich in Stahlflaschen. Den Zugang zu Organbädern ermöglichte das Schlauchsystem. An den Schläuchen wurden die Schraubklemmen angebracht, deren Funktion die Regulation der Geschwindigkeit der Gasströmung war. Auf die optimale Gasdosierung musste stets geachtet werden, denn zu viel Gas konnte die Organe beschädigen.

3.10. Wasserbad

Bei der Durchführung der Versuche war es von essenzieller Bedeutung, dass die Temperatur konstant gehalten wird. Dank der Wasserbäder und der Thermostaten konnte diese Bedingung ermöglicht werden. Bei der Apparatur A, in welcher der Vorhof, die Aorta, der Dünndarm und der Lungenstamm getestet werden sollten, sollte das Wasserbad eine Temperatur von 37°C zeigen, um optimale Bedingungen für die Versuche zu schaffen. Bei der Apparatur B, die zur Untersuchung der Papillarmuskeldiente, sollte eine Temperatur von 35°C eingestellt werden. Eine Abweichung von $\pm 1^\circ\text{C}$ könnte die Versuchsabläufe nicht beeinträchtigen.



Abbildung 21: Wasserbad

3.11. Vorbereitung für die Versuche

Vor dem Anfang jeden Versuchs musste darauf geachtet werden, dass die für die Versuche notwendigen Apparaturen sauber waren. Deshalb mussten Organbäder und dazugehörige Halterungen zwei- bis dreimal gründlich gereinigt werden, und zwar mit 2%iger Salzsäure und destilliertem Wasser. Für eine gründlichere Säuberung wurden auch die Bürsten verwendet. Unmittelbar vor dem Anfang des Versuchs wurden sie noch einmal mit Wasser und mit Nährlösung durchgespült. Nach der Durchspülung wurde die Nährlösung in das Organbad aufgefüllt. Im folgenden Text wird die Durchführung der Versuche sowie die Wirkung der Testsubstanz auf die fünf isolierte und präparierte Organe der Meerschweinchen beschrieben.

3.11.1. Versuchsablauf - Atrium cordis dextrum

Das Organpräparat, dessen Präparation im Kapitel 3.2. erklärt worden ist, wurde nun in die Versuchsanordnung A aus dem Kapitel 4.1.1. mit Hilfe vom angebundenen Haken überführt. Die Überführung sollte keinesfalls lange dauern, weil sich der Vorhof in dieser Zeit außerhalb der Tyrode befindet und er auf reduzierte Zufuhr von Sauerstoff empfindlich ist. Das Präparat sollte außerdem nicht zu fest oder zu locker in der Versuchsanordnung eingespannt werden. Es musste auch darauf geachtet werden, dass der Silberdraht die Wände des Behältnisses nicht berührt und nicht zu sehr gedehnt wird, damit es bei der Vorspannung durch Feintrieb nicht zur Überdehnung kommt.

Jetzt wo das Präparat in der mit Nährlösung befüllten Organzelle eingetaucht worden ist, konnten die notwendigen Geräte eingeschaltet werden. Während des ganzen Prozesses musste ständig auf den Gasstrom geachtet werden.

Zuerst wurden das Schreibgerät und der Verstärker eingeschaltet, der Stift des Schreibers mithilfe des Zero-Drehrades auf die Nullposition am Millimeterpapier gedreht und die Stromstärke auf 5 mm/sec gestellt. Nun folgte die Vorspannung des rechten Vorhofs mit dem Feintrieb auf 10,4 mN. Dabei änderte sich die Position des Stifts am Millimeterpapier, es entstand eine kleine Auslenkung, weshalb er wieder auf die Nulllinie mit dem Knopf am Verstärker gesetzt werden musste.

20 bis 30 Minuten musste gewartet werden, bis sich der Vorhof an die Umgebung angepasst und zu schlagen anfangen hat. Im Falle, dass das Organ nicht zu schlagen beginnen konnte, würde der Versuch als fehlgeschlagen gelten.

An dieser Stelle konnte die Kontrollphase anfangen. Die Schlagfrequenz hat sich nach zwei bis drei Messungen auf eine konstante Zahl der Schläge gelegt und somit wurde alle fünf Minuten eine Frequenz von zwölf Sekunden, die am Millimeterpapier ca. 6 Kästchen betragen, aufgezeichnet. Sobald die letzten vier Aufzeichnungen eine konstante Schlagfrequenz gezeigt haben, konnte die Testsubstanz nach dem Schema aus der Tabelle 3 im Kapitel 2.4. mittels einer Kolbenhubpipette eingetropft werden.

3.11.2. Versuchsablauf – Musculus papillaris

Der präparierte Papillarmuskel wurde als einziges Organ in die Versuchsanordnung B, die im Kapitel 4.1.2. beschrieben worden ist, zwischen der Platinelektrode und der kleinen rechteckigen Plexiglasscheibe befestigt und in die mit 25 ml Nährlösung gefüllte Papillarmuskelkammer eingetaucht worden ist.

Die Temperatur von 35°C wurde vor dem Beginn des Versuchs eingestellt. Am Schreiber wurde die Spannung auf 5 mV oder bei Bedarf auf 2 mV angelegt, durfte aber während der Durchführung der Versuche nicht geändert werden. Die Geschwindigkeit wurde auf 5 mm/sec gestellt. Hierauf folgte die Vorspannung des Organs, wonach der Stift des Schreibers mittels Drehrads auf die Nulllinie gedreht werden musste.

Der Papillarmuskel brauchte ca. 20 Minuten Gewöhnungszeit, bis er durch ein Reizgerät elektrisch gereizt werden konnte. Alle 15 Sekunden wurde der Muskel für drei Millisekunden mit einer Schlagfrequenz von 1 Hz gereizt. Die minimale Reizung wurde dann um 10% erhöht, um kontinuierliche Schläge der Papillarmuskel zu bewirken. Eine Überschreitung des Schwellenwerts über 10% wurde vermieden, damit der Katecholaminspeicher nicht entleert wird.

Der nächste Schritt war die Kontrollphase, in der sich eine konstante Schlagfrequenz herausstellen sollte. Danach konnte die Hinzufügung der Versuchssubstanz in die Papillarmuskelkammer nach bereits dargestelltem Schema erfolgen.

Zuerst wurde 1 µl der Versuchssubstanz zugegeben und nach 45 Minuten Einwirkzeit konnte die nächste Konzentration eingespritzt werden. Während der Einwirkzeit wurde alle fünf Minuten die Amplitudengröße auf dem Millimeterpapier registriert.

3.11.3. Versuchsablauf – Aorta descendens

Die Wirkung der präparierten Ringe des Lungenstamms auf die Versuchssubstanz wurde in der Versuchsanordnung A untersucht. Bei der Einspannung musste mit dem Präparat vorsichtig umgegangen werden, um Überdehnung oder Verknäueln zu vermeiden. Die Anbringung des Organs zwischen der Aufhängevorrichtung und einer Silberdraht erfolgte sehr zügig. Zusammen mit der Organhalterung wurden die Aortaringe in das Organbad, welches mit der optimalen Temperatur von 37°C, mit Tyrode und Oxymix versorgt wurde, eingetaucht.

Auf dem Schreibgerät wurden die Stromstärke von 10 mV und die Geschwindigkeit – welche auf dem Gerät mit „Speed“ bezeichnet wird von 1 mm/sec eingestellt. Der Stift des Schreibers wurde auf die Nullposition auf dem Millimeterpapier gedreht. Hierauf folgte die Anlegung der Vorspannung von 19,7 mN mittels eines Feintriebs.

Die Anpassungszeit der Aortaringe auf das Milieu dauerte ca. 20 Minuten lang, wonach die Stromstärke auf 5 mV vermindert wurde. Deshalb entstand auf dem Schreiber eine Abweichung des Stifts von der Nulllinie, weswegen er wieder vom Verstärker zurückgebracht werden musste. Mit den Tasten „Record on“ und „Pen down“ wurde das Schreibgerät für die Aufzeichnungen der Schlagfrequenz aktiviert. An dieser Stelle wurde die Tyrode durch die 90 mmolare Kaliumchlorid-Lösung, welche vorher vorbereitet und im Kapitel 2.5. beschrieben wurde, ersetzt. Die Kaliumchlorid-Lösung war für die Erzwingung der maximalen Muskelkontraktion zuständig.

In der Kontrollphase sollte das Organ über 5 cm nach links ausschlagen, damit auf dem Millimeterpapier eine Kurve aufgezeichnet werden konnte. Nach ca. 45 Minuten wurde ein konstantes Niveau bei der Organkontraktion erreicht, wonach die erste Konzentration der Versuchssubstanz eingespritzt wurde. Die nächste Konzentration der Substanz konnte erst wieder nach 45-minütiger Einwirkzeit dazugegeben werden.

Eine mögliche von der Testsubstanz verursachte Dilatation des Lungenstamms konnte anhand der auf dem Millimeterpapier aufgezeichneten Kurve abgelesen werden.

3.11.4. Versuchsablauf – Arteria pulmonalis

Die präparierten Ringe der Lungenarterie mussten vorsichtig in die Versuchsanordnung B zwischen zwei Silberdrähten eingehängt werden. Es musste aufgepasst werden, dass das elastische Organ nicht überdehnt wird. Dann konnte das Organ samt der Organhalterung ins Organbad, das mit Nährlösung und Gas versorgt war, eingetaucht werden.

Nun konnten die Geräte eingeschaltet werden – zuerst der Schreiber, auf welchem die Geschwindigkeit auf 5 mm/min und die Spannung auf 5 mV eingestellt und der Stift auf die Nullposition mittels Zero-Drehrads gedreht wurde. Als Nächstes wurde der Verstärker aktiviert, wodurch der Stift eine Auslenkung von der Nulllinie machte. Mit einem Knopfdruck am Verstärker konnte der Schreiber auf die Nulllinie zurückgebracht werden.

Hierauf folgte eine 20-minütige Anpassungszeit des Organs auf seine neue Umgebung. Nachdem diese Zeit abgelaufen war, wurde die Nährlösung durch eine 90 mmolare Kaliumchlorid-Lösung ersetzt. Die Tyrode wurde langsam aus dem Organbad durch einen Abflussschlauch abgelassen und gleich nach der Entleerung wurde je nach Aufnahmevermögen des Organbades eine entsprechende Menge Kaliumchlorid-Lösung aufgefüllt. Die Kaliumchlorid-Lösung sollte eine maximale Kontraktion des Organs bewirken, welche auf dem Schreibgerät durch das Ausschlagen des Stifts von der Nullposition nach links sichtbar wurde.

Wieder musste für 45 Minuten gewartet werden, bis das Organ eine konstante Schlagfrequenz aufweist und auf dem Millimeterpapier eine senkrechte Aufzeichnung in einer Zeitspanne von mindestens zwei Kästchen zu sehen ist. Danach konnte die erste Konzentration der Testsubstanz von 1µl zugegeben werden.

3.11.5. Versuchsablauf –Ileum terminalis

Der präparierte Darm wurde in die Organhalterung gebunden und so schnell wie möglich in die mit Gas versorgte Nährstofflösung in die Apparatur A überführt.

Danach wurde der Schreiber eingeschaltet und der Stift auf die Nulllinie gestellt. Die Vorspannung des Organs erfolgte mit einem Feintrieb bei 5 mV. Der Stift rückte deshalb von seiner Startposition, weshalb er wieder auf die Null zurückgestellt werden musste.

Die Stoppuhr wurde auf 20 Minuten gestellt. Während dieser Gewöhnungszeit auf das neue Milieu wurde die Kaliumchlorid-Lösung vorbereitet, die eine maximale Muskelkontraktion des Darms erzwingen sollte. Für den Darm wurde eine 60 mmolare Kontraktion hergestellt, indem in 100 ml Nährstofflösung 0,45 g Kaliumchlorid gelöst wurde. Dadurch unterschied sich diese Lösung von der, die für die Versuche an den Aorta- und Lungenstammringen verwendet wurde, wo eine 90 mmolare Lösung hergestellt wurde.

Nachdem die 20-minütige Gewöhnungszeit abgelaufen war, wurde der Stift mit dem Zero-Drehrad auf die Null positioniert und mit den Tasten „Pen down“ und „Record on“ auf das Millimeterpapier gelegt. An dieser Stelle wurde die Nährstofflösung mit dem Öffnen der Klemme durch einen Gummischlauch vorsichtig abgelassen und möglichst schnell 25 ml der Kaliumchlorid-Lösung ins Organbad aufgefüllt.

Nach einer einstündigen Kontrollphase wies das Millimeterpapier eine konstante Kurve, was ein gutes Zeichen dafür war, dass die Zugabe der Versuchssubstanz – beginnend mit der niedrigsten Konzentration von 1 μ l – erfolgen darf.

3.12. Auswertung der Daten

3.12.1. Auswertung – Atrium cordis dextrum

Bei den Versuchen am rechten Vorhof wurde die Wirkung der Versuchssubstanz MGtr3 auf die Herzschlagfrequenz (Chronotropie) untersucht. Im Kapitel 4.5.1. wurde erklärt, dass die Schlagfrequenz des Herzens über eine Zeitspanne von ca. 12 Sekunden - das sind sechs Kästchen – alle fünf Minuten auf dem Millimeterpapier aufgezeichnet wurde.

Damit die Frequenz der Herzschläge pro Minute ausgerechnet wird, mussten alle Zacken der sechs Kästchen zusammengezählt und schließlich mit dem Faktor 5 multipliziert werden. Wenn das Organ nach drei Messungen eine konstante Zahl der Herzschläge erreicht hat, konnte die erste Konzentration der Versuchssubstanz mittels einer Pipette hinzugefügt werden.

Mit der Zugabe der Versuchssubstanz konnte eine Änderung der Frequenz der Herzschläge festgestellt werden. Diese Änderung konnte entweder eine Erhöhung oder eine Erniedrigung der Frequenz sein. Falls sich eine Schlagfrequenzerhöhung als Ergebnis herausstellen würde, dann würde sich um die positive Chronotropie handeln. Falls aber eine Erniedrigung der Schlagfrequenz festgestellt würde, dann würde das Ergebnis die negative Chronotropie sein.

3.12.2. Auswertung – Musculus papillaris

Bei den Papillarmuskelpräparaten wurde die Kontraktionskraft der Muskeln (Inotropie) nach der Zugabe der Versuchssubstanz untersucht. Die Auswertung wurde durchgeführt, indem mithilfe eines Lineals nach einer Gewöhnungsphase, die ca. 45 Minuten lang gedauert hat, die Zackenlänge, welche vom Schreiber aufgezeichnet wurde, gemessen wurde. Nachdem die Zacken dreimal in Folge gleich waren, wurde am Schreiber der Speed auf 20 mm/sec eingestellt. Somit konnten die einzelnen Amplituden genauer abgemessen werden.

Die Versuchssubstanz wurde mit einer Pipette gespritzt und nach einer 45-minütigen Wartezeit wurden die Zacken am Millimeterpapier aufgezeichnet. Bei einer Stromstärke von 5 mV wurde die eruierte Länge der Amplituden für alle Konzentrationen der

Versuchssubstanz mit dem Eichfaktor 0,98 und bei der Stromstärke von 2 mV mit Faktor 0,4 multipliziert. Die Kontrollphase wurde als 100 Prozent angenommen.

3.12.3. Auswertung – Aorta descendens, Arteria pulmonalis, Ileum terminalis

Bei den Versuchen an den Aorta- und Lungenstammpräparaten wurde die Wirkung der Versuchssubstanz auf die Vasodilatation untersucht, während beim absteigenden Teil des Dünndarms spasmolytische Aktivität erforscht wurde.

Um diese Wirkung sichtbar zu machen, mussten die Aorta- und Lungenstammringe mit 90 mmolarer Kaliumchlorid-Lösung vorkontrahiert werden. Die Versuchssubstanz wurde nach der Feststellung einer konstanten Schlagfrequenz hinzugefügt.

Alle 45 Minuten wurden zunehmende Konzentrationen der Versuchssubstanz dazugegeben. Anfangen wurde mit 1 µl – diese Zugabe der Versuchssubstanz galt als Referenzwert – und danach: 2, 7, 20 und letztendlich 70 µl. Das Millimeterpapier zeichnete währenddessen jeden Schritt auf.

Nachdem die Versuche beendet worden waren, wurde das Millimeterpapier aus dem Schreibgerät herausgenommen und mit dem Lineal die Abstände gemessen, zwischen der Nulllinie und den aufgezeichneten Stellen, wo die Versuchssubstanz Reaktionen bewirkt hat.

Die Versuche wurden bei verschiedenen Stromstärken durchgeführt, weshalb die eruierten Werte in cm mit einem Eichfaktor multipliziert werden und somit in mN umgewandelt werden mussten. Bei der Stromstärke von 5 mV musste mit dem Faktor 0,98 multipliziert werden, bei 2 mV mit 0,4 und bei 10 mV mit 2 x 0,98.

3.13. Statistik

Für die statistische Beurteilung der ausgewerteten Ergebnisse von den durchgeführten Versuchen wurde das Programm „Sigma Plot 9.0“ verwendet. Mit diesem Programm konnte der arithmetische Mittelwert (f_c) und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet werden.

Die Werte wurden dann graphisch dargestellt in einer Konzentrations-Wirkungskurve. Dabei stellte die Abszisse die pipettierte Konzentration der Versuchssubstanz in $\mu\text{mol/l}$ dar, während auf der Ordinate die Konzentrationskraft bzw. Schlagfrequenz in Prozenten eingetragen worden ist. Diese Kurve konnte eine mögliche wirksame Konzentration der Versuchssubstanz aufzeigen, bei welcher der Referenzwert um 50% geändert wird.

Zum Schluss wurde mit dem „Student-t-Test“ die statistische Signifikanz von den eruierten Ergebnissen der Messung ausgerechnet. Als signifikat wurden Messwerte bezeichnet, dessen Irrtumswahrscheinlichkeit bei weniger als 5% ($P < 0,05$) oder 1% ($P < 0,01$) gelegen hat, während als hochsignifikant die Messwerte mit geringerer Irrtumswahrscheinlichkeit als 0,1% ($P < 0,001$) eingestuft.

4. Ergebnisse

4.1. Wirkung von MGtr3 auf das Atrium cordis dextrum

Um den Einfluss der Testsubstanz von MGtr3 auf die Schlagfrequenz (Chronotropie) zu ermitteln, wurden die Untersuchungen am rechten Vorhof getestet. Hier wurden vier Versuche durchgeführt. Nachdem die Kontrollmessungen bis zur Konstanz gemacht wurden, wurde die Testsubstanz in den Konzentrationen 3; 10; 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ in einem Abstand von 45 Minuten eingespritzt. Mit der vermehrten Substanzzugabe sieht man eine leichte Abnahme der Chronotropie und bei der Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ ist mein Präparat abgestorben.

In den nachfolgender Tabelle sind die erhaltenen Mittelwerte und deren Standardfehler aufgelistet.

MGtr3 ($\mu\text{mol/l}$)	$f \pm \text{SEM}$ (mN)	$f \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
0	$223,75 \pm 12,64$	0 ± 0	4	-
3	$212,50 \pm 15,07$	$-5,22 \pm 2,81$	4	n.s
10	$210,00 \pm 16,20$	$-6,44 \pm 3,10$	4	0,05
30	$203,75 \pm 16,25$	$-9,28 \pm 2,98$	4	0,05
100	0 ± 0	-100 ± 0	4	0,001

Tabelle 5: Wirkung auf den rechten Vorhof von MGtr3

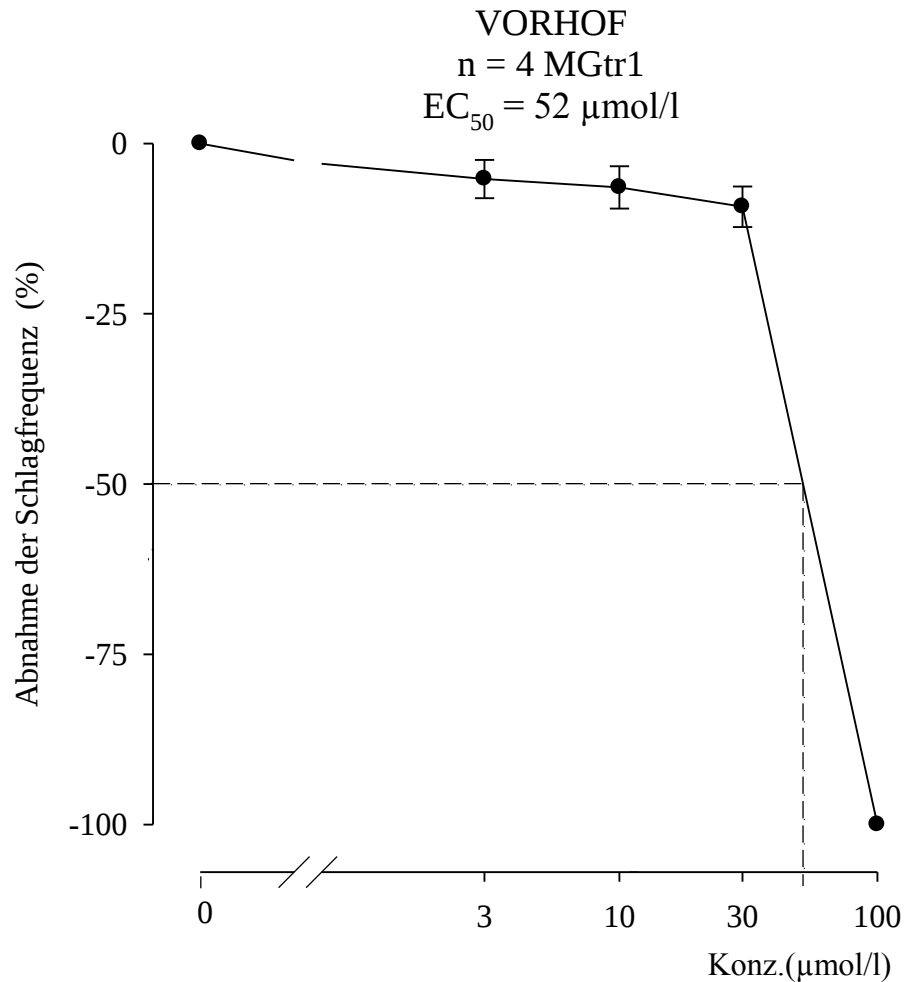


Abbildung 22 : Konzentrations- Wirkungskurve von MGtr3 am rechten Vorhof

Die Konzentrations-Wirkungskurve zeigt die Änderung der Schlagfrequenz des rechten Vorhofs bei den verschiedenen Konzentrationen. Aus dem Diagramm wird die effektive Konzentration (EC₅₀) ermittelt.

Auf der Ordinate (y- Achse) ist die Abnahme der Schlagfrequenz in Prozent und auf der Abszisse (x-Achse) die Konzentration in µmol/l eingetragen. Die Punkte stellen die arithmetische Mittelwerte der Schlagfrequenz und die senkrechte Balken den Standardfehler dar.

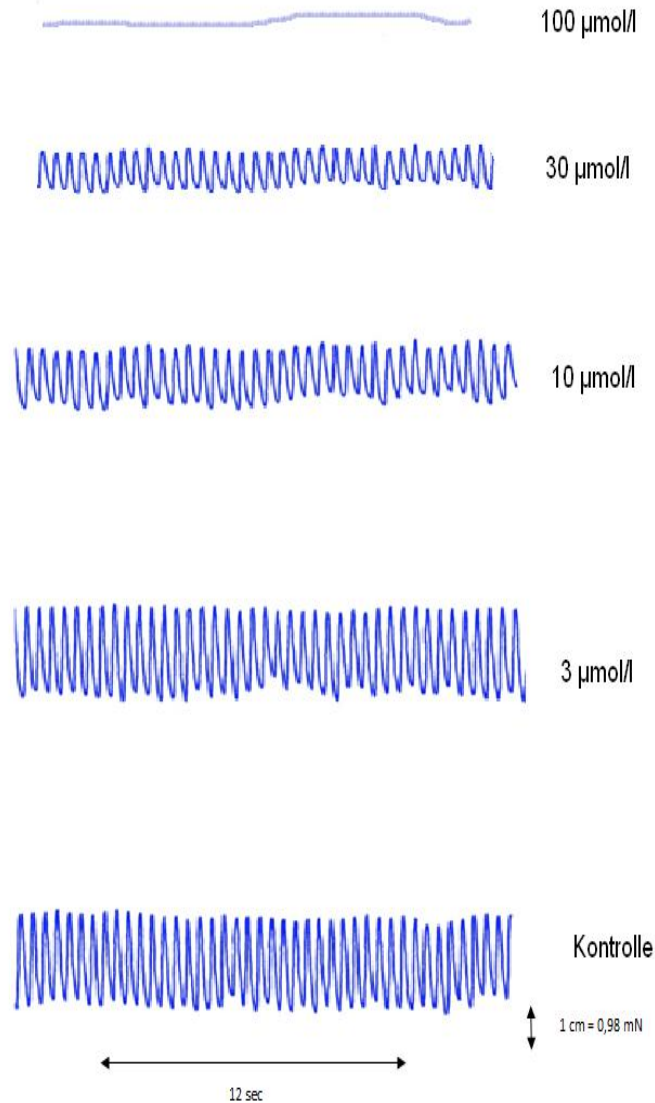


Abbildung 23: Originalabbildung der chronotropen Wirkung von MGtr3 auf den rechten Vorhof

Die Originalabbildung veranschaulicht die Änderung der Schlagfrequenz des rechten Vorhofs in Abhängigkeit der Substanzkonzentration, welche anhand der Ausschläge des Schreibers pro Minute berechnet wurde. Bei der Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ konnte ein Herzstillstand festgestellt werden.

4.2. Die Wirkung von MGtr3 auf den Musculus papillaris

Um den Einfluss der Testsubstanz von MGtr3 auf die Kontraktionskraft (Inotropie) des Papillarmuskels zu ermitteln, wurden 4 Versuche durchgeführt. Die Kontraktion erfolgte durch eine elektrische Reizung. Hier wurde mit der Kontrollmessungen begonnen, wenn der in die Versuchsanordnung eingespannte Musculus Papillaris im Organbad an das Milieu angepasst hatte. In einem Intervall von 45 Minuten erfolgte die Substanzzugabe mit der jeweiligen Konzentration in den Organkammer.

Der Kontrollwert betrug $1,53 \pm 0,28$ mN. Die weiteren Applikationen der Testsubstanz führten zu einer leichten Abnahme der Kontraktionskraft.

In der Tabelle werden die unterschiedlichen Konzentrationen, Änderung der Inotropie (in mN und % angeführt), Anzahl der Versuche und die Irrtumswahrscheinlichkeit dargestellt.

MGtr3 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
0	$1,53 \pm 0,28$	0 ± 0	4	-
3	$1,28 \pm 0,17$	$-13,12 \pm 7,62$	4	0,05
10	$1,29 \pm 0,25$	$-16,63 \pm 4,49$	4	0,05
30	$1,26 \pm 0,31$	$-20,16 \pm 5,44$	4	0,05
100	$1,12 \pm 0,25$	$-27,32 \pm 4,37$	4	0,05

Tabella 6: Wirkung von MGtr3 auf den Musculus Papillaris

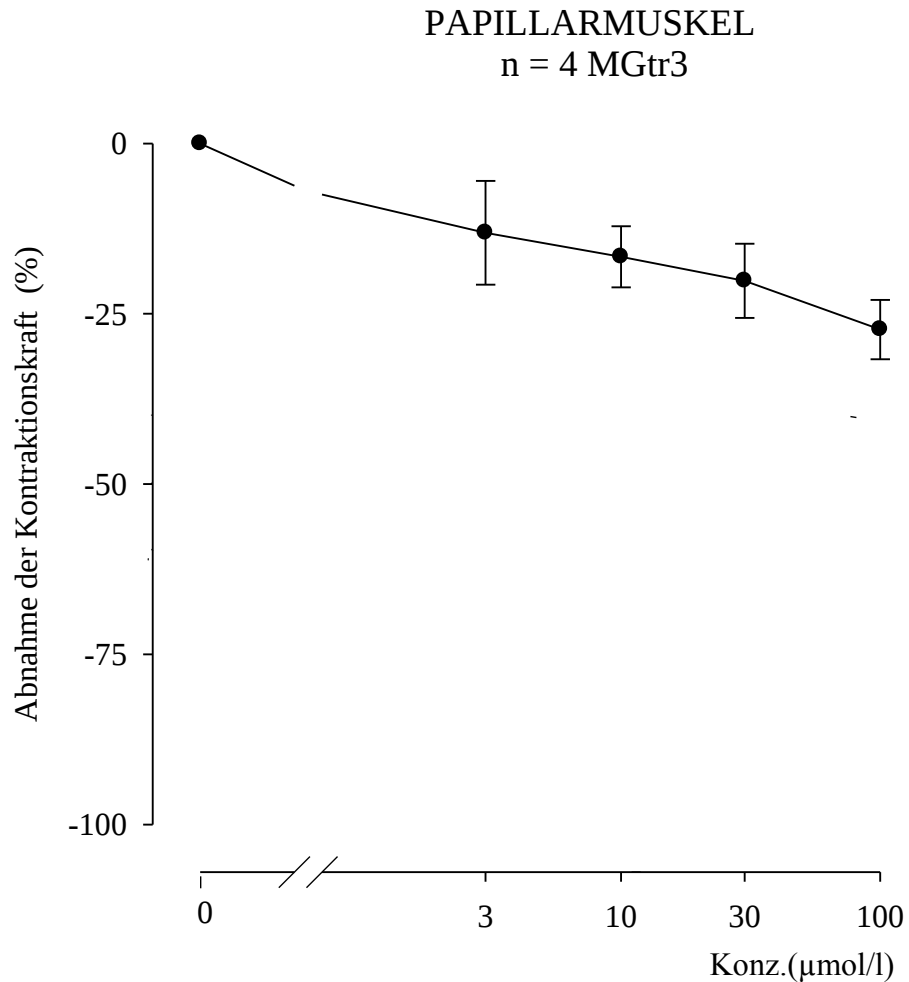


Abbildung 24: Konzentrations-Wirkungskurve von MGtr3 am Papillarmuskel

Im Diagramm wird die Wirkung der Testsubstanz MGtr3 auf die Inotropie graphisch dargestellt. Die x-Achse zeigt die zugegebenen Konzentrationen in µmol/l und die y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent.

Die Konzentrations-Wirkungskurve veranschaulicht, dass bei den Versuchen am Papillarmuskel kein EC₅₀-Wert erreicht wurde.

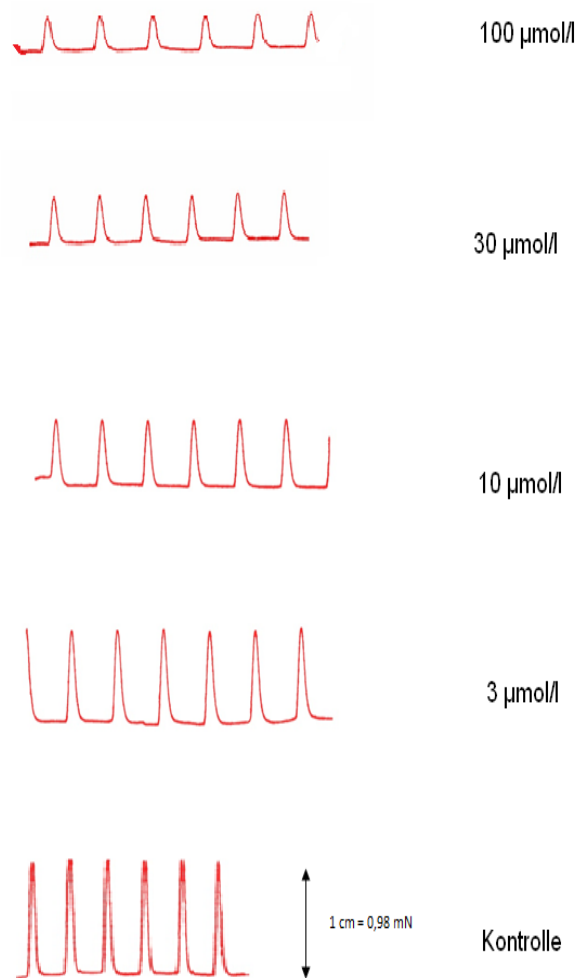


Abbildung 25: Originalaufzeichnung der Wirkung von MGtr3 auf den Musculus papillaris

Die Originalabbildung zeigt, dass es einen geringen Unterschied in der Amplitudenlänge zwischen den einzelnen Messungen besteht.

4.3. Die Wirkung von MGtr3 auf Aorta descendes

Zur Prüfung der Auswirkung von der Testsubstanz MGtr3 auf die Kontraktionskraft der Aorta wurden ebenfalls 4 Versuche durchgeführt. Zu Beginn der Versuche wurde das isolierte Organ mit 90mmolaren KCl-Lösung versetzt, um eine maximale Vorkontraktion zu erreichen und der erhaltene Wert wurde als Kontrollwert genommen. In einem Abstand von 45 Minuten wurde die Testsubstanz in den entsprechenden Konzentrationen (3; 10; 30; 100 $\mu\text{mol/l}$) zugesetzt. Aus den erhaltenen Messergebnissen die aritmetische Mittelwerte (f_c) und den Standardfehler (SEM) bestimmt.

In der nachfolgenden Tabelle findet man sämtliche Werte. Die Änderung der Kontraktionskraft wird in mN und % angegeben.

Der Kontrollwert betrug $12,42 \pm 2,65$ mN. Bei der Zugabe von $3\mu\text{mol/l}$ MGtr3 kam es kaum zu einer deutlichen Veränderung der Kontraktionskraft. Ab der Zugabe von $10\mu\text{mol/l}$ MGtr3 wurde eine lineare Abnahme der Kontraktionskraft beobachtet.

MGtr3 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
0	$12,42 \pm 2,65$	0 ± 0	4	-
3	$11,78 \pm 2,52$	$-4,90 \pm 1,41$	4	n.s
10	$10,91 \pm 2,40$	$-12,48 \pm 1,57$	4	0,05
30	$9,22 \pm 2,19$	$-27,36 \pm 2,91$	4	0,01
100	$5,52 \pm 1,55$	$-58,11 \pm 4,14$	4	0,01

Tabelle 7: Wirkung von MGtr3 auf die Aorta descendes

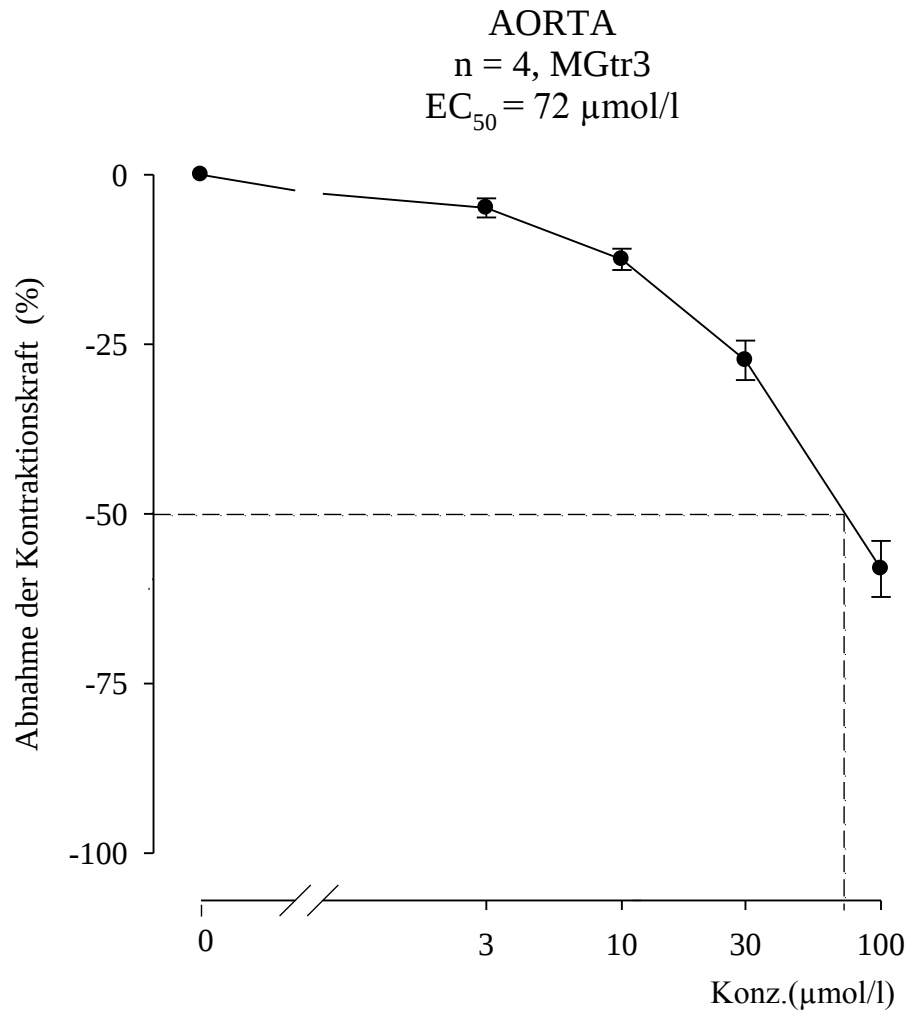


Abbildung 26: Konzentrations-Wirkungskurve von MGtr3 an der Aorta

Die Abszisse zeigt die halblogarithmisch eingetragenen Konzentrationen in µmol/l, die Ordinate die Änderung der Kontraktionskraft in %. Hier beträgt der EC₅₀ -Wert 72 µmol/l. Die senkrechte Balken sollen den Standardfehler zeigen.

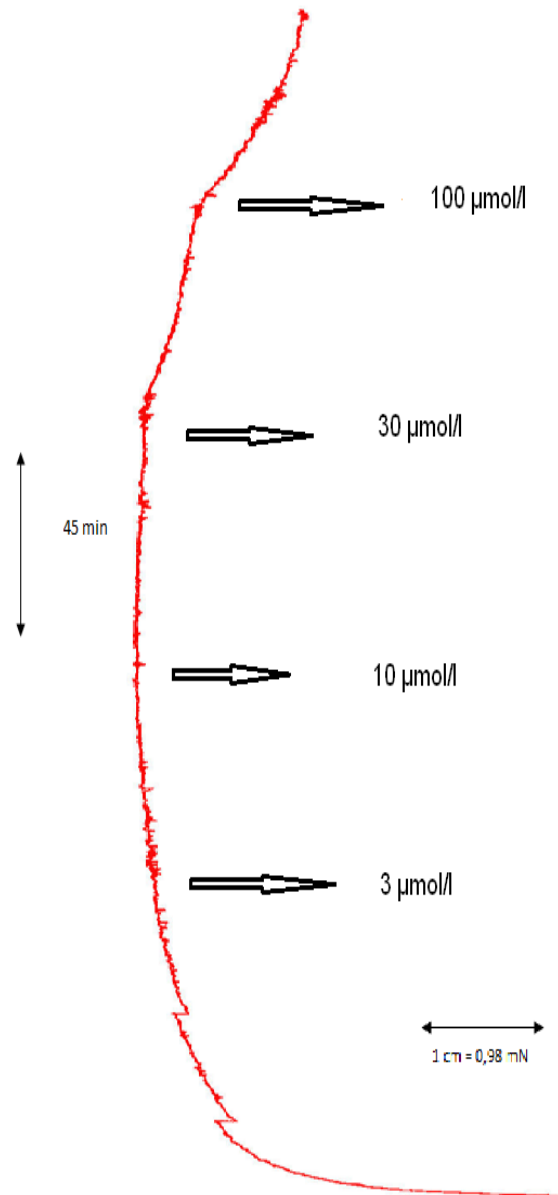


Abbildung 27: Originalaufzeichnung der Wirkung von MGtr3 auf die Aorta descendens

Anhand dieser Originalabbildung sieht man, dass der dilatierende Effekt von MGtr3 auf die Aorta ab der Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ deutlicher ist.

4.4. Wirkung von MGtr3 an Arteria pulmonalis

An der Pulmonalarterie wurde der dilatierende Effekt von der Testsubstanz MGtr3 geprüft. Zu diesem Zweck wurden 4 Versuche durchgeführt. Zuerst wurde das isolierte Organ mit KCl-Lösung maximal kontrahiert und der erhaltene Wert wurde als Kontrollwert genommen. Nach dem Erreichen der Plateuphase wurde die Testlösung in jeweiligen Konzentrationen (3; 10; 30; 100 $\mu\text{mol/l}$) in einem Intervall von 45 Minuten eingespritzt.

Die Tabelle zeigt die verwendeten Konzentrationen der Testsubstanz und die Mittelwerte der Kontraktionskraft. Dazu sind noch die Versuchsanzahl und Irrtumswahrscheinlichkeit zu sehen. Der Kontrollwert betrug $12,91 \pm 1,92$ mN. Es wurde in Abhängigkeit der zugegebenen Konzentrationen eine lineare Abnahme registriert.

MGtr3 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
0	$12,91 \pm 1,92$	0 ± 0	4	-
3	$12,25 \pm 1,80$	$-5,00 \pm 0,99$	4	n.s
10	$11,49 \pm 1,69$	$-10,90 \pm 0,89$	4	0,05
30	$9,66 \pm 1,37$	$-24,97 \pm 1,16$	4	0,05
100	$4,89 \pm 0,95$	$-63,10 \pm 3,95$	4	0,01

Tabelle 8: Wirkung von Mgtr3 auf die Arteria pulmonalis

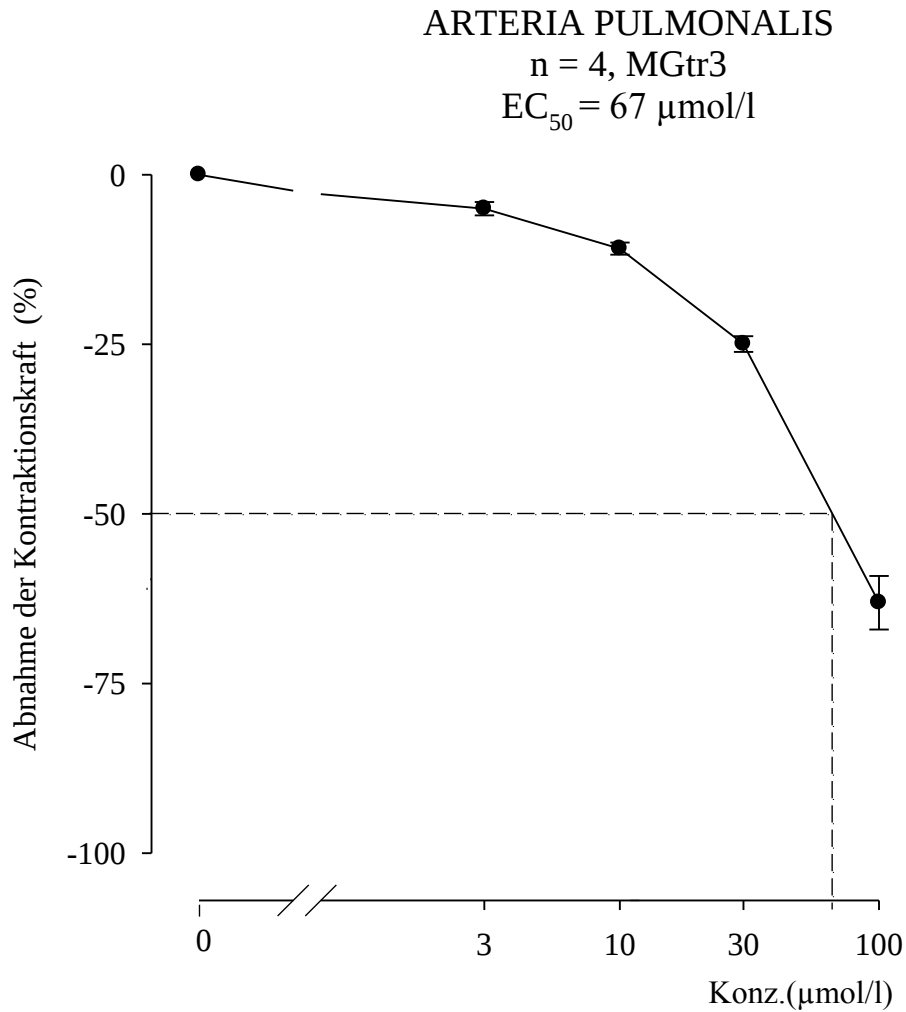


Abbildung 28: Konzentrations-Wirkungskurve von MGtr3 an der Arteria pulmonalis

Die x-Achse zeigt die zugegebenen Konzentrationen in µmol/l und y-Achse die Änderung der Kontraktionskraft in Prozent. Die Punkte stellen die Mittelwerte der Versuchsergebnisse dar. Bei ansteigender Konzentration ist eine signifikante Abnahme der Kontraktion anhand der Kurve zu erkennen. Der EC₅₀-Wert ist hier bei 67 µmol/l.

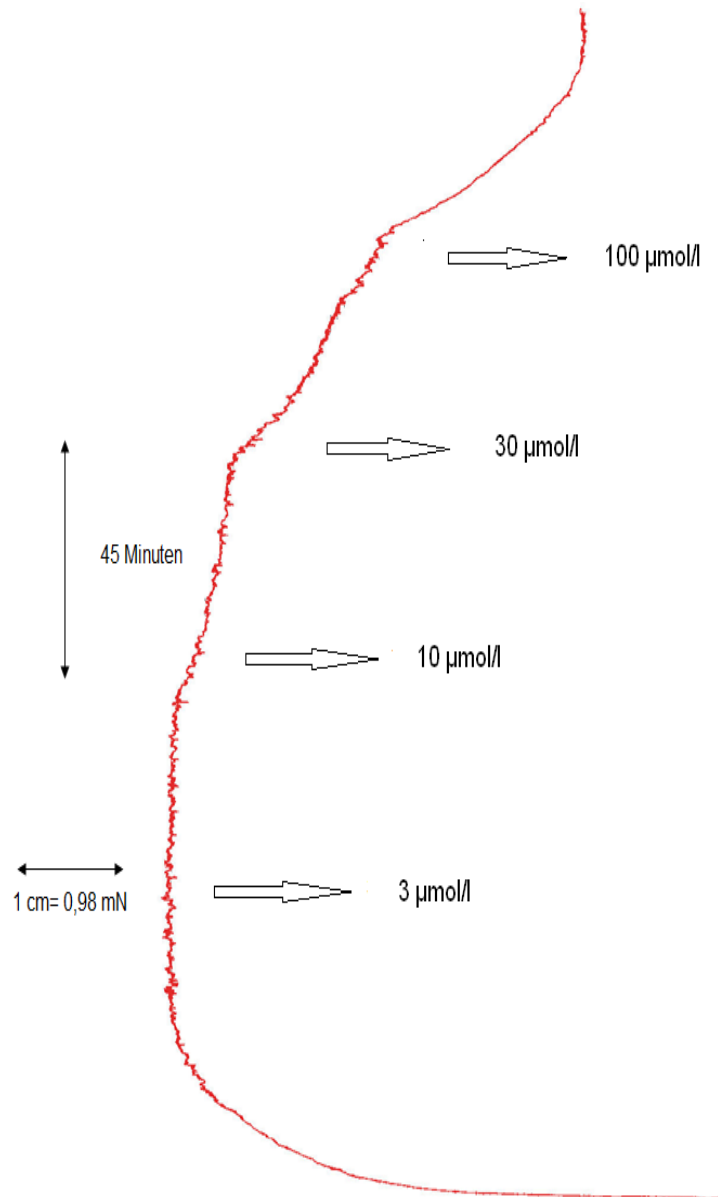


Abbildung 29: Originalaufzeichnung der Wirkung von MGtr3 auf die Pulmonalarterie

Die Originalaufzeichnung des Versuches veranschaulicht, dass es vor allem ab einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ zu einer deutlichen Änderung der Kurve kam.

4.5. Wirkung von MGtr3 am Ileum terminalis

Im Rahmen von 4 Versuchsdurchgängen wurde die Wirkung der Testsubstanz auf die Kontraktion des Darms untersucht. Zuerst wurde das fertig präparierte Darmstück in die Versuchsassaparatur eingespannt und KCl-Lösung dazugegeben um eine Vorkontraktion zu erzielen. Nach dem Erreichen der Plateauphase wurde die Testsubstanz in den Konzentrationen 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ zugesetzt.

In der nachfolgenden Tabelle wurden die aritmetische Mittelwerte und der Standardfehler dargestellt. Die Ergebnisse wurden sowohl in mN und als auch in % angegeben. Aus der Tabelle ist eine signifikante Verminderung der Kontraktionskraft nach kumulativer Substanzzugabe bis zum Wert von $2,01 \pm 0,24$ mN ersichtlich.

MGtr3 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
0	$10,39 \pm 1,26$	0 ± 0	4	-
3	$10,09 \pm 1,37$	$-3,38 \pm 1,97$	4	n.s
10	$8,84 \pm 1,31$	$-15,08 \pm 5,72$	4	0,05
30	$5,82 \pm 1,18$	$-44,45 \pm 7,31$	4	0,01
100	$2,01 \pm 0,24$	$-80,65 \pm 0$	4	0,001

Tabelle 9: Wirkung von MGtr3 auf das terminale Ileum

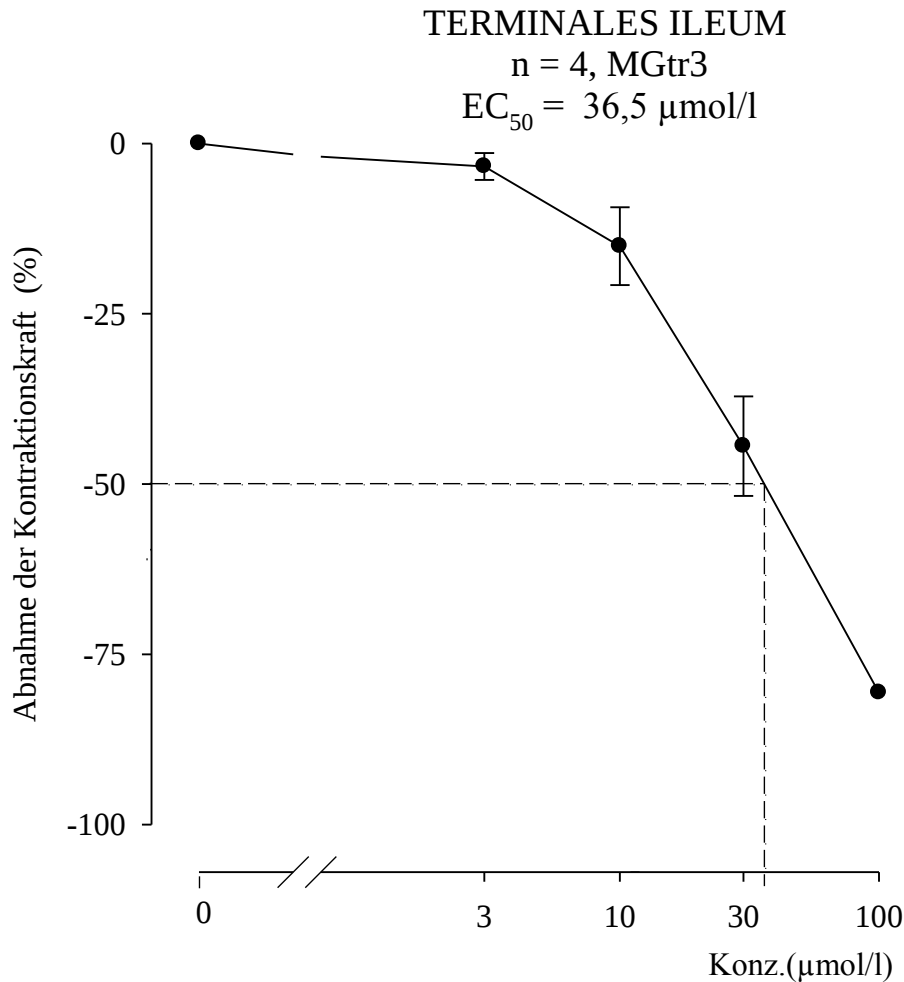


Abbildung 30: Konzentrations-Wirkungskurve von MGtr3 am terminalen Ileum

Mit Hilfe von „Sigma Plot 9.0“ wurden die Messwerte graphisch dargestellt. Auf der x-Achse wurde die Konzentration in µmol/l aufgetragen und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Die Punkte stellen die Mittelwerte dar und die Balken deren Standardfehler. Die strichlierte Linien kennzeichnen die EC₅₀-Wert. Der Graph zeigt, dass ab eine Konzentration von 3 µmol/l die Abnahme der Kontraktionskraft des Darms zu sehen ist und dass hier der EC₅₀-Wert bei 36,5 µmol/l liegt. Das bedeutet, dass es die Substanzkonzentration von 36,5 µmol/l benötigt, um die 50%ige Abnahme der Kontraktionskraft zu erreichen.

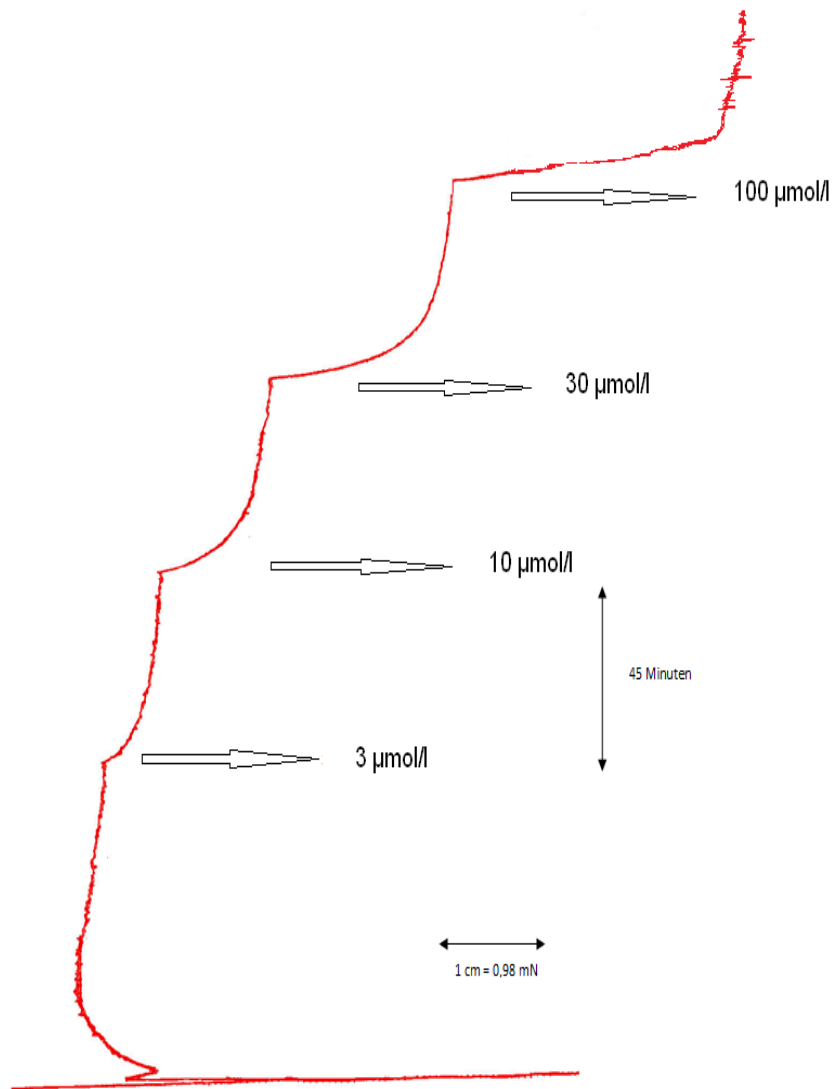


Abbildung 31: Originalaufzeichnung der Wirkung von MGtr3 auf das terminale Ileum

Die Originalabbildung zeigt die kontinuierliche Aufzeichnung der Kontraktionskurve mittels Schreiber. Anhand der Kurve ist der spasmolytische Effekt deutlich erkennbar.

4.6. Untersuchung des Wirkmechanismus MGtr3 am Ileum terminalis

Weil die zu prüfende Substanz MGtr3 am Darm einen relaxierenden Effekt zeigte, wurden 3 weitere Versuche in jeweiligen Konzentrationen (30; 100 $\mu\text{mol/l}$) durchgeführt. Somit wurde die genauere Untersuchung der Wirkmechanismus des MGtr3 ermöglicht. Dazu wurde die Substanz Glibenclamid, welcher die ATP-abhängigen Kaliumkanäle blockiert, verwendet, um erkennen zu können, ob die spasmolytische Wirkung von der Testsubstanz MGtr3 auf einer Öffnung der K_{ATP} -Kanäle des Darms beruht.

4.6.1. Glibenclamid

Glibenclamid ist ein orales Antidiabetikum aus der Gruppe der Sulfonylharnstoff. Diese Substanz wird bei der Behandlung von Typ-2-Diabetikern angewendet. Die blutzuckersenkende Wirkung der Glibenclamid kommt durch die Blockierung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle in der β -Zellen des Pankreas zustande. Auf diese Weise wird der Ausstrom dieser Ionen aus der β -Zellen gehemmt, was eine Depolarisation der Zellmembran zur Folge hat. Dadurch kommt es zu einer Öffnung spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle, wonach Calcium vermehrt in die Zellen einströmt und die Ausschüttung von Insulin stimuliert. Damit Glibenclamid wirken kann, darf keiner vollständige Insulinmangel vorhanden sein.

4.6.2. Wirkung von MGr3 unter dem Einfluss von Glibenclamid 30 $\mu\text{mol/l}$

Das fertig präparierte Darmstück wurde in die Versuchsanordnung A eingespannt und eine Vorspannung bei einer Stromstärke von 5 mV eingestellt. Nach 20 Minuten wurde KCl-Lösung zugegeben, um maximale Kontraktion zu erreichen. Nach dem Erreichen der Plateauphase wurde der Antagonist Glibenclamid in der Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ zugesetzt und danach 45 Minuten gewartet. In weiterer Folge wurde 40 $\mu\text{mol/l}$ von der zu untersuchenden Substanz MGr3 zugefügt. Das wurde der Konzentration des EC_{50} -Wertes auf das terminale Ileum angepasst.

In der Tabelle ist die verwendeten Substanzkonzentrationen und die Mittelwerte der Kontraktionskraft zu sehen.

Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Versuche (n)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrollwert	$8,27 \pm 1,41$	3	-
30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid	$5,18 \pm 0,79$	3	-
40 $\mu\text{mol/l}$ MGr3	$2,55 \pm 0,95$	3	0,05

Tabelle 10: MGr3-Wirkung an mit 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid vorbehandelten terminalen Ileum

**Terminales Ileum, Glibenclamid
MGtr3, 40 $\mu\text{mol/l}$
n=4**

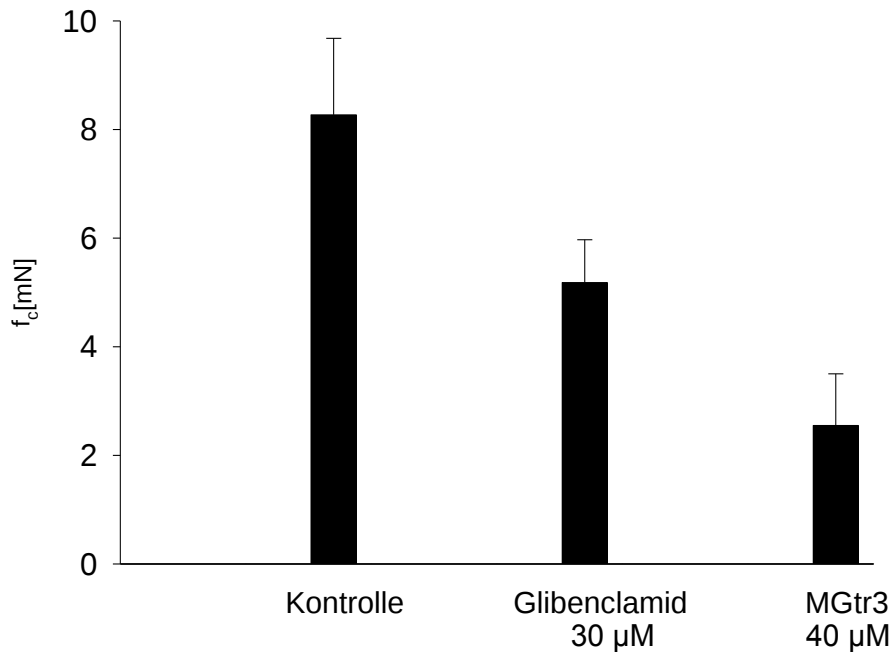


Abbildung 32: Graphische Darstellung der Wirkung von MGtr3 am terminalen Ileum unter Einfluss von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid

Auf der x-Achse wurden die Mittelwerte der Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$, auf der y-Achse die Kontraktionskraft in mN angegeben.

Der erste Balken zeigt die Kontrolle, der mittlere die Kontraktionskraftänderung am terminalen Ileum durch 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und der letzte Balken stellt die Kombination von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und 40 $\mu\text{mol/l}$ MGtr3 dar. Die strichförmige Verlängerung präsentiert den Standardfehler.

Anhand des Diagramms erkennt man, dass es durch Hinzufügen von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid zu einer leichten Abnahme der Kontraktionskraft kommt und es nach der Zugabe von MGtr3 zu einer weiteren Abnahme der Kontraktionskraft kommt.

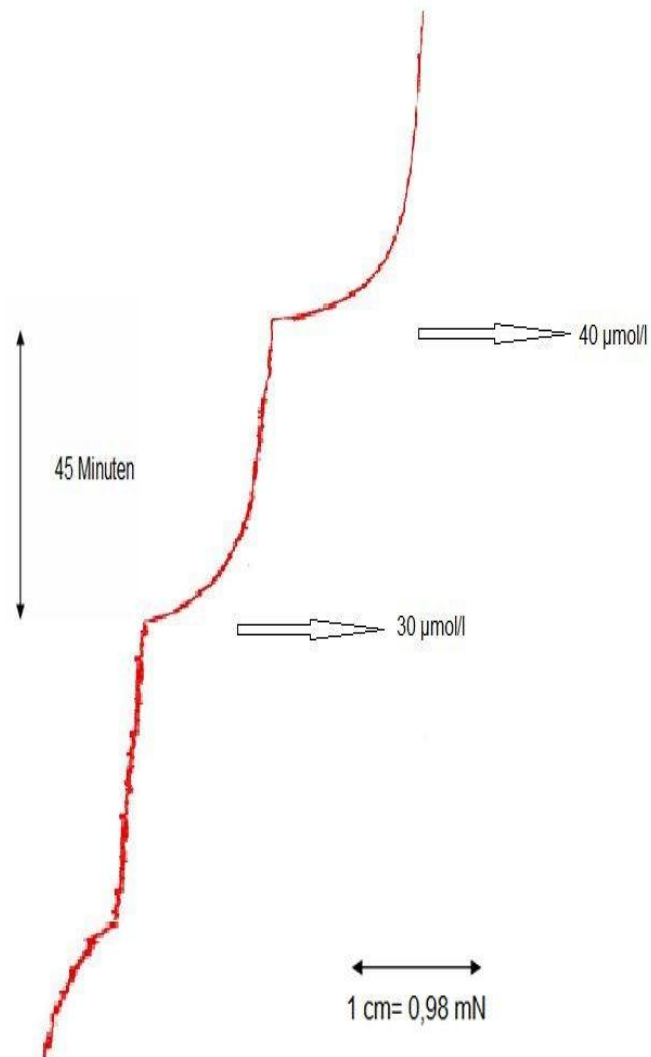


Abbildung 33: Originalaufzeichnung von MGtr3-Wirkung am terminalen Ileum unter Einfluss von 30 µmol/l Glibenclamid

Die Originalabbildung veranschaulicht die Abnahme der Kontraktionskraft durch Zusatz von 30 µmol/l Glibenclamid und von 40 µmol/l MGtr3.

4.6.3. Wirkung von MGtr3 unter dem Einfluss von Glibenclamid 100 µmol/l

Die Versuchsdurchführung erfolgt wie bereits oben erwähnt.

Der Unterschied zu den ersten 3 Versuchsreihen besteht darin, dass hier bei diesen Versuchen 100 µmol/l Glibenclamid statt 30 µmol/l zugefügt wurden.

Die Tabelle gibt wieder die ermittelte aritmetrische Mittelwerte und deren Standardfehler an.

Konzentration (µmol/l)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrollwert	$8,42 \pm 1,29$	3	-
100 µmol/l Glibenclamid	$4,22 \pm 0,82$	3	-
40 µmol/l MGtr3	$1,27 \pm 0,44$	3	0,05

Tabelle 11: Wirkung von MGtr3 unter dem Einfluss von Glibenclamid 100 µmol/l

**Terminales Ileum, Glibenclamid
MGtr3, 40 $\mu\text{mol/l}$
n=4**

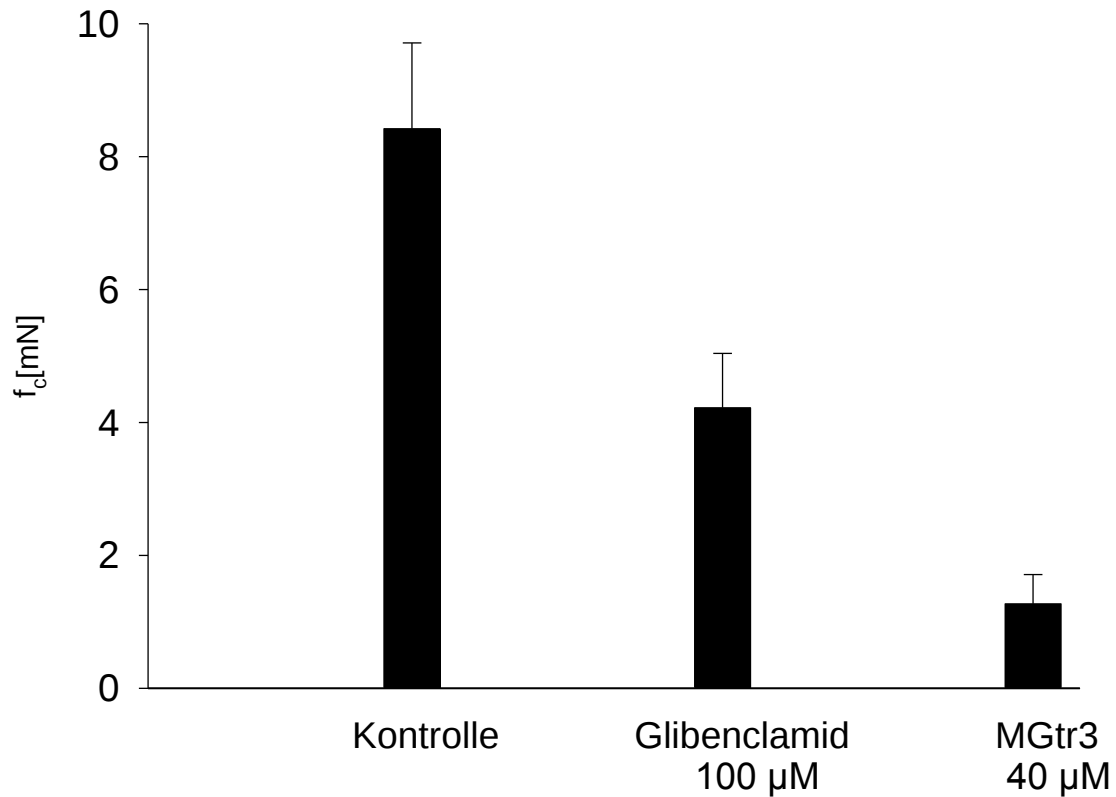


Abbildung 34: Graphische Darstellung der Wirkung von MGtr3 am terminalen Ileum unter Einfluss von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid

Auf der Abszisse wurden die Mittelwerte der Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen, auf der Ordinate die Kontraktionskraft in mN. Die Balken symbolisieren die Mittelwerte der 3 Versuche.

Der Diagramm präsentiert, dass es durch die Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid zu einer deutlichen Abnahme der Kontraktionskraft kommt und durch eine weitere Applikation von 40 $\mu\text{mol/l}$ MGtr3 die Abnahme der Kontraktionskraft stärker wird.

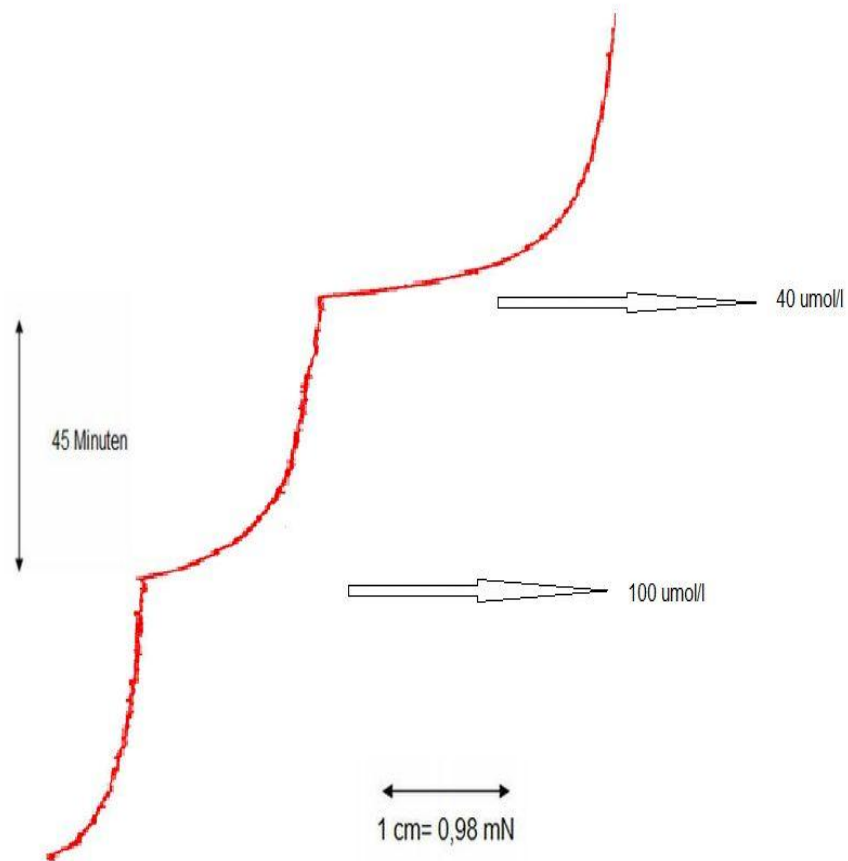


Abbildung 35: Originalaufzeichnung von MGtr3-Wirkung am terminalen Ileum unter Einfluss von 100 µmol/l Glibenclamid

Die Originalabbildung veranschaulicht die eindeutige Abnahme der Kontraktionskraft durch Zusatz von 100 µmol/l Glibenclamid und von 40 µmol/l MGtr3.

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die Wirkung und Wirkmechanismus von neu synthetisierter Substanz MGtr3 auf isolierten Meerschweinchenorganpräparaten untersucht. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuchsreihen wurden im Kapitel 6 beschrieben. In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse interpretiert und diskutiert werden

5.1. Wirkung von MGtr3 auf den quergestreiften Herzmuskel

Vom Herzmuskel wurden der Atrium dextrum auf die chronotrope Wirkung und der Musculus papillaris auf die inotrope Wirkung untersucht.

Beim rechten Vorhof kam es erst zu einer geringen Reduktion der Schlagfrequenz und ab einer Konzentration 100 $\mu\text{mol/l}$ konnte eine hochsignifikante negativ-chronotrope Wirkung auf die spontan schlagenden Vorhöfe nachgewiesen werden. Der EC_{50} -Wert liegt hier bei 52 $\mu\text{mol/l}$. Der Kontrollwert lag bei $223,75 \pm 12,64$ Schlägen pro Minute. Bei einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ ist mein Präparat abgestorben. Das bedeutet, dass es bei 100 $\mu\text{mol/l}$ keine Schläge mehr zu sehen ist.

Hinsichtlich der inotropen Wirkung auf den Papillarmuskel zeigte MGtr3 keine starke Änderung der Kontraktionskraft und konnte kein EC_{50} -Wert ermittelt werden.

In der nachfolgenden Tabelle wird klar dargestellt, dass MGtr3 eine starke Wirkung auf den rechten Vorhof hat und negativ Chronotrop wirkt, jedoch auf den Papillar nur eine schwache inotrope Wirkung zeigt. Beim Papillarmuskel wurde bei einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ eine Abnahme der Kontraktionskraft $-27,32 \pm 4,37$ % verzeichnet.

Organpräparat	MGtr3 $f_c \pm \text{SEM} (\%)$ bei 100 $\mu\text{mol/l}$	EC ₅₀ -Wert ($\mu\text{mol/l}$)
Rechter Vorhof	-100 $\pm$ 0	52 $\mu\text{mol/l}$
Papillarmuskel	-27,32 $\pm$ 4,37	>100 $\mu\text{mol/l}$

Tabelle 12: Vergleich Papillarmuskel und rechter Vorhof

5.2. Wirkung von MGtr3 auf glattemuskuläre Organe

Die verwendeten glattemuskulären Organe waren Aorta, Arteria Pulmonalis und Ileum terminalis. Zu Beginn der Versuche wurden die Aorta und die Pulmonalarterie mit Hilfe einer 90 mikromolaren Kaliumchlorid-Lösung und das terminale Ileum 60 mikromolaren Kaliumchlorid-Lösung vorkontrahiert. Dadurch erreichte man einen konstanten Kontraktionstonus, so dass eine spasmolytische bzw. dilatierende Wirkung untersucht werden konnte.

Eine Übersicht zeigt folgende Tabelle.

Organpräparat	MGtr3 $f_c \pm \text{SEM} (\%)$ bei 100 $\mu\text{mol/l}$	EC ₅₀ -Wert ($\mu\text{mol/l}$)
Aorta descendens	-58,11 $\pm$ 4,14	72 $\mu\text{mol/l}$
Arteria pulmonalis	-63,10 $\pm$ 3,95	67 $\mu\text{mol/l}$
Terminales ileum	-80,65 $\pm$ 0	36,5 $\mu\text{mol/l}$

Tabelle 13: Vergleich der glattemuskulären Organe

Anhand dieser Tabelle ist ersichtlich, dass MGtr3 eine starke Wirkung auf glattemuskuläre Organe hat.

In den Untersuchungen mit MGtr3 konnte in Anhängigkeit von kumulativer Substanzzugabe eine stetige Abnahme der Kontraktionskraft an der glatten Muskulatur nachgewiesen werden. Der tiefste Wert wurde bei 100 $\mu\text{mol/l}$ erreicht.

Die Testsubstanz MGtr3 übte auf der Aorta und auf der Arteria Pulmonalis sehr ähnliche Wirkungen aus. Bei beiden Organen war die konzentrationsabhängige zunehmende Dilatation an der glatten Muskulatur zu erkennen. Die EC_{50} -Wert konnte bei der Aorta bei einer Konzentration von 72 $\mu\text{mol/l}$ und bei der Pulmonalarterie bei einer Konzentration von 67 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt werden.

Die stärkste relaxierende Wirkung von MGtr3 wurde auf dem terminalen Ileum aufgezeigt, welche ab einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ zu einer statistisch signifikanten Kontraktionsänderung erreicht werden konnte. Hier betrug EC_{50} -Wert 36,5 $\mu\text{mol/l}$. Der Kontrollwert lag bei $10,39 \pm 1,26 \text{ mN}$. Bei einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ kam es zu einer Reduktion der Kontraktion von $-80,65 \pm 0 \%$ und der Endwert betrug $2,01 \pm 0,24 \text{ mN}$.

Nachdem die Substanz am Darm am stärksten dilatierend wirkt, wurde der Antagonist Glibenclamid zugesetzt, damit der Wirkmechanismus von MGtr3 genauer untersucht werden kann. Insgesamt wurden 6 Versuche durchgeführt. Die ersten drei Versuche erfolgten mit einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und die weitere drei Versuche mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid. Durch diese Versuche erklärte man, ob die spasmolytische Wirkung von der Testsubstanz MGtr3 auf einer Öffnung der K_{ATP} -Kanäle des Darms beruht.

Bei den Versuchen mit 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid kam es zu einer leichten Dilatation des Darms durch 40 $\mu\text{mol/l}$ MGtr3, was durch eine Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid stärker zu erkennen war. Das erklärt, dass die relaxierende Wirkung wahrscheinlich nicht durch die Öffnung der ATP-abhängige-Kalium-Kanal zustande gekommen ist. Daraus kann man schließen, dass die andere Wirkmechanismen in Frage kommen.

6. Zusammenfassung

In Rahmen dieser Arbeit wurde die in-vitro-Untersuchung der neu synthetisierten Testsubstanz MGtr3 an fünf isolierten Organen durchgeführt. Die verwendete Organe waren die glatt-muskuläre Organe, die Aorta, Arteria pulmonalis und das Ileum terminalis und die quergestreifte Muskulatur des rechten Vorhofs und des Papillarmuskels.

An den glatt-muskuläre Organen wurde die Wirkung der MGtr3 auf die Änderung der Kontraktionskraft überprüft. Am Papillarmuskel wurde der Einfluss auf die Inotropie getestet, während am rechten Vorhof auf die positive und die negative Chronotropie.

Um ein repräsentative und reproduzierbare Ergebnisse gewährleisten zu können, wurden pro Organ mindestens 4 Versuche durchgeführt. Dabei wurde der Testsubstanz MGtr3 in ansteigenden Konzentrationen 3; 10; 30; und 100 $\mu\text{mol/l}$ in ein Organbad zugesetzt und die Reaktion der Organpräparate wurde mit Hilfe eines Schreibers registriert. Die isometrische Kontraktionsmessungen ermöglichte die Untersuchung der spasmolytischen Wirkung, sowie der Einfluss auf die Inotropie und Chronotropie der Organpräparate.

Am Papillarmuskel zeigte die Testsubstanz eine leichte negativ-inotrope Wirkung und hier wurde der EC_{50} Wert nicht erreicht. Am rechten Vorhof wurde eine starke negativ-chronotrope Wirkung beobachtet und bei der Endkonzentration ist das Organpräparat abgestorben.

Die Testsubstanz MGtr3 führte bei allen glatt-muskulären Organe zu einer Reduktion der Kontraktionskraft. Die stärkste spasmolytische Wirkung wurde am Darm gezeigt, deswegen es wurde der Wirkmechanismus der Testsubstanz herangezogen. Dabei wurde der Glibenclamid verwendet. Mit dem Glibenclamid blockierte man den K_{ATP} -Kanal. Wie schon oben erwähnt, ist die dilatierende Wirkung vom MGtr3 vermutlich nicht durch die Öffnung des K_{ATP} -Kanals entstanden, wahrscheinlich auch noch andere

Wirkmechanismen eine Rolle spielen. Daher für Untersuchung eines möglichen Wirkungsmechanismus wären noch weitere Versuche notwendig.

Literaturverzeichnis

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Hosoki R, Matsuki N, Kimura H (1997) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 527-531.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R (2001) The vasorelaxant effect of H₂S 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) Hydrogen sulphide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats, *J Appl Physiol* 102:261-268.

7. Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Hatice KAPLAN

Geburtsdatum: 25. 02. 1985

Geburtsort: Malatya/ Türkei

Familienstand: Ledig

Staatsbürgerschaft: Türkei

Email: hatikaplan@hotmail.com

Ausbildung:

1990-1995 Grundschule Yahya Kemal Beyatli

1995-1998 Gymnasium Unterstufe Imam Hatip

1998-2002 Gymnasium (AHS) Anatolia Turgut Özal

2003-2004 Vorstudienlehrgang- Deutsch Kurs

2004-2005 Universität Wien- Zahnmedizin

Seit 2006 Universität Wien- Pharmazie

Berufserfahrung:

2007- 2012 angestellt als Kinderbetreuerin im Verein Projekt Integrationshaus

2009- heute Eventangestellte bei WienXtra