



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Pharmakologisches Screening eines neu synthetisierten
Thiokohlensäurederivates (MAH 48.HCl) an isolierten
Meerschweinchenorganen“

verfasst von

Wolfgang Galster

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Pharmazie

Betreut von: Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

DANKSAGUNG

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner ganzen Familie, die mir nicht nur das Studium ermöglicht hat, sondern die es auch verstand mich in den zahlreichen, schwierigen Situationen des Studiums immer wieder neu zu motivieren. Ganz besonders gilt der Dank meiner Oma.

Ein besonderer Dank gebührt meinem Diplomarbeitsbetreuer Ao. Uni.-Prof. Dr. Christian Studenik, der mir ermöglicht hat, an dem, in der Diplomarbeit behandeltem Thema, zu forschen. Er verstand es, mich mit freundlichen Worten zu motivieren, und stand mir stets mit seiner fachlichen Kompetenz zur Seite.

Ein Dank gilt auch der Arbeitsgruppe des Departments für Pharmazeutische Chemie rund um Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker, die nicht nur meine Testsubstanz bereitgestellt haben, sondern bei der ich auch jahrelang als Tutor in der Lehre, im Praktikum „Arzneistoffanalytik“, mitwirken durfte.

Abschließend danke ich den besten Freunden und Kollegen, die man sich wünschen kann. Durch den Zusammenhalt wurde das scheinbar Unüberwindbare doch möglich gemacht. Durch sie wurde die Zeit meines Studiums unvergesslich gemacht und ich hoffe zutiefst, dass wir uns nie aus den Augen verlieren.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Zielsetzung	5
3. Material und Methodik	6
3.1 Testsubstanz	6
3.1.1 MAH 48.HCL	6
3.1.2 Lösungsmittel	6
3.2 Versuchstiere	8
3.3 Physiologische Elektrolytlösung	9
3.4 Kaliumchloridlösung	11
3.5 Verwendete Organe	11
3.5.1 Präparation und verwendete Materialien	12
3.5.1.1 Atrium cordis dextrum (Rechter Vorhof)	12
3.5.1.2 Arteria pulmonalis (Lungenarterie)	13
3.5.1.3 Musculus Papillaris (Papillarmuskel)	13
3.5.1.4 Terminales Ileum (Dünndarm)	15
3.5.1.5 Aorta descendens (Aorta)	15
3.6 Verwendete Apparaturen	17
3.6.1 Apparatur A	18
3.6.2 Apparatur B	20
3.6.3 Der Kraftwandler	22
3.6.4 Versorgung mit Oxymix	22
3.7 Durchführung der Versuche	23
3.7.1 Untersuchung der Wirkung von MAH 48 auf die isolierten Meerschweinchenorgane	23
3.7.1.1 Versuchsablauf am Atrium cordis dextrum	23
3.7.1.2 Versuchsablauf am terminalen Ileum	25

3.7.1.3 Versuchsablauf am Musculus papillaris	26
3.7.1.4 Versuchsablauf an der Aorta descendens	27
3.7.1.5 Versuchsablauf der Arteria pulmonalis	28
3.7.2 Untersuchung des Wirkmechanismus von MAH 48.HCl am Terminalem Ileum mittels Glibenclamid.....	29
3.8. Auswertung der Daten und Statistik	31
3.8.1. Atrium cordis dexter.....	31
3.8.2. Musculus Papillaris	31
3.8.3. Aorta descendens, Arteria pulmonalis, terminales Ileum	31
3.8.4. Statistik	32
4. Ergebnisse	33
4.1. Ergebnisse der Testsubstanz MAH 48. HCl.....	33
4.1.1. Atrium cordis dexter.....	33
4.1.2. Musculus papillaris	37
4.1.3. Aorta descendens	40
4.1.4. Arteria pulmonalis	43
4.1.5. Terminales Ileum	46
4.2. Versuche zur Analyse des Wirkmechanismus der Testsubstanz MAH 48.HCl auf den terminalen Ileum.....	49
5. Diskussion	53
5.1. Wirkung auf die glatte Muskulatur	53
5.2. Möglicher Wirkmechanismus am terminalen Ileum	54
5.3. Wirkung auf die Herzmuskulatur	55
6. Zusammenfassung.....	58
7. Literaturverzeichnis	59
8. Curriculum vitae.....	61

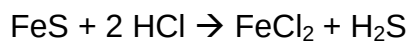
1. Einleitung

Schwefelwasserstoff, auch bekannt als eine stechend, nach faulen Eiern riechende Substanz, ist ein giftiges Gas mit dem Molekulargewicht von 34,08 g/mol und der Summenformel H_2S (Winder und Winder 1933, Smith und Gosselin 1979).

Es entsteht durch die reduktive Zersetzung von Eiweiß sowie bei der Einwirkung von Säuren auf Schwermetallsulfide (Forth et al. 2009).

Herstellung im Labormaßstab:

Aus Eisen(II)-sulfid und Salzsäure entsteht Eisen(II)-chlorid und Schwefelwasserstoff



Die Warnwirkung durch die olfaktorische Wahrnehmung passiert jedoch nur bei relativ geringen Konzentrationen, da rasch eine Gewöhnung eintritt und höhere Konzentrationen, über 200 ppm, die Geruchsrezeptoren blockieren, was im weiteren leicht zu folgenschweren Vergiftungen führen kann. Die wichtigsten betroffenen Organe sind bei einer akuten Vergiftung der Atemtrakt, als auch das zentrale Nervensystem. Als Folgen zeigen sich Schwindel, Kopfschmerz, Krämpfe, Brechreiz, bis hin zur Bewusstlosigkeit und Atemlähmung (Forth et al. 2009).

Jedoch ist der Wirkmechanismus noch nicht endgültig geklärt. Fakt ist, dass H_2S in hoher Konzentration, Enzyme durch Sulfidbildung oder Disulfidbildung blockieren kann. Das durch Protonierung entstandene Hydrogensulfidion blockiert das 3-wertige Eisen in der Cytochromoxidase und inhibiert somit ebenso wie Cyanid, die Enzyme der oxidativen Phosphorylierung (Estler und Schmidt 2007).

Die Therapie der akuten Vergiftung verläuft symptomatisch, sehr wesentlich dabei ist die gezielte Beatmung durch reinen Sauerstoff. Versuchsweise kann 4-DMAP (Diethylaminophenol) ohne nachfolgende Gabe von Natriumthiosulfat eingesetzt werden (Oberdisse et al. 2002).

Schwefelwasserstoff ist allerdings auch ein biologisches Gas, das im Körper beim Cystein-Metabolismus und in einer von der Cystathionin gamma-Lyase (CSE) und/oder der Cystathionin Beta-Synthase (CBS) katalysierten Reaktion, endogen entsteht (Stipanuk und Beck 1982, Hosoki et al. 1997).

In Studien, bei denen CSE an Mäusen genetisch ausgeschaltet wurde, verringerte sich die H_2S Konzentration in allen Organen und Geweben deutlich und sie zeigten einen erhöhten Blutdruck sowie eine verringerte Gefäßrelaxion (Yang et al. 2008).

Diese Eigenschaft konnte analog auch bei anderen Transmittern wie Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenstoffmonoxid (CO) beobachtet werden (Wang et al. 1997a,b).

Aufgrund dessen kam man zu dem Entschluss, dass H_2S eine wohl erhebliche Rolle in der Kardiovaskulären Regulation spielt. Dadurch beschäftigen sich nun etliche Studien mit diesem therapeutischen Ansatz.

Hosoki et al.(1997) zeigten, dass sich die Aorta von Ratten durch H_2S , in vitro relaxierte und sich dadurch dilatierte. Aufgrund dieser Tatsache wollte man nun dieser Tatsache auf den Grund gehen.

Hierfür musste ein Zusammenhang mit den bereits bekannten Regulationsmechanismen der vaskulären, glatten Muskulatur, NO, CO und der K_{ATP} Kanäle in Betracht gezogen werden.

Ein vorhandenes Zusammenspiel von NO und H_2S wurde in einer Studie an pulmonalen Rattenaorten bestätigt (Wang et al. 2008).

Ebenso fand man heraus, dass die relaxierende Wirkung der isolierten Aortenringe von Ratten, durch Schwefelwasserstoff, auf die Öffnung bzw. Aktivierung von K_{ATP} -abhängigen Kanälen zu Grunde liegt, wodurch es zum Ausströmen von Kalium aus der Zelle kommt. Dies bewirkt eine Hyperpolarisation, welche spannungsabhängige Calciumkanäle deaktiviert, was unter anderem zu einer Relaxation der glatten Muskulatur und dadurch zu einer Vasodilatation führt (Zhao et al. 2001).

Verschiedene Studien zeigten, dass der durch Schwefelwasserstoff hervorgerufene Effekt durch einen selektiven Antagonist (Glibenclamid) des ATP-abhängigen

Kalium-Kanals die Wirkung reduziert wurde (Zhao et al. 2001, Zhao and Wang 2002, Cheng et al. 2004).

Strukturell stellen diese Kanäle ein Oktamer aus 4 Untereinheiten dar, welche aus den 4 Untereinheiten des KIR6.1 oder KIR6.2 zusammen mit 4 Sulfonylharnstoffrezeptoruntereinheiten (SUR) bestehen (Manna et al. 2009).

ATP-abhängige Kaliumkanäle werden durch Adenosintriphosphat gesteuert, welches bei einem ATP-Anstieg zu einer Schließung der Kanäle führt (Mutschler et al. 2008).

Es ist jedoch auch möglich, dass noch andere Mechanismen an der Wirkung des H₂S beteiligt sind, wie zum Beispiel eine Mitwirkung an dem Adenylatcyclase-Weg (Lim et al. 2008) oder die NMDA-Rezeptoren Aktivierung (Abe and Kimura 1996). Dies ist allerdings noch nicht vollständig geklärt.

In einer anderen Studie wurde sich mit der Behandlung einer künstlich biochemisch hervorgerufenen pulmonalen arteriellen Hypertonie mit Schwefelwasserstoff beschäftigt. Hier zeigte sich, dass die erzeugten negativen Effekte durch Gabe von NaHS teilweise wieder aufgehoben worden sind (Huang et al. 2008).

Basierend auf dem schwefelwasserstofffreisetzenden Wirkmechanismus der Wirkstoffe kann man auf einen möglichen positiven Therapieansatz zur Behandlung der essentiellen Hypertonie erhoffen. Für den klinischen Einsatz sind allerdings noch weitere Forschungsergebnisse notwendig.

Hypertonie ist inzwischen fast zu einer Volkskrankheit der westlichen Welt geworden. Der normale Blutdruck wird mit 120/80 mm Hg definiert, wobei ein Bluthochdruck erst bei Werten ab 140/90 mm Hg anzusiedeln ist. Der Bereich dazwischen wird als normal hoch bezeichnet. 95% der Betroffenen leiden unter einer primären oder essentiellen Hypertonie, wobei die pathophysiologische Ursache unklar bleibt. Etwa 5% der Betroffenen leiden unter einer sekundären Hypertonie, mit renaler oder endokriner Genese, bei denen es nötig ist die primäre Ursache zu behandeln (Forth et al. 2009).

Die fünf am häufigsten hergenommenen Substanzklassen zur pharmakologischen Behandlung von arterieller Hypertonie sind:

- Beta-Rezeptor-Antagonisten
- Diuretika
- Calciumkanalblocker
- ACE-Hemmer
- AT1-Rezeptorantagonisten

Lifestyle-, als nicht pharmakologische Maßnahmen wären:

- Einschränkung des Alkoholkonsums
- Kochsalzrestriktion
- Gewichtsabnahme
- Einschränkung des Tabakkonsums
- Reduktion von fettreicher Nahrung
- Stressbewältigung
- Ausdauersportarten

Um eine Wirksamkeit unterschiedlicher Wirkstoffe zu verstärken und zu verbessern, eignet sich für einen positiven Therapieerfolg besonders eine Kombination verschiedener Wirkstoffklassen. Aufgrund der verringerten Dosierung können die verschiedenen Nebenwirkungen reduziert werden (Forth et al. 2009).

Auf der Basis der aktuellen Studienlage ist der Beginn der Hypertoniebehandlung mit einer niedrig dosierten Kombinationstherapie aus Diuretikum und β -Blocker oder Diuretikum und ACE-Hemmer hinsichtlich Wirksamkeit und Nebenwirkung als gleichwertig der Monotherapie anzusehen.

Wenn das Therapieziel mit der normalen therapeutischen Dosierung einer Monosubstanz nicht erreicht wird, sollte man sich frühzeitig zu einer Gabe von Zweier- oder auch Dreierkombinationen entschließen, da so die Erfolgsrate erhöht wird und die Dosen (und damit der unerwünschten Nebenwirkungen) der individuellen Kombinationspartner klein gehalten werden können (Forth et al. 2009).

2. Zielsetzung

Das Ziel dieser Diplomarbeit war die Erforschung der Wirkung eines neu synthetisierten Wirkstoffes names MAH 48.HCl auf isolierte Meerschweinchenorgane. Diese Substanz wurde vom Department für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien entwickelt und synthetisiert.

Die Untersuchung erfolgte an 5 verschiedenen Organen. Diese waren das Atrium cordis dexter, der Musculus papillaris, die Aorta descendens, die Arteria pulmonalis und das terminale Ileum.

An der glatten Muskulatur würde eine Veränderung der spasmolytischen bzw. dilatierenden Wirkung gemessen.

Zusätzlich wurde eine Herabsetzung der Inotropie, der Schlagkraft, als auch der Chronotropie, der Schlagfrequenz, untersucht.

Um diese Versuche durchführen zu können, galt es im vorraus, sich intensiv die richtige Bedienung der Messgeräte und die spezielle und hochsensible Präpariertechnik anzueignen. Dies war wichtig, um vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse zu bekommen. Ebenso galt es, die strikte Vorgehensweise der Versuche zu befolgen.

Das Erreichen einer signifikanten Wirkung galt als Voraussetzung für weitere Versuchsreihen, um den genauen Wirkmechanismus erforschen zu können.

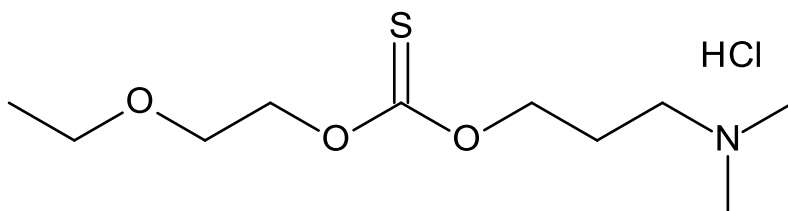
Dies geschah in diesem Fall am terminalen Ileum.

3. Material und Methodik

3.1 Testsubstanz

Die in dieser Arbeit zu prüfende Substanz wurde am Department für Pharmazeutische Chemie, von Herrn Mag. Michael Hintersteiner, unter der Leitung von Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker neu synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

3.1.1 MAH 48.HCL



Nomenklatur: 3-(dimethylamino)propoxy-(2-ethoxyethoxy)methanthioat hydrochlorid

3.1.2 Lösungsmittel

Als Lösungsmittel fungierte bidestilliertes Wasser. Da die Testsubstanz sehr hydrophil war löste sich rasch und vollständig auf. Eine weitere Nachbehandlung war deßhalb nicht nötig.

Um ein reproduzierbares Ergebnis zu erhalten, wurde die Stammlösung jeden Tag frisch zubereitet.

Da verschiedene Organbäder mit unterschiedlichen Volumina, zu 8 ml und 25 ml, zur Verfügung standen, wurde die Substanzmenge so berechnet, dass nach kumulativer Zugabe die Konzentrationen in den jeweiligen Organbädern jeweils 100 µmol/l ergaben.

Tabelle 1: Stammlösungen

Substanz	Molare Masse	Organbad in ml	Einwaage
MAH 48.HCl	271,80 g/mol	8 ml	0,20 mg
		25 ml	0,64 mg

Um die kumulativen Konzentrationen von jeweils 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ zu erreichen, wurden jeweils im 45 minütigem Abstand die Volumina von 3, 7, 20, und 70 $\mu\text{mol/l}$ der gelösten Testsubstanz mit einer Kolbenhubpipette zugesetzt.

Tabelle 2: Darstellung des Pipettierschemas

Zugegebene Menge (insges. 100 μl)	Endkonzentration
3 μl	3 $\mu\text{mol/l}$
7 μl	10 $\mu\text{mol/l}$
20 μl	30 $\mu\text{mol/l}$
70 μl	100 $\mu\text{mol/l}$

Hierfür musste eine beständige Kontrollphase (Plateauphase) abgewartet werden. Dies geschah in einem 45 Minütigem Zeitabstand, in dem ein „steady state“ bzw. konstanter Blutplasmaspiegel als sicher angenommen wurde.

Den durch die verschiedenen Konzentrationen herbeigeführten Effekt konnte man mit Hilfe eines Graphen messen.

So konnte man am Vorhof einen chronotropen, am Papillarmuskel einen inotropen und an den Organen mit glatter Muskulatur wie Darm, Lungenarterie und Aorta, einen vasodilatierenden Effekt nachweisen.

3.2 Versuchstiere

Die in der Diplomarbeit beschriebenen Versuche wurden an Meerschweinchen bzw. an deren innerer isolierter Organe, des Stammes TIRK durchgeführt.

Diese eigneten sich hierfür besonders, da die Charakteristik der Ionenkanäle dem Menschen sehr ähnlich sind.

Des Weiteren wurden sie aus praktischen Gründen, wie Gewicht und Größe, gewählt, da die Versuchsaapparatur nur über ein begrenztes Fassungsvermögen verfügt.

Die Versuchstiere wurden zu Beginn jeden Labortages durch einen gezielten Genickbruch getötet. Der Genickbruch als Solches ist hierfür die beste Methode, da der Exitus schnell und schmerzfrei eintritt.

Dieser Vorgang wurde durch ein speziell geschultes Personal durchgeführt.

Nach der Öffnung des Thorax mit einer Spezierschere wurden rasch die benötigten Organe entnommen. Diese waren Lunge, Herz und der terminale Ileum (ca. 20cm), welcher noch dazu an einem Ende mit einem Bindfaden abgeschnürt wurde, um eine besser Handhabung zu gewährleisten.

Dazu kam noch die thorokale Aorta.

Alle entnommenen Organe wurde unmittelbar in die dafür frisch hergestellte und begaste Elektrolytlösung (Kapitel 3.3) gegeben, bis sie dann weiter präpariert wurden.

3.3 Physiologische Elektrolytlösung

Die bereits im Kapitel 3.2 erwähnte physiologische Elektrolytlösung, auch genannt „Tyrode“, diente zur Aufbewahrung der Organe bis zur weiteren Untersuchung. Sie wird aber auch während der Präparation benutzt und ist wichtig, um die Organe weiterhin mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen. Ebenso hält sie den pH-Wert aufrecht, der zwischen 7,2 und 7,4 liegen sollte.

Da die Organe konstant auch während der nachfolgenden Arbeitsschritte mit der Nährlösung umgeben sind, ist ein Weiterleben der Organe von bis zu 6 Stunden gewährleistet.

Die Herstellung der Tyrode benannt nach Maurice Vejux Tyrode, erfolgt nach der Vorschrift von Reiter und entsprach einer abgeänderten Krebs-Henseleit-Lösung.

Die genaue Zusammensetzung ist:

Tabelle 3: Bestandteile der Nährlösung (Tyrode)

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

Die genaue Herstellungsanleitung für 2 Liter ist:

Tabelle 4: Zusammensetzung für 2 Liter:

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

Um die Reproduzierbarkeit der Versuche gewährleisten zu können wurde sie täglich neu hergestellt.

Die in Tabelle 4 aufgelisteten Bestandteile wurden in ca. 1500 ml destillierten Wasser gelöst. Um eine optimale Gassättigung zu gewährleisten, wurde 20 Minuten lang begast, und anschließend tropfenweise CaCl₂ zugesetzt. Danach wurde die Tyrode mit destilliertem Wasser auf 2000 ml ergänzt.

Oxymix oder Carbogen Gemisch, ein Gasgemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid, wurde durch einen Gasschlauch in die Tyrode eingeleitet und diente zur Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung und des physiologischen pH-Wertes.

Dadurch konnten optimale physiologische Bedingungen für die isolierten Organe gewährleistet werden, und somit für einige Stunden für die Versuche verwendet werden.

3.4 Kaliumchloridlösung

Für die Kontraktion der glatten Muskulatur der Aorta descentens, der Arteria pulmonalis und des terminalen Ileums, wurden den Organen Kaliumchloridlösung zugesetzt, um eine chemische Reizung hervorzurufen.

Dies hatte den Vorteil, eine über einen längeren Zeitraum konstante Kontraktion hervorzurufen. Dafür wurden 2 unterschiedlich konzentrierte Kaliumchloridlösungen gemischt. Für die Darmkontraktion wurde eine 60mmolare, für die Aorta und Pulmonalarterie eine 90mmolare Lösung verwendet.

Tabelle 5: Bestandteile der Kaliumchloridlösung

Organpräperat	KCl- Einwaage (g)	Volumen der Nährlösung (ml)
Terminales Ileum	0,45	100
Aorta descendens	0,67	100
Arteria pulmonalis	0,67	100

3.5 Verwendete Organe

Jeden Tag wurden den frisch getöteten Tieren folgende Organe entnommen:

- Herz
- Lunge
- Dünndarm
- Aorta

In weiterer Folge wurden aus diesen Organen Vorhof, Lungenarterie, Aorta, Dünndarm und Papillarmuskel seziiert.

Bei diesen Versuchen handelt es sich um „ex vivo“ Versuchen, da sie nicht am lebenden Tier stattfinden.

3.5.1 Präparation und verwendete Materialien

Die Organe (siehe Kapitel 3.6) wurden in die Tyrode eingelegt, um anschließend mit der Präparation zu beginnen. Das jeweilige Organ wurde auf einer Korkplatte mit 2 Präpariernadeln fixiert. Dieser lag in einer Petrischale, und ein Gummischlauch verhinderte das Aufsteigen der Korkplatte. Auch hier wurden die Organe mit der Tyrode versetzt.

Zum Präparieren wurde ein spezielles, feinmechanisches Besteck verwendet, zusätzlich sorgte ein Auflichtungsmikroskop für eine optimale Belichtung.

Abbildung 2: Stereolupe



3.5.1.1 Atrium cordis dextrum (Rechter Vorhof)

Um das Herz aus dem Thorax zu befreien wurde zuerst die Lunge und deren Fragmente entfernt, sowie überschüssiges Fettgewebe weggeschnitten. Das nun freiliegende Herz konnte somit entnommen werden. Dieses wurde mit Hilfe von Präpariernadeln auf der Korkplatte aufgespannt, somit konnte der Vorhof und der darin sich befindliche Sinusknoten isoliert werden. Dieser besitzt eine Spontanaktivität, welche keinesfalls verloren gehen sollte, da diese für die Versuche notwendig war. Deshalb musste mit besonderer Präzision gearbeitet werden, um das Herz nicht zu überdehnen bzw. zu verletzen.

Für weitere Präparationen wurde der Vorhof in einer zusätzlich mit Tyrode gefüllten Petrischale fixiert. Beide Enden wurden mit einem Bindfaden versehen, an dem jeweils ein Silberhäkchen verknotet wurde.

Sowie das passiert war, wurde er sofort zum Organbad gebracht und eingespannt.

3.5.1.2 Arteria pulmonalis (Lungenarterie)

Für die Versuchsreihe wurde nur der Truncus pulmonalis, ein Teil der Lungenarterie, die direkt aus dem rechten Ventrikel entspringt, genutzt. Um diese frei zu legen, musste noch das restliche Fettgewebe vom Herz entfernt werden. Für die Präparation wurden nach Befreiung von Blutgerinnseln am Pulmonalisring ringförmige Stücke von 2-3 mm abgeschnitten und in die Tyrode wieder eingelegt.

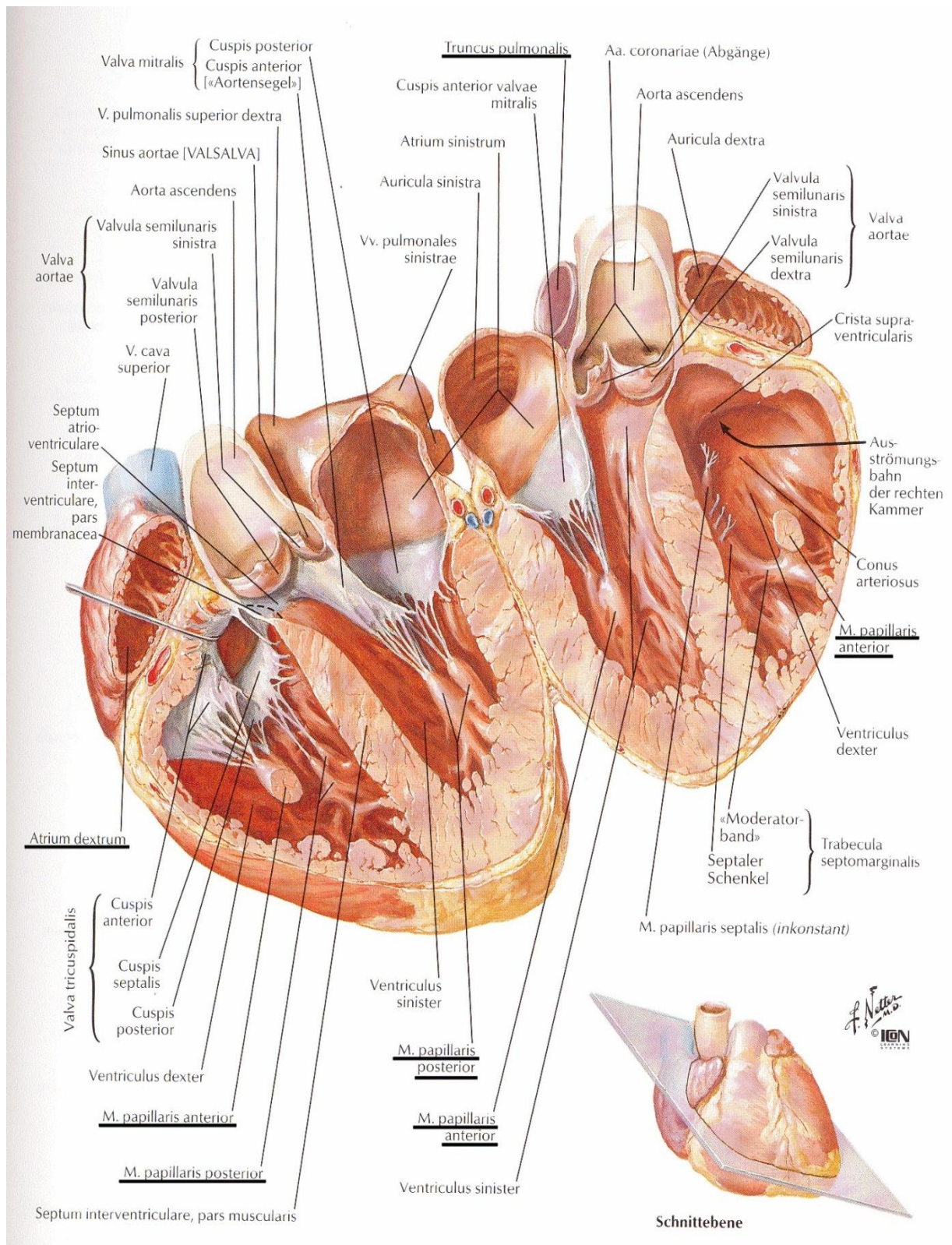
3.5.1.3 Musculus Papillaris (Papillarmuskel)

Für die Präparation des Papillarmuskels wurde die Arteria pulmonalis entlang des Septums aufgeschnitten und somit beide Herzkammern geöffnet. Um eine Trübung durch das Blut zu verhindern, wurde die Nährlösung dementsprechend oft ausgetauscht. Um eine Beeinflussung durch die Spontanaktivität der Purkinje Fasern zu vermeiden, mussten diese sowie auch fremdes Gewebe entfernt werden. Auch hier wurden wieder Silberhäkchen mit Hilfe einer Pinzette an den Muskel angebracht. So konnte der Muskel herauspräpariert werden. In Abhängigkeit der Größe des Tieres konnten 3-5 Papillarmuskel gewonnen werden. Diese wurden auch wieder in der Tyrode aufbewahrt.

Abbildung 3: Foto eines präparierten Papillarmuskel



Abbildung 4: Darstellung des Herzens (Netter FH 2003)



3.5.1.4 Terminales Ileum (Dünndarm)

Für die Entfernung des Dünndarms wurde der Bauchraum weiter aufgeschnitten. Für diese Versuche wurde der Krummdarm verwendet. Dies ist der terminale Teil des Ileums, der sich zwischen Jejunum (Leerdarm) und Intestinum tenue (Dickdarm) befindet.

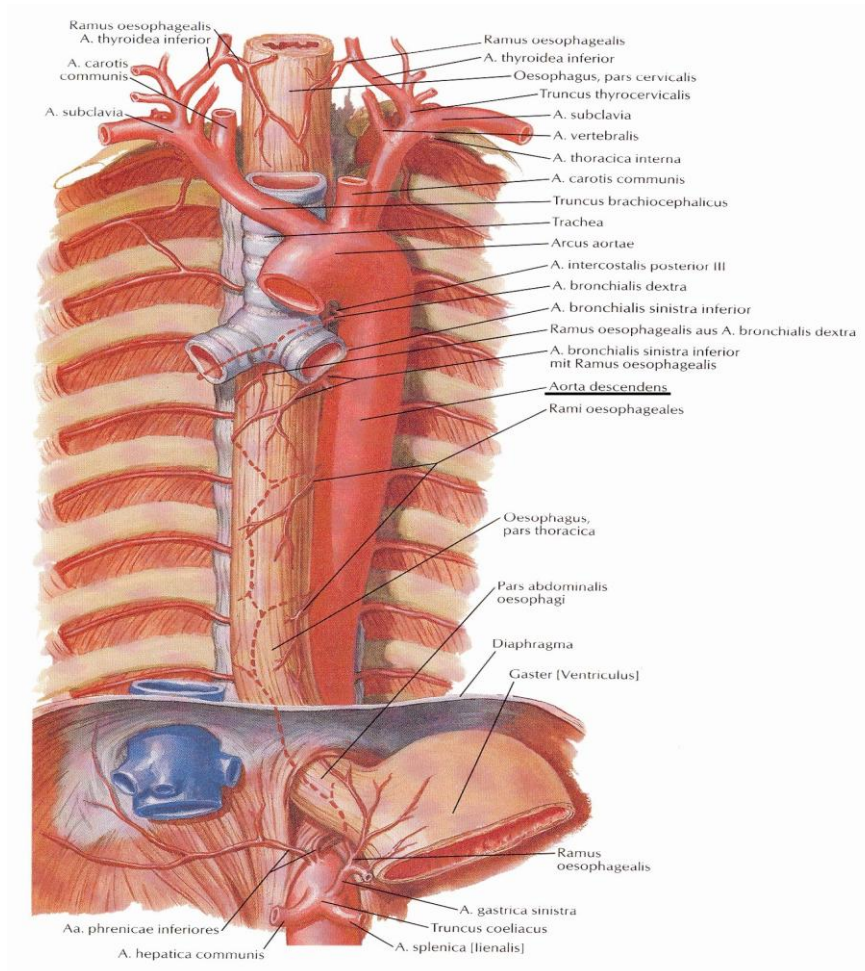
Das Organ wurde am Ende mit einem Faden markiert, um ein besseres Handling zu gewährleisten. Auch dieses Präparat wurde in die Tyrode- Lösung eingelegt und mit Carbogen begast. Davon wurde ein 0,5 cm langes Stück schräg abgeschnitten, die beiden spitzen Enden mit Präpariernadeln auf der Korkplatte fixiert, und auf halber schnitthöhe der Silberhaken mittels Bindfaden verknotet. Ein präzises Arbeiten war auch hier von großer Bedeutung.

Um sicherzugehen, dass keine Fäkalrückstände sich noch im Darm befinden, wurde er mehrmals mittels einer Kanüle mit Tyrode durchgespült.

3.5.1.5 Aorta descendens (Aorta)

Zum Schluss wurde noch die thorakale Aorta entlang des Rückrates herausgenommen. Hierfür wurde die Aorta leicht angezogen und konnte somit von der Wirbelsäule abgetrennt werden. Dabei durfte sie aber nicht zu stark gedehnt oder verletzt werden. Diese Präparation musste zu zweit durchgeführt werden, eine Person musste den Thorax aufspannen, um eine bessere Erreichbarkeit der Aorta im Brustkorb zu erlangen.

Abbildung 5: Anatomische Lage der Aorta



Um das Präparat von überschüssigem Gewebe zur befreien, wurde es wieder mit Präpariernadeln auf dem Kork in der Petrischale fixiert, und unter der Stereolupe vorsichtig Fremdgewebe entfernt. Wichtig war dabei, dass man kein Loch in die sensible Aorta schnitt. Zuletzt wurden ringförmige Scheiben abgeschnitten, welche dann bis zu den Versuchen mit Tyrode begast wurden.



Abbildung 6: Abbildung der Aorta unter der Stereolupe

3.6 Verwendete Apparaturen

Für meine Versuche wurden mir zwei verschiedene Apparaturen zur Verfügung gestellt. Die Apparatur A wurde für die Untersuchung des Papillarmuskels, die Apparatur B für die Aorta, Arteria pulmonalis, Dünndarm und Vorhof verwendet.

Die Organe wurden jeweils mit Hilfe eines Silberdrahtes in die entsprechenden Apparaturen eingespannt. Der mit dem Kraftwandler verbundene Silberdraht diente der Umwandlung des mechanischen in das elektrische Signal, das durch den Amplifier verstärkt wurde. Dies wurde mit Hilfe eines Flachbettschreibers auf ein Millimeterpapier dokumentiert.

Mit großer Sorgfalt wurde auf konstante Temperatur, pH-Wert, Zusammensetzung der Tyrode und somit optimaler Sauerstoffversorgung geachtet, um die Reproduzierbarkeit der Versuche zu gewährleisten.

3.6.1 Apparatur A

Die Apparatur A wurde für die Untersuchung des Papillarmuskels verwendet.

Abbildung 7: Schematische Skizze der Apparatur A

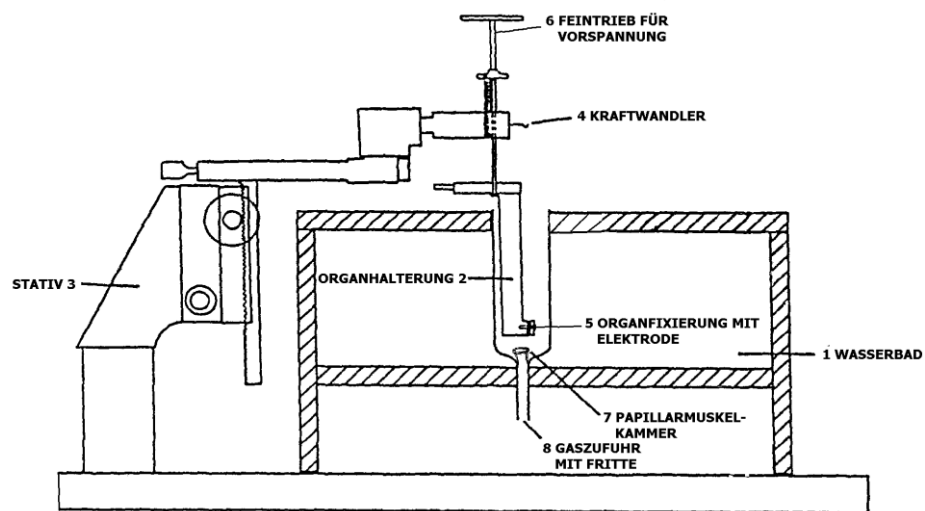


Abbildung 8: Originalabbildung der Versuchsanordnung A



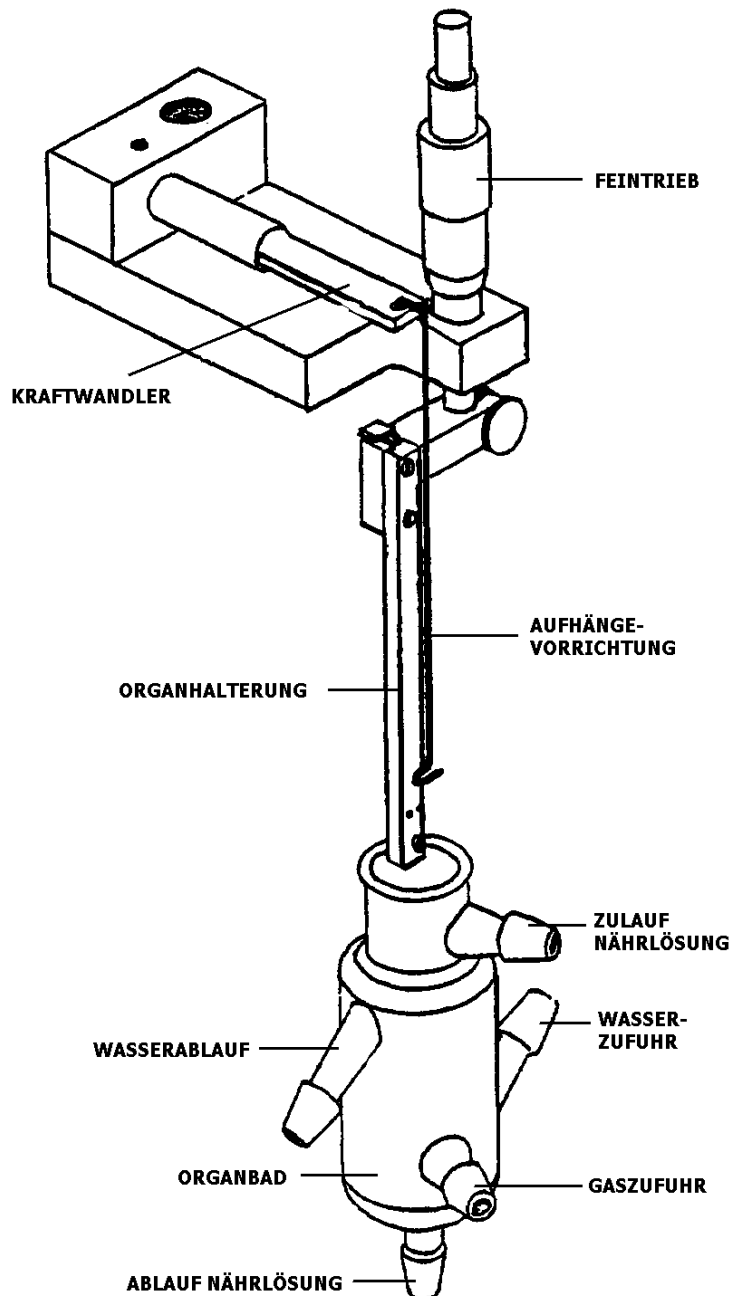
Das Gerät besteht aus einer Wasserbadwanne aus Acrylglas, und einer Muskelkammer, welche ins Wasserbad eintaucht. Der Feintrieb, der Kraftregler und die Organhalterung sind auf einem Stativ befestigt. In die Wanne wurde 10 Minuten vor Versuchsbeginn 25,00 ml Nährlösung eingefüllt und von unten mit Oxymix begast.

Eine konstante Temperatur von $35^{\circ}\text{C} \pm 1$ schaffte physiologische Bedingungen und wurde mittels Thermostat geregelt. Nun beginnt die eigentliche Präparation des Papillarmuskels, welche schon im Kapitel 3.5.1.3 beschrieben wurde. Dieser wurde mit Hilfe eines Silberhäkchens auf der Organhalterung befestigt, und die „untere Spitze“ zwischen einer Elektrode und einem Plexiglasplättchen, flach anliegend, eingeklemmt. Als nächstes wurde nun der Muskel in die erwärmte Nährlösung eingetaucht. Da der Papillarmuskel nicht spontan schlug, musste er mit einem Accupulser Stimulator, elektronisch stimuliert werden. Über den bereits beschriebenen Silberdraht wurde nun der Mechanische Impuls, die Inotropie, an den Kraftwandler weitergeleitet und mittels Flachbettschreiber optisch dargestellt.

3.6.2 Apparatur B

Die Apparatur B wurde für die Untersuchung des Darms, der Aorta, der Lungenarterie und des rechten Vorhofs verwendet

Abbildung 9: Schematische Skizze der Apparatur B



Im Gegensatz zur Apparatur A taucht hier das Organbad nicht in ein Wasserbad. Sie besteht aus einem gläsernen Doppelkammersystem, das mittels

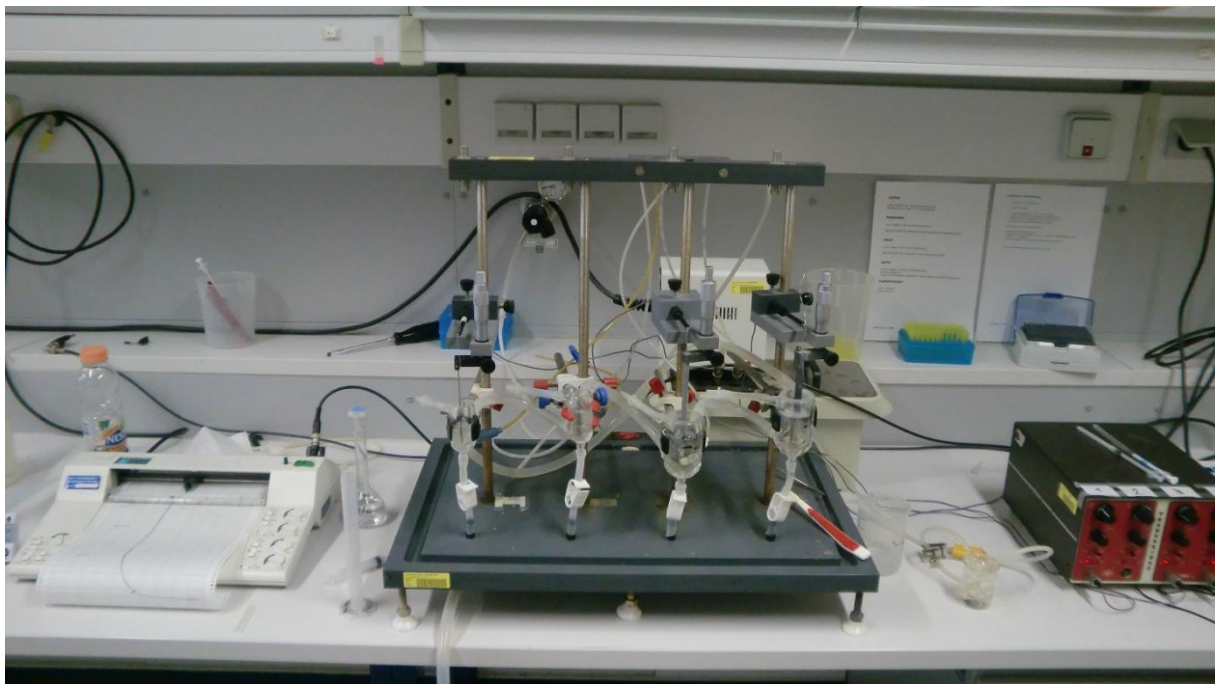
Polyethylenschläuchen mit konstant temperiertem Wasser von 37°C versorgt wird. Eine Begasung durch Oxymix erfolgt ebenfalls von unten.

Das Fassungsvermögen der Organbäder beträgt 25,00 ml bzw. 8,00 ml.

Ein Silberdraht fixierte ebenfalls die bereits erwähnten Organe. Die ringförmigen Präparate der Aorta und die Arteria pulmonalis wurden direkt am Silberdraht eingespannt. Die Präparate des Darmes und des Vorhofes wurden zusätzlich mit Hilfe eines Silberhakens an den Draht befestigt. Auch hier diente der Silberdraht als Verbindung zwischen Organ und Kraftwandler, welcher an den Amplifier gekoppelt ist.

Im Anschluss an die Befestigung wurde die Anhängenvorrichtung mit dem Präparat in das Organbad getaucht, sodass sich das Organ ca in der Mitte positioniert waren.

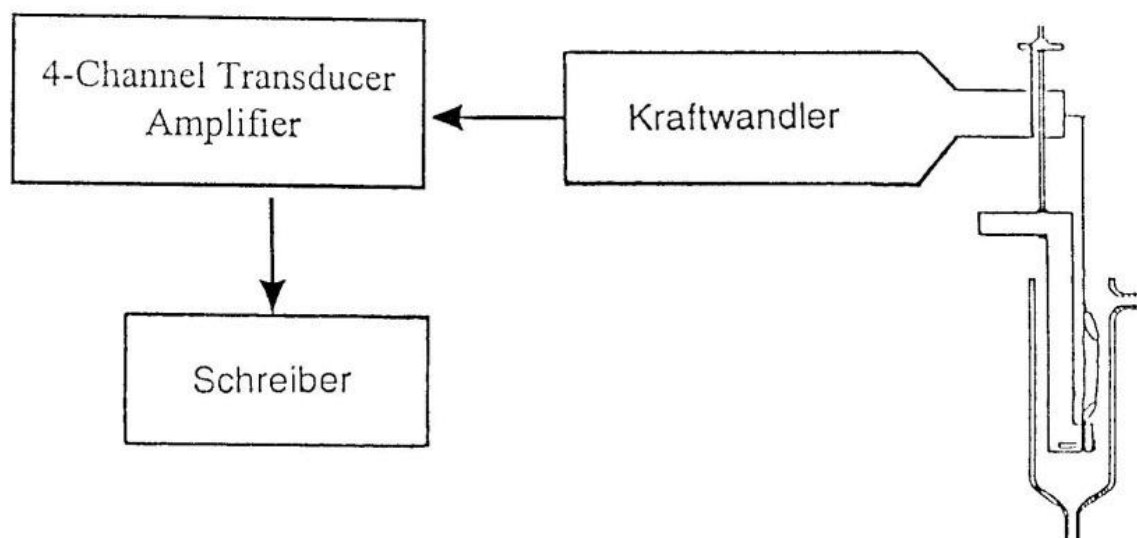
Abbildung 10: Originalabbildung der Versuchapparatur B



3.6.3 Der Kraftwandler

Um die mechanischen Signale der Versuche aufzeichnen zu können, müssen sie in elektrische Signale umgewandelt werden. Dies geschieht mittels Kraftwandler, er misst die Stromflussveränderungen des Dehnungsmessstreifens. Um das Signal zu intensivieren wird noch eine Verstärker (Amplifier) benötigt. Am Ende erhält man das Signal über einen Flachbettschreiber auf Millimeterpapier.

Abbildung 11: Skizze des Kraftwandlers



3.6.4 Versorgung mit Oxy mix

Oxy mix ist ein Gasgemisch, das aus 95% O_2 und 5% CO_2 besteht. Es wird benötigt, um die Organe zu begasen, und sie somit ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen, und einen konstanten physiologischen pH- Wert von 7,2-7,4 aufrecht zu erhalten. Diese Bedingungen müssen auch während des gesamten Versuches vorherrschen, deshalb muss eine ständige Zufuhr des Oxy mix- Gasgemisches gewährleistet werden. Die Luft strömt über ein Schlauchsystem, welches über Glasfritten gefiltert wird, ein.

3.7 Durchführung der Versuche

Nun folgt eine genaue Beschreibung des Versuchsablaufes.

Wesentlich zu erwähnen sei noch, dass vor jedem nun beschriebenen Versuche die Organbäder auf eventuell noch vorhandene Rückstände überprüft wurden und zweimal mit bidestilliertem Wasser und einmal mit Tyrode durchgespült wurden. Im Anschluss wurden die Organbäder mit 8,00 ml beziehungsweise 25,00 ml befüllt, temperiert.

3.7.1 Untersuchung der Wirkung von MAH 48 auf die isolierten Meerschweinchenorgane

3.7.1.1 Versuchsablauf am Atrium cordis dextrum

Zur Untersuchung des Vorhofs wurde das Organ mit Hilfe von Silberhäkchen an der Organhalterung der Apparatur B aufgebracht, und in die begaste Tyrode eingetaucht. Wichtig war, dass der Vorhof hierbei nicht überdehnt wurde, da er sonst seine Aktivität verloren hätte. Hierbei war es nicht nötig den Vorhof durch elektrische Impulse zu aktivieren, weil er von selbst spontan schlägt. Nun mussten die Geräte eingestellt werden.

Der Schreiber benötigt in diesem Versuch eine Spannung von 5 mV, und eine Geschwindigkeit von 5 mm/sec.

Am Organ wurde eine definierte Vorspannung von 10,4 mN angelegt, damit die Reproduzierbarkeit gewährleistet werden konnte. Der Nullpunkt wurde am Drehrad des Amplifiers nachjustiert werden. Nun musste man den Vorhof 45 Minuten belassen, damit er sich an die vorherrschenden Bedingungen im Organbad einstellen und gewöhnen konnte. Die eigentliche Messung begann mit einer 30 Minütigen Kontrollphase, in der alle 5 Minuten die Schlagfrequenz (Chronotropie) 12 Sekunden lang gemessen wurde. Dies entsprach auf dem Millimeterpapier 6 Kästchen beziehungsweise 6 mm. Sowie die Schlagfrequenz als konstant eingestuft wurde, konnte sie als Kontrollwert herangezogen werden. Der Kontrollwert war essentiell für die Auswertung der nachfolgenden Messungen. Um die Schlagzahl pro 60 Sekunden

ermitteln zu können, musste die ermittelte Schlagzahl mit dem Faktor 5 multipliziert werden.

Nun konnte mit der ersten Zugabe der geringsten Konzentration meiner Testsubstanz begonnen werden, diese war 3µl. Das genaue Pipettierschema wurde schon im Kapitel 3.1.2 dargestellt. Nun wurden 45 Minuten lang alle 5 Minuten die Schlagfrequenz dokumentiert, bevor die nächst höhere Konzentration zugespritzt wurde.

Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis die volle Konzentration (100µmol/l) in Organbad erreicht wurde.

Wichtig war noch, dass man beim einspritzen keinesfalls mit der Pipettenspitze das Organ oder die Aufhängung berührte, da es sonst zu einem stark verfälschtem Ergebnis gekommen wäre.



Abbildung 12: Atrium dexter eingespannt

3.7.1.2 Versuchsablauf am terminalen Ileum

Das Darmstück wurde, wie im Kapitel 3.5.1.4 beschrieben, mittels Silberhäkchen in die Apparatur B eingebracht. Auch hier war ein Überdehnen zu vermeiden. Die Geschwindigkeit des Schreibers wurde in diesem Versuch auf 1mm/min eingestellt, die Vorspannung auf 4,92 mN. Die nächsten 20 Minuten dienten der Aklimatisierung, und die Verschiebung des Schreibers war hier auf die Veränderung der Peristaltik zurückzuführen. Danach wurde der Nullpunkt wieder nachjustiert. Nun wurde die Tyrode abgelassen, und das Organbad mit 25,00ml einer 60mmol Kaliumchloridlösung versetzt (Kapitel 3.4).

Dies löste eine Kontraktion der glatten Muskulatur aus, welche durch den Flachbrettschreiber dokumentiert wurde. Nach einiger Zeit stellte sich die Kontraktion ein. Sie war ungefähr die Hälfte vom Maximum. Sowie sich diese Plateuphase eingestellt hat, konnte mit der kumulierten Zugabe der Testsubstanzen begonnen werden. Das im Kapitel 3.1.2 beschriebene Pipettierschema erfolgte im 45 Minütigem Intervall.

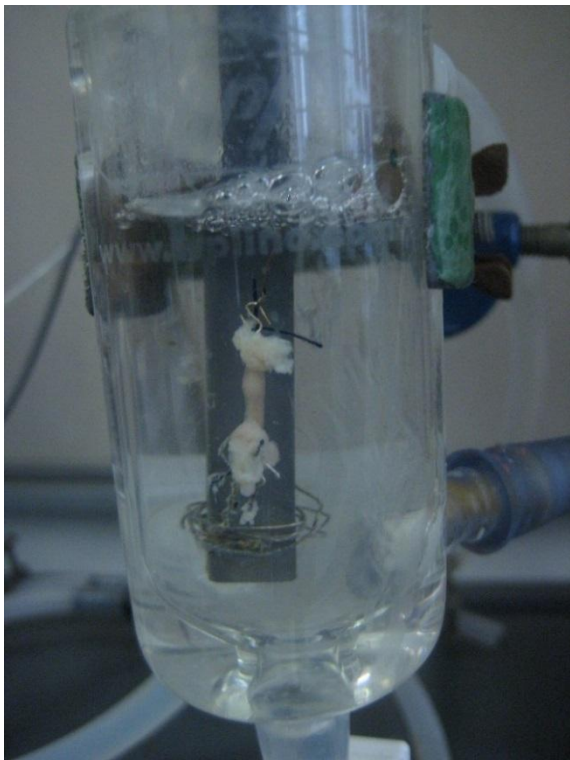


Abbildung 13: Terminalis Ileum eingespannt

3.7.1.3 Versuchsablauf am *Musculus papillaris*

Der Papillarmuskel wurde, wie in Kapitel 3.5.1.3 beschrieben mittels Silberhäkchen in die Organhalterung der Apparatur A eingehängt und mittels der quadratischen Plexiglasplatte und der Elektrode eingespannt, und sofort in die bereits temperierte und begaste Nährlösung herabgelassen.

Auch wie bei den anderen, zuvor beschriebenen Organen musste eine 10 bis 20 Minütige Aklimatisierungsphase eingehalten werden, nachdem der Papillarmuskel auf 3,92 mN bei 2 beziehungsweise 5mV vorgespannt wurde und der Schreiber auf den Nullpunkt gesetzt wurde. Eventuelle Nullverschiebungen mussten nachjustiert werden.

Da der Papillarmuskel keine Spontanaktivität aufweist, musste er mit einem Reizgerät (A310 Accupulser) elektronisch gereizt werden.

Durch diese Reizung kam es zur Kontraktion des Muskels. Allerdings kam es manchmal vor, dass bereits zu Kontraktionen kam, obwohl das Reizgerät noch gar nicht angeschlossen war. Dies war ein Zeichen dafür, dass die Purinje Fasern noch vorhanden waren. Diese waren dringlichst zu entfernen, da sie eine eigene spontane Aktivität aufwiesen, welche das Versuchsergebnis signifikant verfälscht hätte.

Nun wurden die Reize in Form von Rechteckimpulsen von 1ms -1 mit einer Frequenz von 1 Herz über eine Platinelektrode ausgesendet, und somit die quergestreifte Muskulatur 3 ms lang kontrahiert. Die eingebrachte Stromstärke lag in etwa 10% über der minimalen Reizschwelle und musste präzise über eine Isolation Unit geregelt werden. Dies war nötig, da es bei einer Überschreitung der Stromstärke zu einer Erschöpfung und Ausschüttung des Catecholaminspeicher hätte kommen können, was zu einer Abweichung der Versuchsergebnisse geführt hätte (Furchgott et al. 1959)

Sowie in der Kontrollperiode eine konstante Amplitude von mindestens 2cm festzustellen war, konnte die Testsubstanz kumulativ zugesetzt werden. Die Abnahme der Amplitudenlänge im weiteren war auf die Veränderung der Inotropie des sich kontrahierenden Papillarmuskels zurückzuführen.

In der 45 minütigen Gewöhnungs- bzw. Reaktionsphase wurden alle 5 Minuten 7-8 Amplituden auf das Millimeterpapier aufgezeichnet und vermessen.

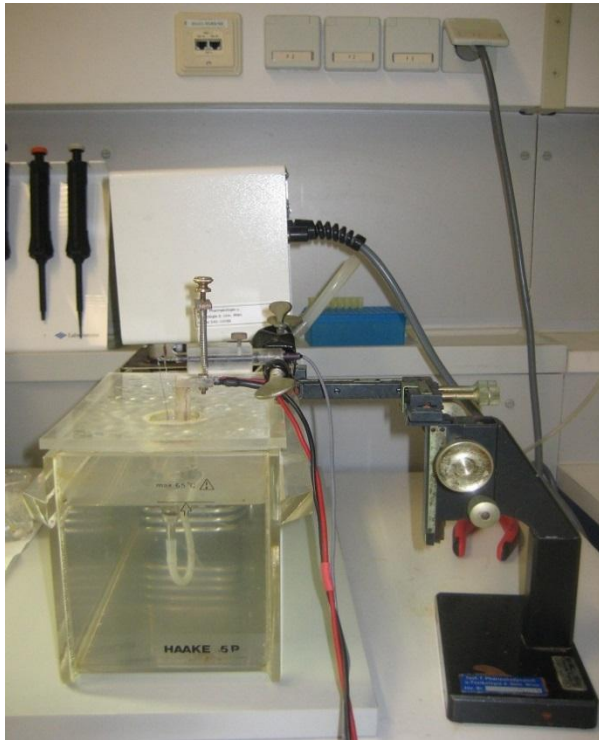


Abbildung 14: Originalabbildung des Papillarmuskels in Apparatur A

3.7.1.4 Versuchsablauf an der Aorta descendens

Die ringförmig präparierten Aorta Stücke (siehe Kapitel 3.5.1.5) wurden in die Organhalterung der Apparatur B eingespannt, und sofort in das mit Tyrode befüllte, temperierte und begaste Organbad eintauchen. Nach einschalten der Geräte, wurde die Aorta bei 10 mV auf 10 cm vorgespannt. Nach einer anschließenden Gewöhnungsphase wurde die Spannung auf 5 mV herabgesetzt und der Schreiber wieder auf den Nullpunkt justiert und die Aufzeichnung mit 1mm pro Minute gestartet.

Aus dem Organbad wurde die Tyrode abgelassen, und wieder aufgefüllt mit 8 bzw. 25 ml einer 90 mmolaren Kaliumchloridlösung (670 mg in 100 ml Tyrode), um das eingespannte Gefäß zu kontrahieren.

Sowie eine stabile Plateuphase erreicht wurde, und über mindestens 5 cm auf dem Schreiberpapier gehalten wurde, konnte mit dem üblichen Pipettierschema die Testsubstanz zugegeben werden.

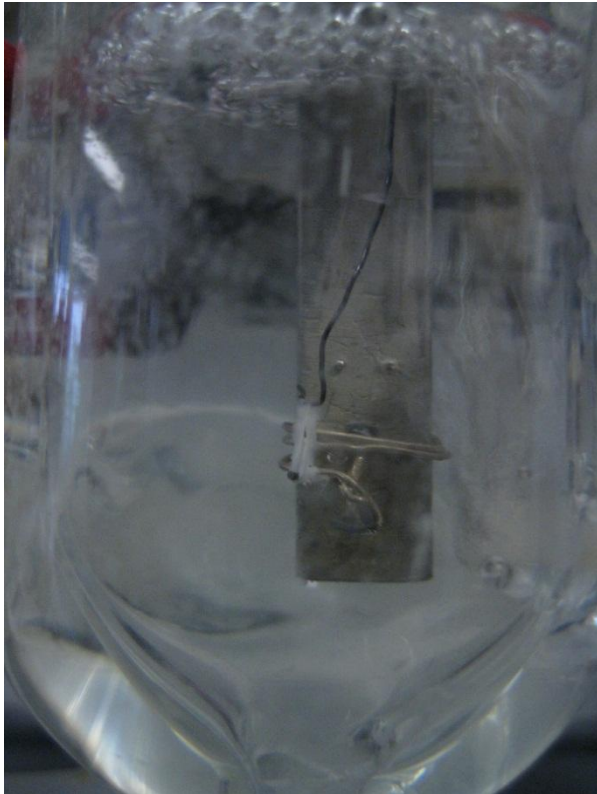


Abbildung 15: Aorta descendens in der Apparatur B

3.7.1.5 Versuchsablauf der Arteria pulmonalis

Der Versuchsablauf der Arteria pulmonalis verlief analog zu dem der Aorta descendens, nur war der Grad der Vorspannung ein anderer. Im Gegensatz zum im letzten Kapitel erläuterten Versuch betrug die Vorspannung hier 5 mV, was einem Zug von 9,81 mN entsprach. Die Molarität der Kaliumchloridlösung war mit 90 mmolar gleich der der Aorta.

Bei beiden Gefäßen wurde die vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz auf die glatte Muskulatur untersucht.

3.7.2 Untersuchung des Wirkmechanismus von MAH 48.HCl am Terminalem Ileum mittels Glibenclamid

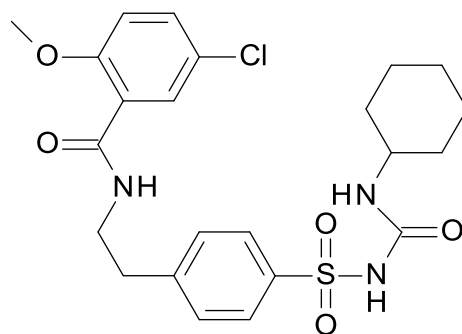
Die Durchführung der Untersuchung des Wirkmechanismus mittels Glibenclamid unterschied sich nicht signifikant von der vorherig beschriebenen an den Organen.

Der terminale Ileum wurde wie gewohnt und bereits ausführlich erklärt, mit den Silberhäkchen, bei 5 MV / Speed und 4,92mN Vorspannung in die Apparatur B eingespannt, und nach einer 20 Minuten langen Gewöhnungsphase mittels der 90 mmolaren KCl gereizt. Nach einer konstanten Plateauphase wurde 100µmol/l Glibenclamid zugegeben.

Glibenclamid

Abbildung 16: Strukturformel Glibenclamid

MG = 494,0 g/mol



Glibenclamid gehört zur Gruppe der Sulfonylharnstoffen und findet aufgrund seiner Wirkweise seinen Einsatz als orales Antidiabetikum bei Diabetis mellitus Typ 2. Weitere Substanzen aus dieser Klasse sind Glimepirid und Gliquidon.

Sulfonylharnstoffe sind bekannt für ihre einheitliche Struktur. Die hohe orale Bioverfügbarkeit kommt zustande, da die Sulfonylharnstoffe bei physiologischem pH-Wert > 90% dissoziiert sind. Dies kommt zustande, da der aromatische Ring in konstanten Abständen mit einer sauren Gruppe verbunden ist.

Die ATP-abhängigen Kaliumkanäle werden durch das Binden der Sulfonylharnstoffe an Membrane in der B- Zelle geschlossen. Durch die daraus resultierende Membranpolarisation werden die spannungsabhängigen Ca²⁺ Kanäle geöffnet. Der daraus resultierende Ca²⁺ Einstrom in die Zelle aktiviert die Insulinsekretion (Forth et al. 2009).

Sulfonylharnstoffe können jedoch auch schwere Hypoglycämien auslösen. Ebenfalls können Gewichtszunahme, Appetitlosigkeit Erbrechen, Diarrhoe und selten auch eine Veränderungen des Blutbildes auftreten (Aktories et al. 2009).

3.8. Auswertung der Daten und Statistik

3.8.1. Atrium cordis dexter

Die Versuche am Vorhof dienten der Messung und Bestimmung der Chronotropie des Sinusknotens. Unter Chronotropie versteht man die Schlagfrequenz des Herzens (Hunnius 1986). Die Durchführung, wie auch die vorhergehende Präparation der 5 Versuche wurden schon in den Kapiteln 3.5.1.1. bzw. 3.7.1.1. erläutert.

Nach der jeweiligen Zugabe der kumulativen Konzentration folgte eine 45- Minütige Gewöhnungsphase in der alle 5 Minuten 12 Sekunden lang die Schlagfrequenz auf das Millimeterpapier aufgezeichnet wurde. Reproduzierbar waren allerdings nur die Messungen nach 30 Minuten, da sich erst dann ein „steady state“ eingestellt hatte. Die Schläge wurden abgezählt, und mit dem Faktor 5 multipliziert, was auf die Schläge pro Minute zurechnen war. Nun wurde der Kontrollwert, der 100% entsprach in Relation gesetzt.

3.8.2. Musculus Papillaris

Die Versuche am Papillarmuskel gaben Auskunft über die Auswirkung der durch die Wirksubstanz herbeigeführte Inotropie, der Kontraktionskraft des Muskelgewebes (Hunnius 1986).

Die Methode und die Präparation wurden bereits in den Kapiteln 3.5.1.3. und 3.7.1.3. ausführlich erläutert. Gemeinsamkeiten mit dem Versuch am Vorhof waren die 12 Sekunden lange Messung der Schlagkraft alle 5 Minuten, was in etwa 6 bis 7 Amplituden entsprach. Diese wurden im Anschluss mit der Schiebelehre vermessen. Auch hier wurde der Kontrollwert mit 100% angegeben, woraus die prozentuale Abnahme der gemessenen Amplitude ersichtlich wurde.

Da die Versuche manchmal mit unterschiedlichen Spannungen (5 mV bzw. 2 mV) durchgeführt wurden, musste man bei der Auswertung die Werte mit 0,98 (5 mV) bzw. 0,4 (2 mV) multiplizieren.

3.8.3. Aorta descendens, Arteria pulmonalis, terminales Ileum

Für die Messung einer möglichen Wirkung auf die glatte Muskulatur wurden 3 verschiedene Präparate dem Meerschweinchen entnommen, wobei beim Darm die

spasmolytische Wirkung gemessen wurde und bei den Gefäßen die vasodilatierende Wirkung im Vordergrund stand.

Die verschiedenen Organteile wurden mittels einer Kaliumchloridlösung maximal kontrahiert, um eine spätere Relaxation überhaupt zu ermöglichen. Nach Erreichen einer stabilen Plateauphase konnte mit der kumulierten Zugabe nach dem Pipettierschema begonnen werden. Wichtig war dabei die Markierung des Zeitpunktes der Substanzzugabe. Hier diente die Plateauphase vor der Substanzzugabe als 100%iger Referenzwert, mit dem die möglichen Veränderungen der Kontraktion dargelegt werden konnten. Zur Berechnung musste noch der Eichfaktor berücksichtigt werden, der je nach Messung 0,98 mN (5 mV) beziehungsweise 0,9604 mN (10 mV) betrug.

3.8.4. Statistik

Als Programm für die Auswertung meiner Ergebnisse der Versuchsreihe habe ich „Sigmaplot 9.0“ verwendet.

Bei jedem Organ musste der arithmetische Mittel- sowie Standardfehler der Mittelwerte in % und mN berechnet werden. Für einen reproduzierbaren Standardfehler mussten mindestens 4 Versuche pro Organ analysiert werden. Um eine Auskunft über die effektive Konzentration, bei der eine 50%ige Wirkung eintritt, musste der EC 50- Wert ermittelt werden (Estler 2000). Dies geschah ebenfalls mit dem Programm. Bei der graphischen Ermittlung wurde auf der x- Achse die Testsubstanzkonzentration ($\mu\text{mol/l}$) und auf die y- Achse die Veränderung der Kontraktion bzw. Schlagfrequenz in % aufgetragen. So konnte man nun die 50%ige Abnahme der Schlagfrequenz bzw. Kontraktion ablesen.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der Testsubstanz MAH 48. HCl

4.1.1. Atrium cordis dexter

Der Einfluss der Testsubstanz MAH 48.HCl auf die Chronotropie wurde in insgesamt 5 Versuchen getestet und ausgewertet.

Nachdem eine konstante Schlagfrequenz des Sinusknoten erreicht wurde, setzte man die Testsubstanz nach dem bekannten Pipettierschema in den Konzentrationen 3, 10, 30, und 100 $\mu\text{mol/l}$ alle 45 Minuten zu. Die Mittelwerte und Standardfehler sind in Tabelle 6 dargestellt.

Die Testsubstanz zeigte vorerst einen weniger großen Effekt auf die quergestreifte Muskulatur des Herzens. Erst bei der letzten Testsubstanzzugabe kam es zu einer erwähnenswerten Reduktion der Schlagfrequenz. Hier lag der Effekt bei $-28,07\% \pm 8,02$.

Eine EC_{50} wurde nicht erreicht.

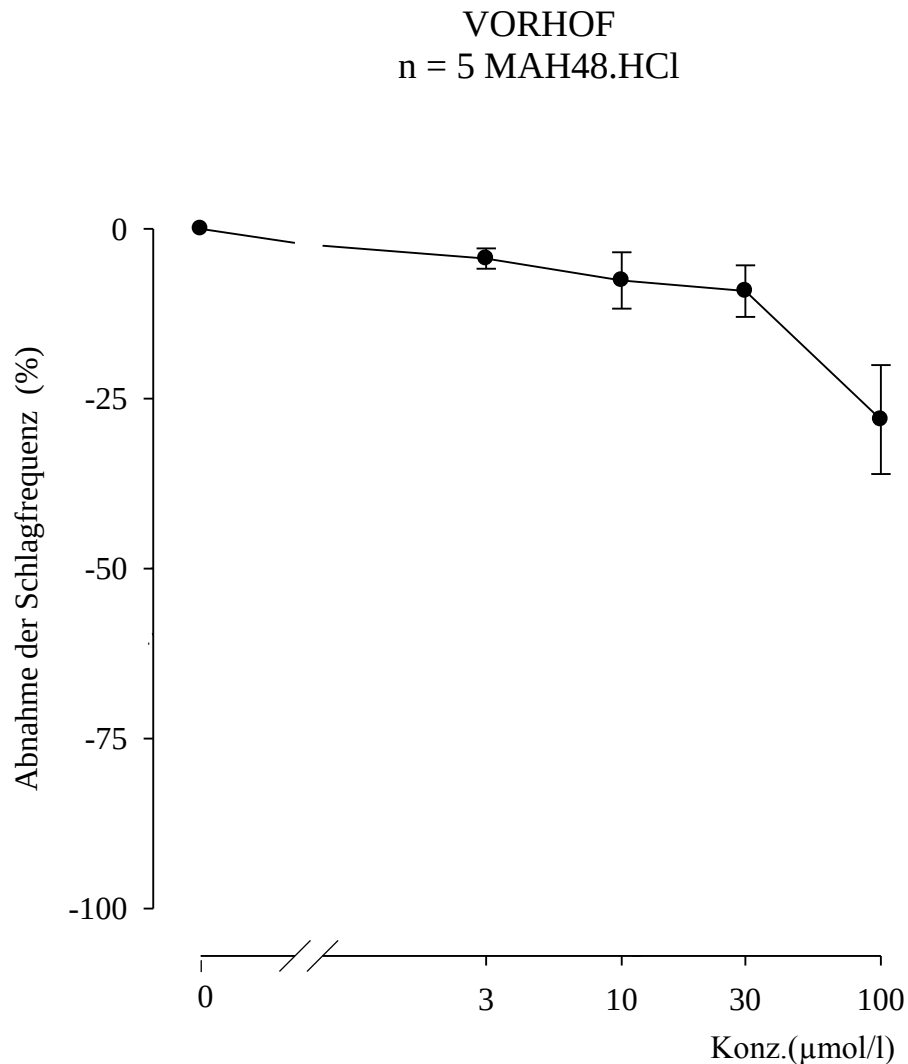
Tabelle 6: Versuchsergebnisse von MAH 48.HCl am rechten Vorhof

MAH 48.HCl $\mu\text{mol/l}$	$f \pm \text{SEM}$ (x/min)	$f \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$211 \pm 9,00$	0	5	---
3	$202 \pm 10,56$	$-4,39 \pm 1,50$	5	n.s.
10	$199 \pm 12,18$	$-7,60 \pm 4,15$	5	n.s.
30	$195 \pm 13,03$	$-9,17 \pm 3,80$	5	0,05
100	$163 \pm 15,86$	$-28,07 \pm 8,02$	5	0,05

Legende zu Tabelle 6:

Diese Tabelle veranschaulicht die festgestellte Abnahme der Schlagfrequenz und den arithmetischen Mittelwert der Schlagzahl (f) pro Minute. Zudem ist der jeweilige Standardfehler für die jeweiligen Konzentrationen angegeben. N steht für die Anzahl der Versuche

Diagramm 1: Konzentration-Wirkungskurve von MAH 48.HCl am rechten Vorhof



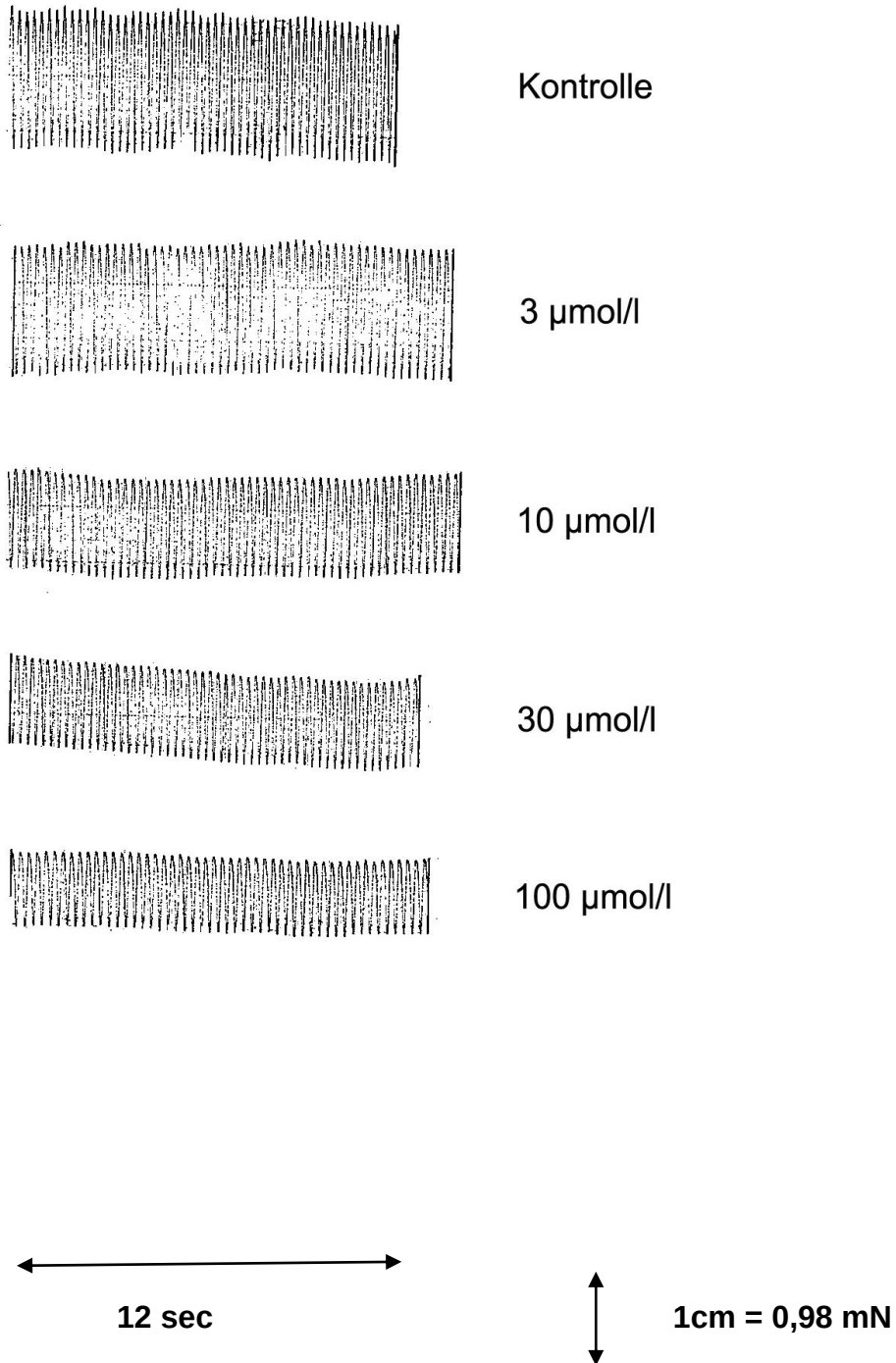
Legende zu Diagramm 1:

In der oben abgebildeten Konzentrations-Wirkungskurve zeigt den Zusammenhang zwischen der Abnahme der Schlagfrequenz und der Substanzkonzentration, die dies herbeigeführt hat.

Auf der y- Achse ist die prozentuale Abnahme der Chronotropie aufgetragen, auf der x- Achse die logarithmischen Substanzkonzentrationen.

Die Mittelwerte der nach jeder Substanzzugabe gemessenen Schlagfrequenz sind durch die Punkte in diesem Diagramm markiert. Die durch die Punkte laufenden Balken markieren die dazu gehörige Standardabweichung.

Abbildung 17: Originalaufzeichnung der chronotropen Wirkung von MAH 48.HCl



Legende zu Abbildung 17:

Die Originalabbildung veranschaulicht den Verlauf der negativ chronotropen Wirkung der Testsubstanz auf den rechten Vorhof.

4.1.2. Musculus papillaris

Der Einfluss der Testsubstanz MAH 48.HCl auf die Inotropie wurde in insgesamt 4 Versuchen am Papillarmuskel getestet und ausgewertet.

Nachdem eine konstante Schlagfrequenz erreicht wurde, setzte man die Testsubstanz nach dem bekannten Pipettierschema in den Konzentrationen 3, 10, 30, und 100 $\mu\text{mol/l}$ alle 45 Minuten zu. Die Mittelwerte und Standardfehler sind in Tabelle 7 dargestellt.

Die negative Inotropie zeigt sich durch verringerte Kontraktionsfähigkeit des Papillarmuskels nach der Stufenweisen Zugabe der Testsubstanz. Die Amplitudenlänge, angegeben in mm, wurde verkürzt, was auf eine negative inotrope Wirkung zurückzuführen war. Eine stark negativ inotrope Wirkung zeigte sich bei der dritten Konzentrationszugabe mit einer prozentualen Wirksamkeit von $-31,13 \pm 7,42$.

Eine EC_{50} wurde bei 67,5 $\mu\text{mol/l}$ erreicht.

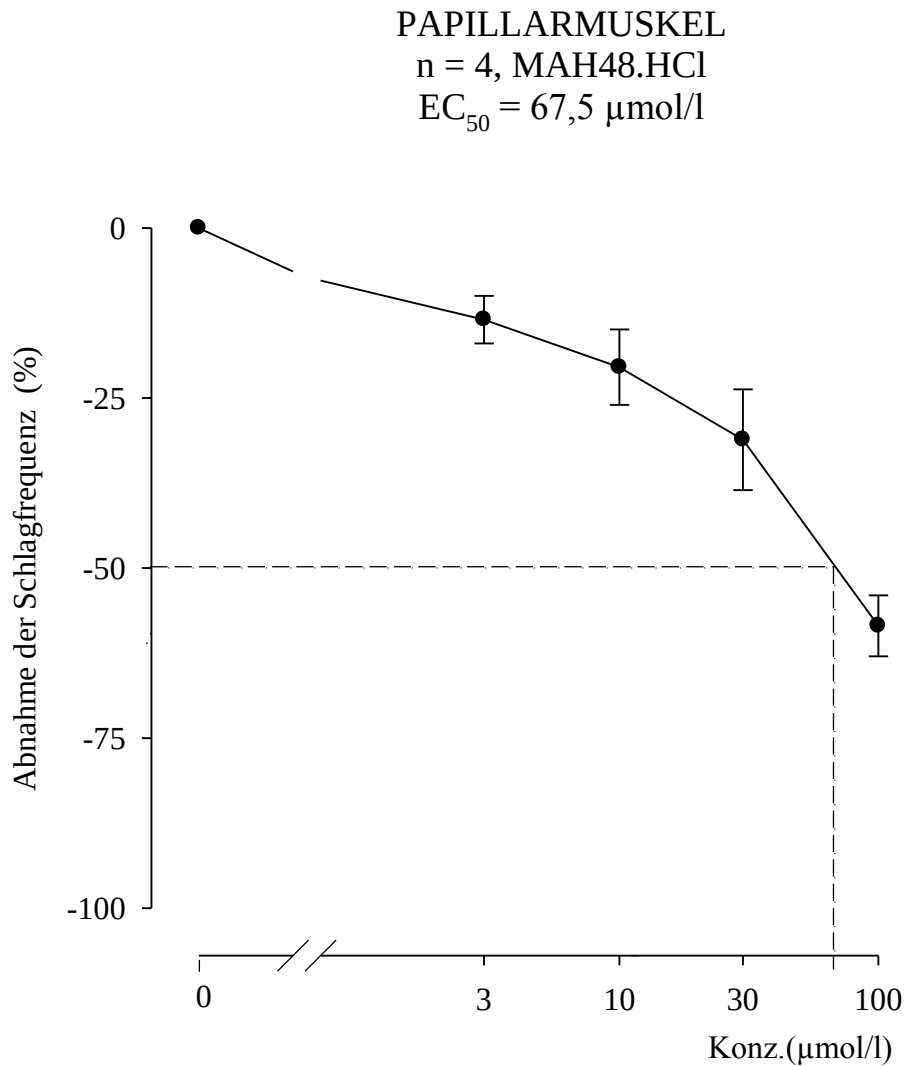
Tabelle 7: Versuchsergebnisse von MAH 48.HCl am Papillarmuskel

MAH 48.HCl $\mu\text{mol/l}$	$f_c \pm \text{SEM}$ (x/min)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums-Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$3,96 \pm 0,88$	0 ± 0	4	-
3	$3,40 \pm 0,75$	$-13,49 \pm 3,50$	4	0,05
10	$3,16 \pm 0,78$	$-20,47 \pm 5,54$	4	0,05
30	$2,77 \pm 0,77$	$-31,13 \pm 7,42$	4	0,05
100	$1,65 \pm 0,42$	$-58,50 \pm 4,48$	4	0,01

Legende zu Tabelle 7:

Diese Tabelle veranschaulicht den arithmetischen Mittelwert der Inotropie mit Standardfehler (SEM). Ebenso ist die prozentuale Abnahme der Schlagkraft nach jeder Substanzzugabe und die Irrtumswahrscheinlichkeit dargestellt.

Diagramm 2: Konzentrations- Wirkungskurve von MAH 48.HCl am Papillarmuskel

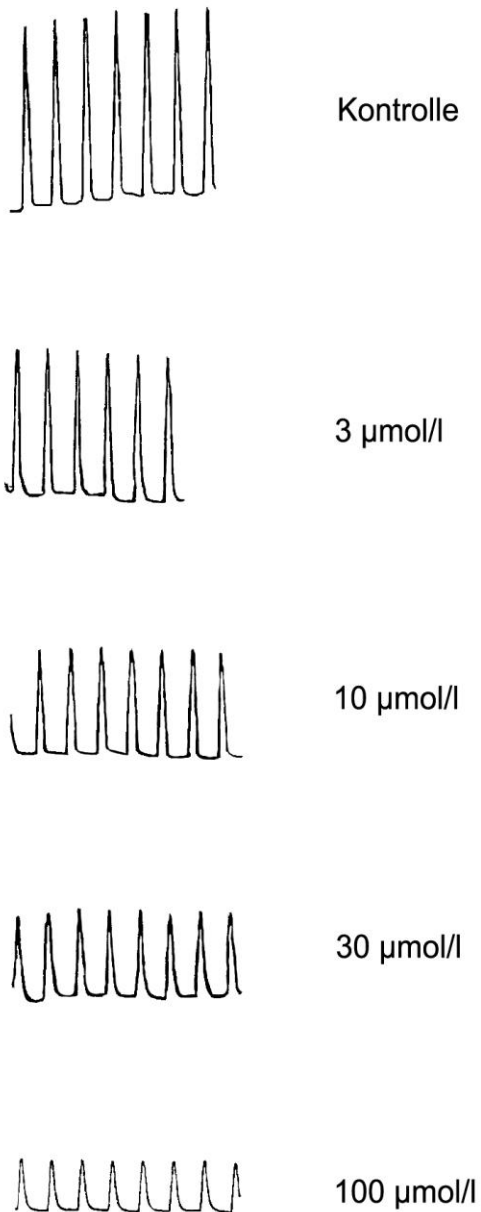


Legende zu Diagramm 2:

In diesem Diagramm ist die Beziehung zwischen der jeweiligen Konzentration der Testsubstanz und der Abnahme der Schlagkraft in Prozent graphisch dargestellt. Die durch die Punkte der Mittelwerte laufenden Balken markieren die dazu gehörige Standardabweichung.

Deutlich ersichtlich ist der EC₅₀-Wert bei einer Konzentration von 14,5 µmol/l.

Abbildung 18: Originalaufzeichnung der inotropen Wirkung von MAH 48.HCl



↑
↓ 1 cm = 0,98 mN

Legende zu Abbildung 18:

In dieser Originalabbildung ist die stark negativ inotrope Wirkung der Testsubstanz MAH 48.HCl zu erkennen.

4.1.3. Aorta descendens

Für die Untersuchung der vasodilatierenden Wirkung von MAH 48.HCl wurde die Aorta herangezogen. Die Versuchsdurchführung wurde bereits im Kapitel 3.7.1.4. erläutert. Es wurden 4 Versuche durchgeführt.

Nachdem eine maximale Kontraktion durch die Kaliumchloridlösung induziert wurde, habe ich es der Aorta, durch die Zugabe der Testsubstanz MAH 48.HCl nach dem bekannten Pipettierschema, ordentlich besorgt. Die dadurch entstandene Relaxation der glatten Muskulatur wurde gemessen durch die Abnahme der Distanz zur Nulllinie. Bei der vollen Testsubstanzzugabe kam es lediglich nur zu einem Effekt von $-21,09 \pm 7,60$.

Ein EC_{50} -Wert konnte leider nicht erreicht werden.

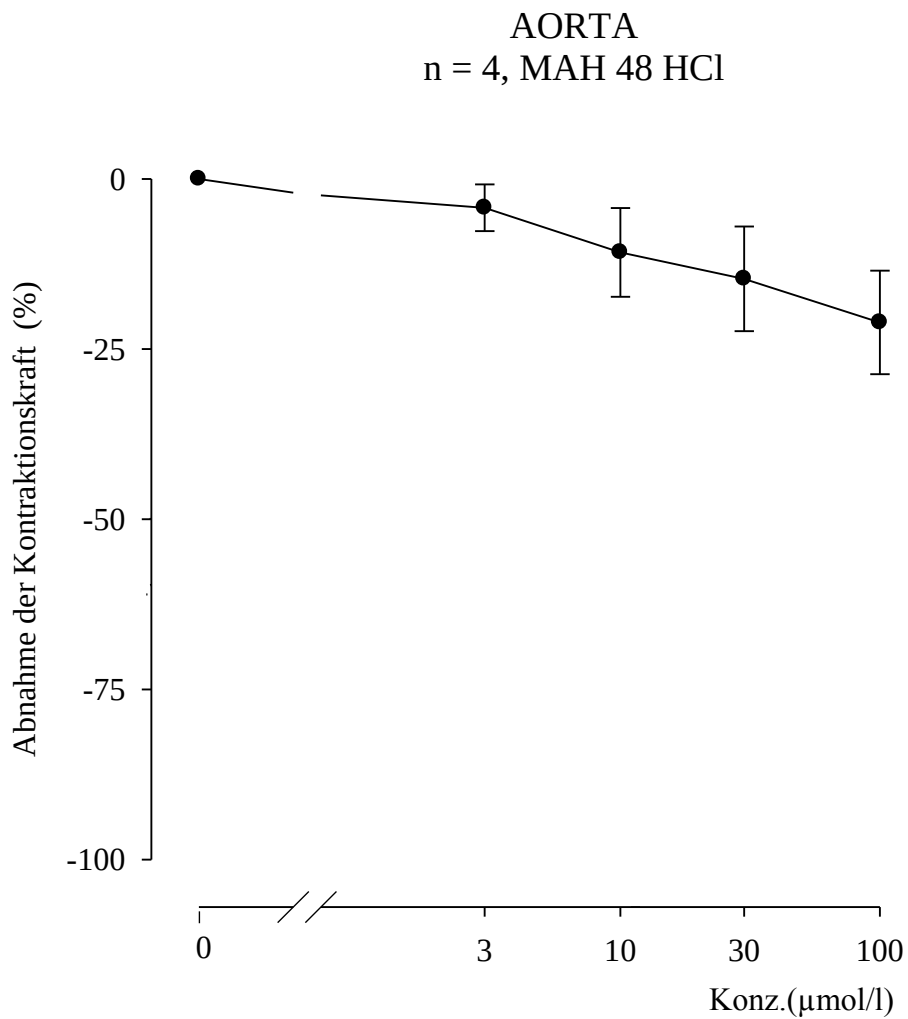
Tabelle 8: Versuchsergebnisse von MAH 48.HCl an der Aorta

MAH 48.HCl $\mu\text{mol/l}$	$f_c \pm \text{SEM}$ (x/min)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$8,6 \pm 0,93$	0 ± 0	4	-
3	$8,30 \pm 2,26$	$-4,24 \pm 3,43$	4	n.s.
10	$7,81 \pm 1,32$	$-10,8 \pm 6,51$	4	0,05
30	$7,49 \pm 1,36$	$-14,68 \pm 7,69$	4	0,05
100	$6,96 \pm 1,32$	$-21,09 \pm 7,60$	4	0,05

Legende zu Tabelle 8:

Diese Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte und die zugehörigen Standardfehler. Ebenso die Anzahl der Versuche (n) und den prozentualen Wert im Vergleich zur Referenz. Die Kontraktionskraft f_c ist in mN angegeben.

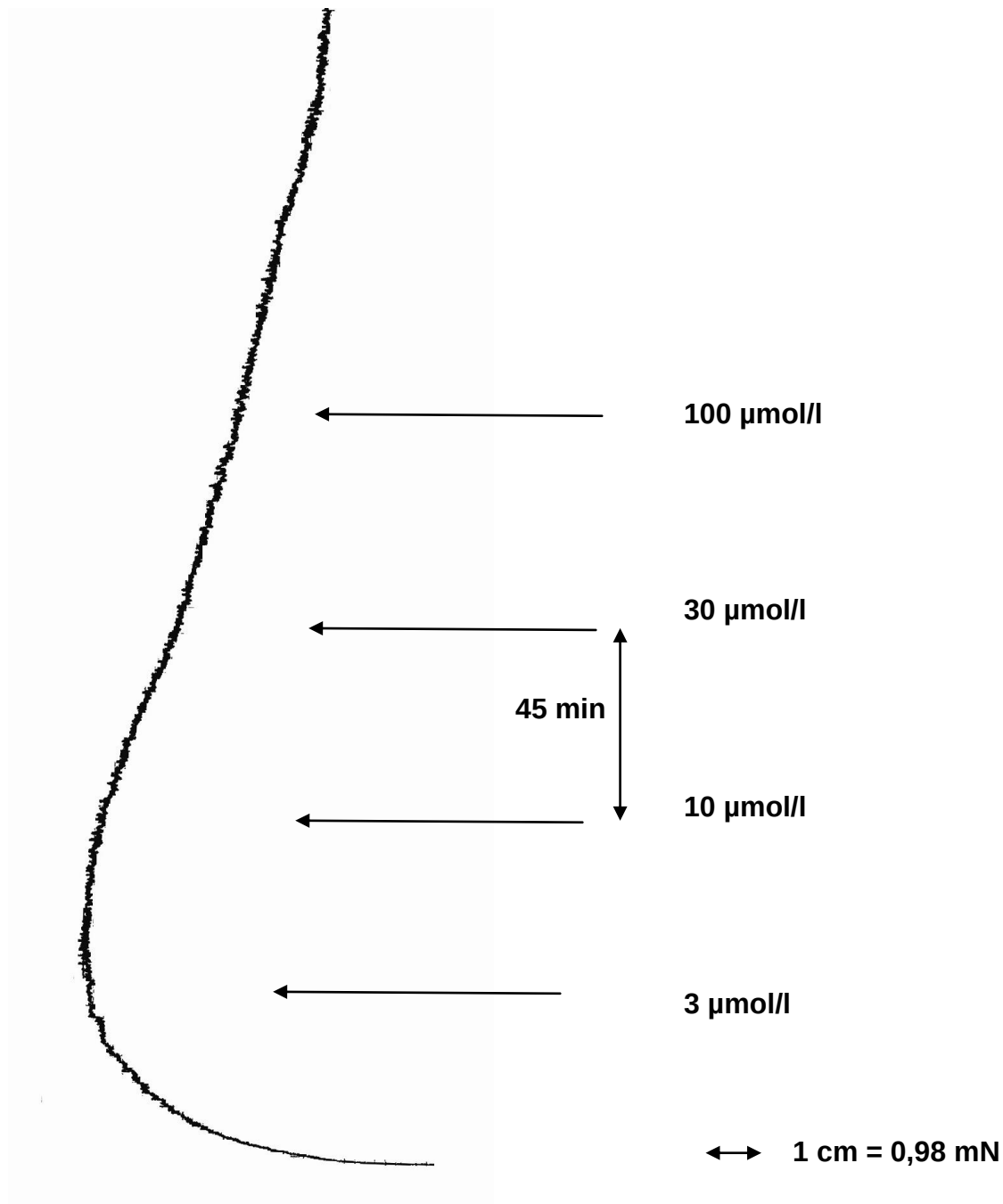
Diagramm 3: Konzentrations- Wirkungskurve von MAH48.HCl



Legende zu Diagramm 3:

In diesem Graphen ist der Zusammenhang der Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent als Auswirkung der Konzentrationserhöhung der Testsubstanz erkennbar. Die durch die Punkte laufenden Balken markieren die dazu gehörige Standardabweichung. Die Dilatation ist allerdings zu schwach, sodass keine EC_{50} erreicht wird.

Abbildung 19: Originalabbildung der dilatierenden Wirkung an der Aorta descendens.



Legende zur Originalabbildung Abbildung 19:

Nach dem Erreichen einer Plateuphase wurde mit der Zugabe der Testsubstanz nach dem bekannten Pipettierschema begonnen. Es ist allerdings nur eine schwache dilatierende Wirkung zu erkennen.

4.1.4. Arteria pulmonalis

Die Untersuchung der dilatierenden Wirkung der Pulmonalarterie mittels MAH 48.HCl wurde in 5 Versuchen durchgeführt. Der Versuchsablauf wurde in Kapitel 3.7.1.4. bereits erläutert. Der berechnete Mittelwert der 4 Kontrollwerte belief sich auf $14,52 \pm 0,32$ mN und wurde als Kontrollwert von 0% herangezogen. Insgesamt wurde allerdings nur eine schwache Wirkung der Testsubstanz auf die Pulmonalarterie festgestellt. Es kam weder zu einem EC_{50} -Wert, noch zu einer vollständigen Vasodilatation.

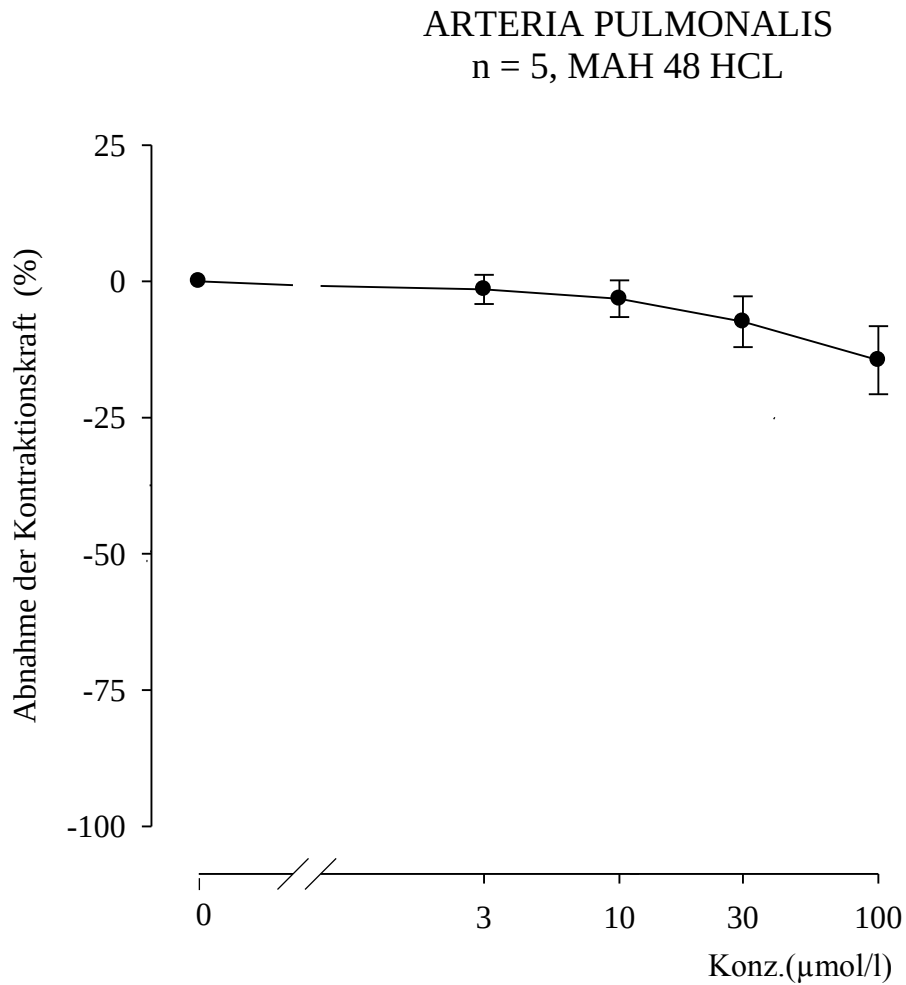
Tabelle 9: Versuchsergebnisse von MAH 48.HCl an der Lungenarterie

MAH 48.HCl $\mu\text{mol/l}$	$f_c \pm \text{SEM}$ (x/min)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums-Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$14,52 \pm 0,32$	0 ± 0	5	-
3	$9,34 \pm 3,75$	$-1,48 \pm 2,69$	5	n.s.
10	$9,24 \pm 3,92$	$-3,20 \pm 3,37$	5	n.s.
30	$8,94 \pm 4,10$	$-7,40 \pm 4,66$	5	0,05
100	$8,34 \pm 4,07$	$-14,46 \pm 6,25$	5	0,05

Legende zu Tabelle 9:

Diese Tabelle zeigt den für jede Konzentration der 5 Versuche ermittelten Mittelwert der Kontraktionskraft samt Standardfehler. Die Abnahme ist in Prozent angegeben.

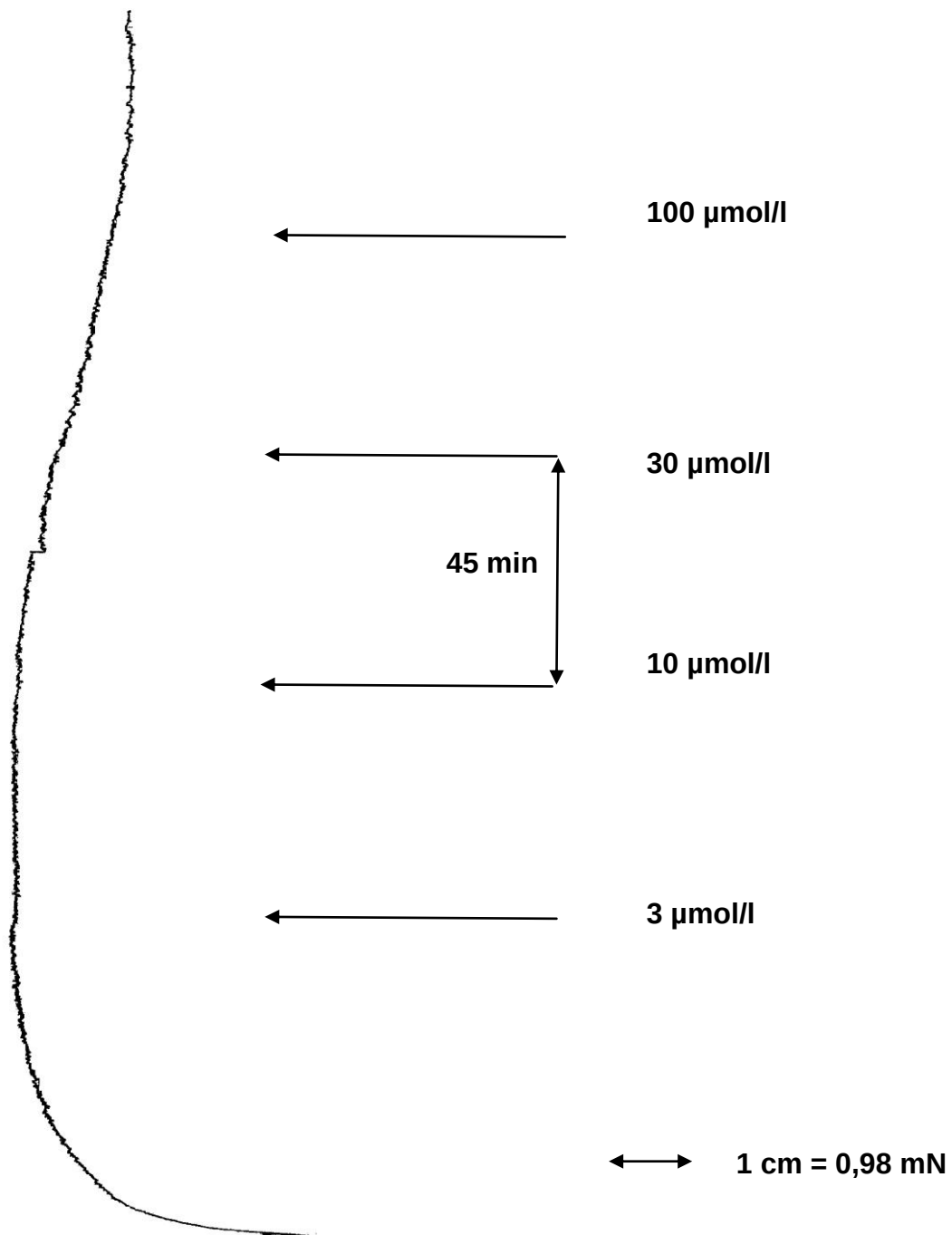
Diagramm 4: Konzentrations- Wirkungskurve von MAH 48.HCl an der Lungenarterie



Legende zu Diagramm 4:

Das vorliegende Diagramm zeigt das Verhältnis zwischen Konzentration und Wirkung von MAH 48.HCl auf die Lungenarterie. Die durch die Punkte laufenden Balken markieren die dazu gehörige Standardabweichung. Die Testsubstanz zeigte jedoch nur eine schwache Wirkung, sodass keine EC_{50} erreicht werden konnte.

Abbildung 20: Originalaufzeichnung der dilatierenden Wirkung an der Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 20:

Nach dem Erreichen einer Plateuphase wurde mit der Zugabe der Testsubstanz MAH 48.HCl nach dem bekannten Pipettierschema begonnen.

4.1.5. Terminales Ileum

Zur Untersuchung der spasmolytischen Wirkung von MAH 48.HCl am terminalen Ileum bzw. seiner glatten Muskulatur wurden 4 Versuche durchgeführt. Die Präparation und der Versuchsablauf wurde in den Kapiteln 3.5.1.4. und 3.7.1.2 bereits erläutert. Der berechnete Mittelwert der 4 Kontrollwerte belief sich auf $8,79 \pm 1,71$ mN und wurde als Kontrollwert von 0% herangezogen. Ebenso wie bei Aorta und Lungenarterie wurden nach der maximalen Kontraktion mittels KCl-Lösung eine mögliche Dilatation untersucht. Im Vergleich zur Lungenarterie kam es jedoch hier zu einer doppelt so starken Dilatation des Krummdarms durch MAH 48.HCl.

Ein EC_{50} -Wert wurde aber auch hier nicht erreicht.

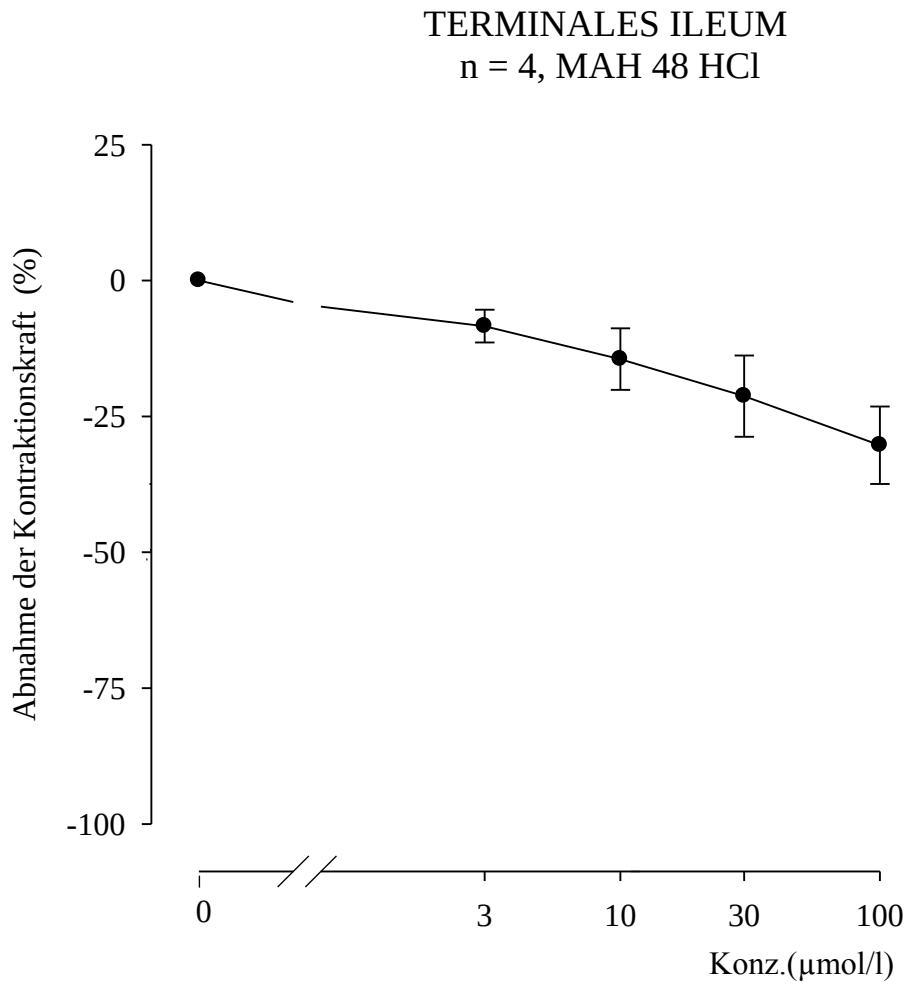
Tabelle 10: Versuchsergebnisse von MAH 48.HCl am Dünndarm

MAH 48.HCl $\mu\text{mol/l}$	$f_c \pm \text{SEM}$ (x/min)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$8,79 \pm 1,71$	0 ± 0	4	-
3	$8,16 \pm 1,83$	$-8,38 \pm 3,02$	4	n.s.
10	$7,66 \pm 1,92$	$-14,45 \pm 5,66$	4	n.s.
30	$7,06 \pm 1,92$	$-21,26 \pm 7,48$	4	0,05
100	$6,29 \pm 1,78$	$-30,30 \pm 7,12$	4	0,01

Legende zu Tabelle 10:

Die Tabelle zeigt die Veränderung der Kontraktionskraft nach kumulativer Testsubstanzzugabe. Standardfehler sowie die prozentuale Abnahme der Kontraktionskraft sind ebenso dargestellt.

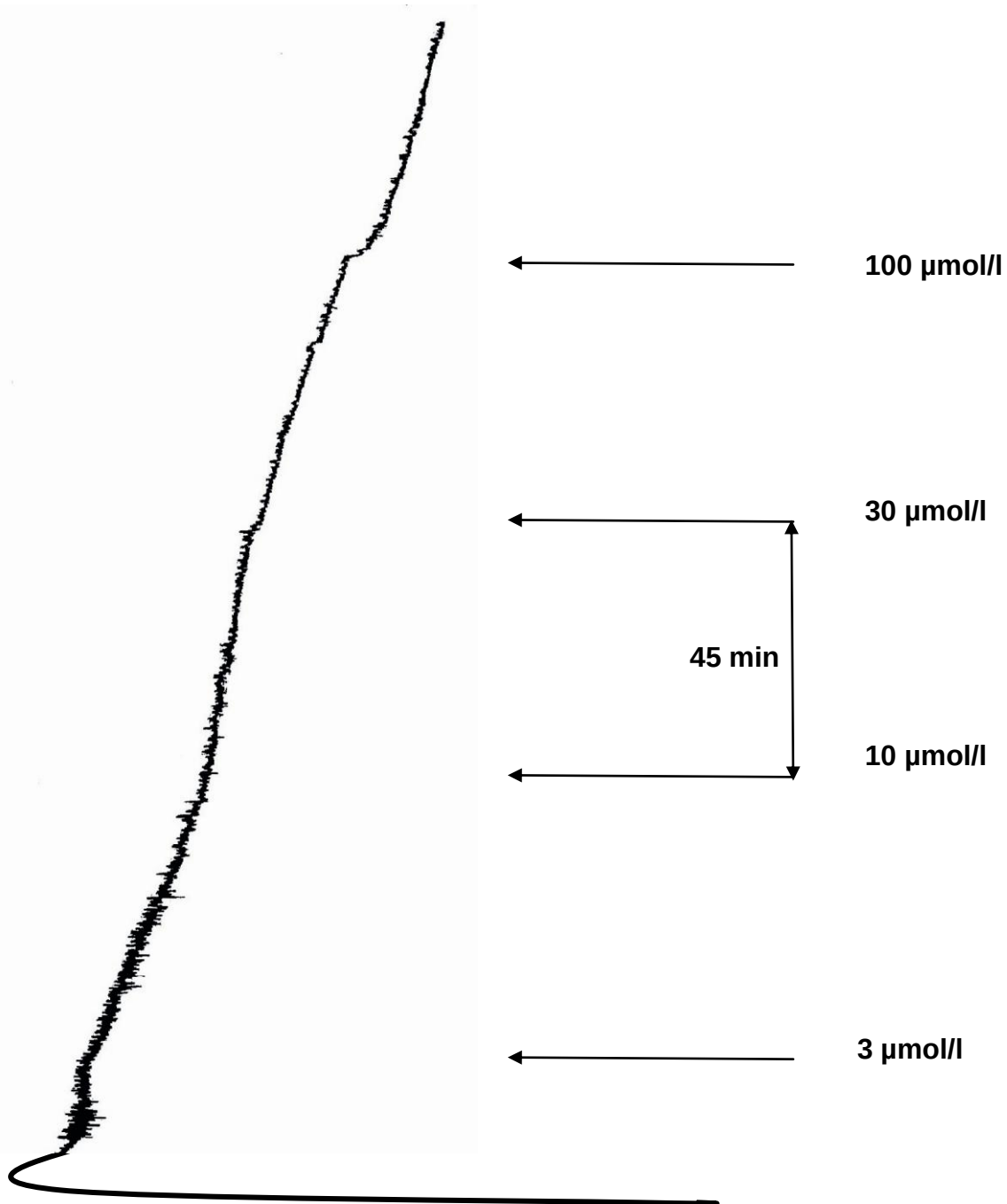
Diagramm 5: Konzentrations- Wirkungskurve von MAH 48.HCl am terminalen Ileum



Legende zu Diagramm 5:

Dieses Diagramm zeigt die prozentuale Abnahme der Kontraktionskraft in Zusammenhang mit der kontinuierlichen Substanzzugabe am terminalen Ileum. Die durch die Punkte laufenden Balken markieren die dazu gehörige Standardabweichung. Leider konnte auch hier keine EC 50 erreicht werden, jedoch zeigt sich deutlich eine Abnahme der Gefäßkontraktion.

Abbildung 21: Originalaufzeichnung der spasmolytischen Wirkung des terminalen Ileums



Legende zu Abbildung 21:

Im Kurvenverlauf ist die spasmolytische Wirkung von MAH 48.HCl auf den Krummdarm dargestellt. Nach Erreichen einer Plateauphase wurde mit der kumulativen Zugabe der Testsubstanz begonnen. Es ist eine stete Abnahme der Kontraktion ersichtlich, jedoch wird keine EC_{50} erreicht.

4.2. Versuche zur Analyse des Wirkmechanismus der Testsubstanz MAH 48.HCl auf den terminalen Ileum

Die Testsubstanz MAH 48.HCl zeigte beim terminalen Ileum, dem Dünndarm, die stärkste und effektivste Wirkung. Aus diesem Grund wurden an diesem weitere Versuche durchgeführt, um den genauen Wirkmechanismus zu erkunden.

Hierfür wurde der Kaliumkanalblocker Glibenclamid hergenommen, der bereits im Kapitel 3.7.2. erläutert wurde.

Wirkung von Glibenclamid auf das terminale Ileum

MAH 48.HCl ist womöglich ein Prodrug, der im Organismus Schwefelwasserstoff freisetzt, und somit die ATP-abhängigen Kaliumkanäle aktiviert, was zu einem vasodilatierenden Effekt führt (Vohr 2010).

Nun stellt sich die Frage, ob die Wirkung der Testsubstanz wirklich auf die Öffnung der K_{ATP} -Kanäle zurückzuführen ist. Um das zu beantworten, wurden diese Kaliumkanäle mit Glibenclamid blockiert.

Hierfür wurde nach Erreichen der konstanten Plateauphase nach maximaler Kontraktion durch 90 mmol/l KCl-Lösung 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid injiziert, um den Effekt der Blockade zu erreichen. Nach der 45 minütigen Gewöhnungsphase wurde die aliquote Menge von 100 $\mu\text{mol/l}$ der Testsubstanz MAH 48.HCl zugegeben, um eine mögliche Antagonisierung von Glibenclamid zu erforschen. Dies würde auf die Öffnung der entsprechenden ATP-abhängigen Kaliumkanäle als Wirkmechanismus schließen lassen.

Für die Testsubstanz MAH 48.HCl konnte ich allerdings keinen richtigen Unterschied zwischen der alleinigen Wirkung von Glibenclamid und der Kombination von dem Wirkstoff mit Glibenclamid feststellen, was im Balkendiagramm dargestellt ist.

Anhand der Versuche konnte also festgestellt werden, dass die Abnahme der Kontraktion des terminalen Ileum durch MAH 48.HCl unter anderem auf die Öffnung der ATP-abhängigen Kanäle zurückzuführen ist.

Jedoch bleibt es ungeklärt, ob noch andere Mechanismen oder Vorgänge daran beteiligt sind, wie zum Beispiel die sympathische Regulation der Gefäße oder die Aktivierung des NO-Systems. Dies müsste allerdings in weiteren Versuchen geklärt werden.

Sicher kann man allerdings sagen, dass die Wahrscheinlichkeit der Beteiligung der Kaliumkanäle, durch Antagonisierung durch Glibenclamid, an der Wirkung von MAH 48.HCl, als sehr hoch einzustufen ist.

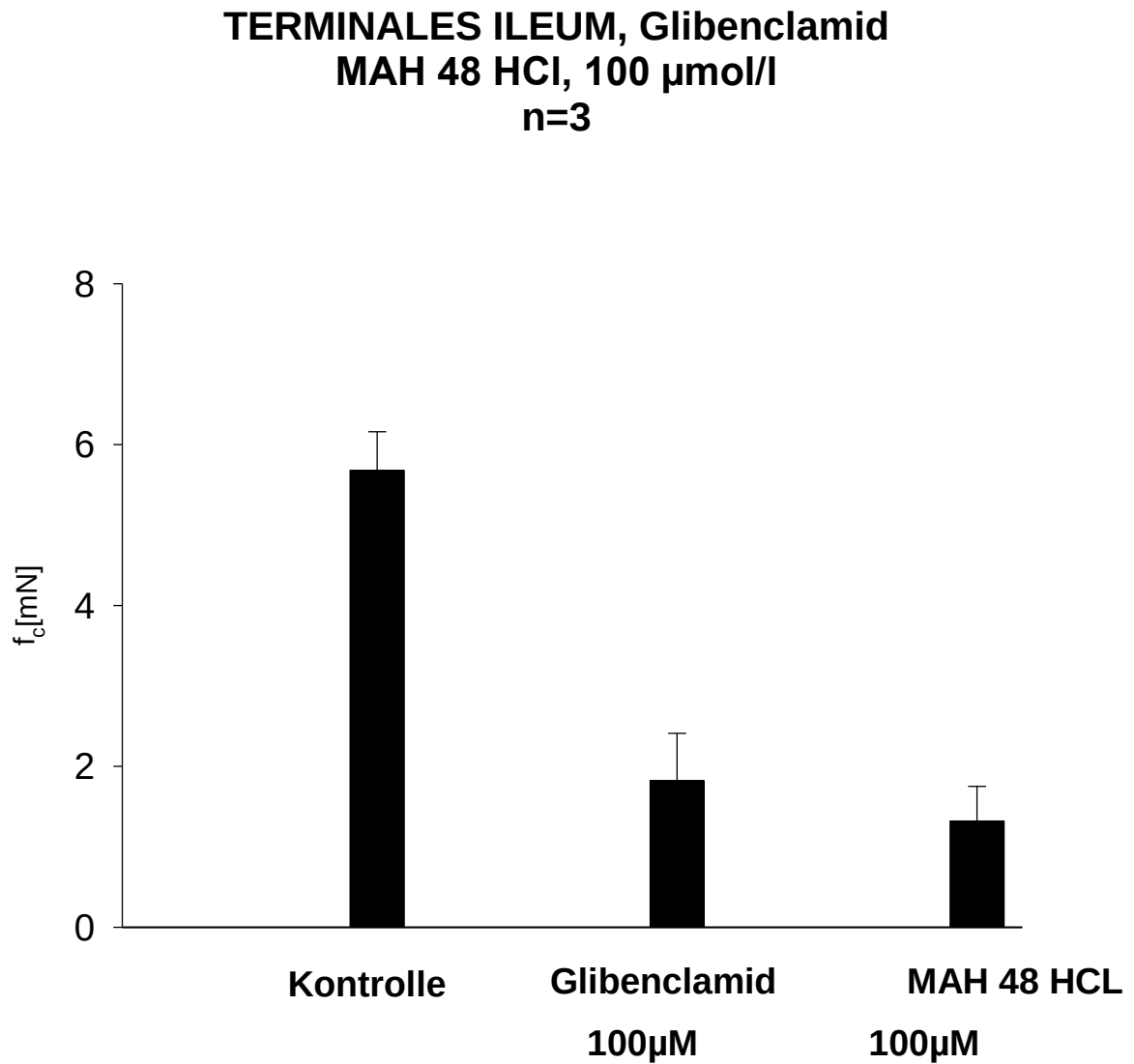
Tabelle 11: Versuchsergebnis von MAH 48.HCl in Kombination mit Glibenclamid

Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$5,68 \pm 0,48$	3	-
100 μM Glibenclamid	$1,82 \pm 0,59$	3	-
+ 100 μM MAH 46.HCL	$1,32 \pm 0,43$	3	n.s.

Legende zu Tabelle 11:

In dieser Tabelle sind die Mittelwerte der Kontraktionsveränderungen und Standardfehler für die Konzentrationen von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und Glibenclamid kombiniert mit 100 $\mu\text{mol/l}$ MAH 48. HCl, angegeben.

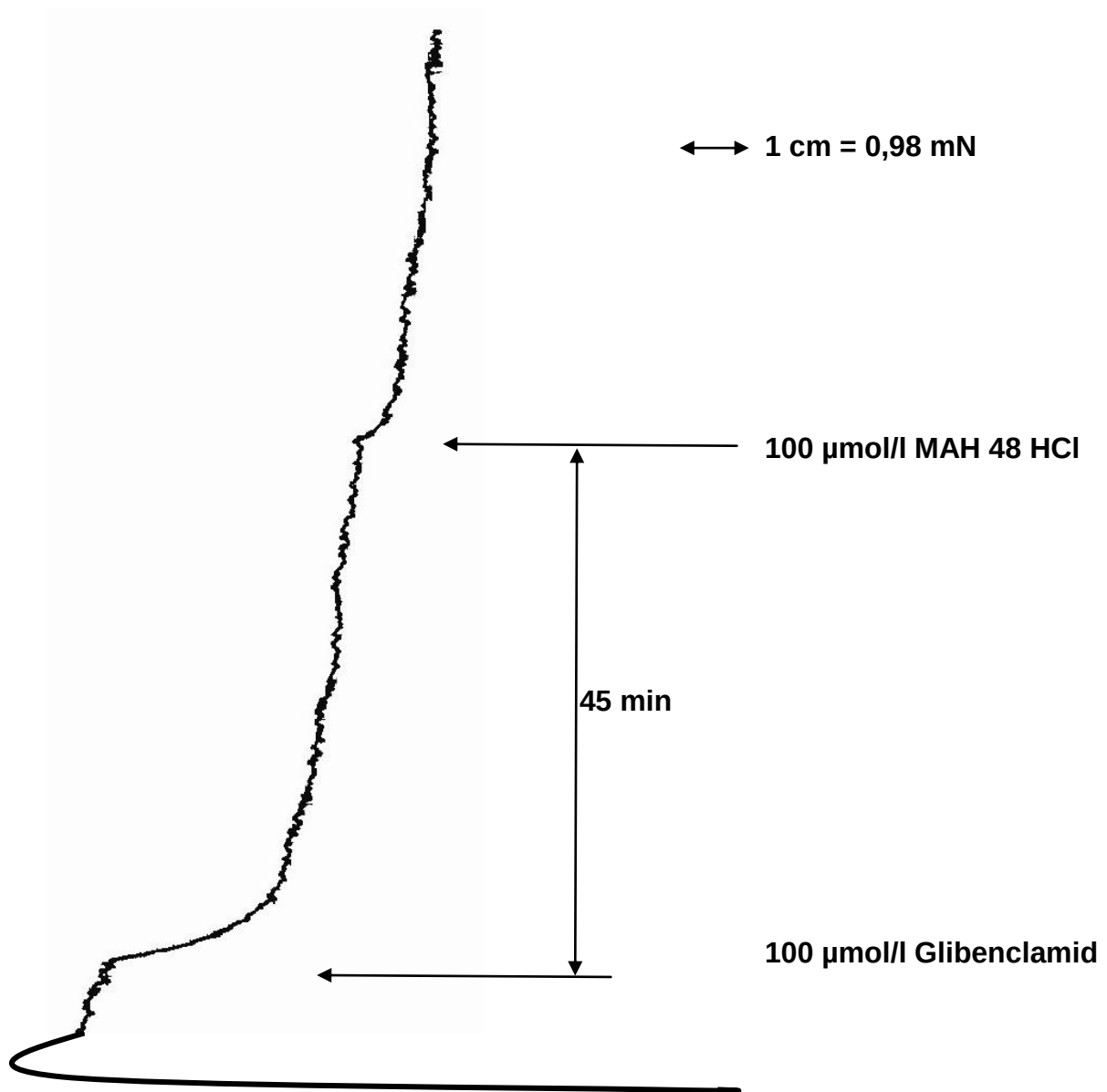
Diagramm 6: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Versuche in einem Balkendiagramm



Legende zu Diagramm 6:

Dieses Balkendiagramm stellt die Auswirkung der Kontraktilität nach Glibenclamid-Zugabe sowie nach der zusätzlichen Zugabe von der Testsubstanz dar.

Abbildung 22: Originalaufzeichnung des Versuchs von Glibenclamid in Kombination mit MAH 48.HCl auf das terminale Ileum



Legende zu Abbildung 22:

Ebenso wie bei den anderen Versuchen wurde auch hier nach maximaler Kontraktion und anschließend erreichter Plateauphase mit dem Einspritzen von Glibenclamid begonnen. Nach einer 45-minütigen Gewöhnungsphase wurde die Testsubstanz zugespritzt.

5. Diskussion

Die Zielsetzung dieser Diplomarbeit war die Untersuchung der Wirkstärke der zu testenden Substanz MAH 48. HCl auf die verschiedenen Arten der Muskulatur. Anhand der Herzmuskulatur, die aus quergestreiften Gewebe besteht, wurde sowohl die inotrope als auch die chronotrope Wirkung untersucht. Die spasmolytische bzw. vasodilatierende Wirkung von MAH 48.HCl wurde anhand der glatten Muskulatur getestet.

5.1. Wirkung auf die glatte Muskulatur

Eine glatte Muskulatur findet man in der Arteria pulmonalis, der Aorta descendens und dem terminalen Ileum. Der Vasodilatierende Effekt wurde der Aorta und der Lungenarterie getestet, der spasmolytische Effekt am Darm.

Tabelle 12: Wirkung von MAH 48.HCl auf die glatte Muskulatur

Organpräparat	Kontraktionskraftänderung bei 100 $\mu\text{mol/l}$ MAH 48.HCL
	$f_c (\%) \pm \text{SEM}$
Aorta	$-21,09 \pm 7,60$
Arteria pulmonalis	$-14,46 \pm 6,25$
Terminales Ileum	$-30,30 \pm 7,12$

Die Tabelle 12 stellt die Wirkungen von MAH 48.HCl bei der Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ auf die Organpräparate der glatten Muskulatur dar.

Es konnte an allen 3 Organen eine leicht dilatierende bzw. spasmolytische Wirkung erforscht werden, wobei allerdings bei keinem der drei Präparate eine EC_{50} -Wirkung erreicht wurde.

Da die Wirkung am terminalen Ileum am stärksten ausgeprägt war, wurde er zur näheren Untersuchung des Wirkmechanismus hergenommen. Der Effekt von 100 $\mu\text{mol/l}$ MAH 48.HCl lag hierbei bei $-30,30 \pm 7,12$.

Der Gefäßmuskel der Aorta wurde nicht ganz so stark relaxiert. Die maximale dilatierende Wirkung wurde bei 100 $\mu\text{mol/l}$ MAH 48.HCl erreicht und lag bei $-21,09 \pm 7,60$. Diese dilatierende Wirkung wurde beim terminalen Ileum allerdings schon bei einer Testsubstanzkonzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ erreicht.

Die Wirkung an der Arteria pulmonalis war auffallend gering im Vergleich zu den anderen beiden Präparaten. Obwohl die Muskulatur gleich aufgebaut ist, kam es erst bei der Zugabe von 10 $\mu\text{mol/l}$ zu einer einigermaßen bestimmbaren Änderung des Effektes. Die maximale Änderung der Kontraktilität lag nach der Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ nur bei $-14,46 \pm 6,25$ was lediglich circa die Hälfte der Wirkung am Dünndarm betrug.

Eine vergleichbare Entspannung des Muskels wurde bei der Aorta bereits bei 30 $\mu\text{mol/l}$ und beim Darm bereits bei 10 $\mu\text{mol/l}$ erreicht.

5.2. Möglicher Wirkmechanismus am terminalen Ileum

Aufgrund der Tatsache, dass die Wirkung am terminalen Ileum am stärksten ausgeprägt war, wurde, wie bereits erwähnt, hier die genaueren Eigenschaften des Wirkmechanismus untersucht.

In der Versuchsreihe wurde erforscht, ob die Wirkung durch das Öffnen der Kaliumkanäle zustande kam. Als Kaliumkanalblocker diente hier der Sulfonylharnstoff Glibenclamid.

Ein Hinweis auf die Beteiligung der Kaliumkanäle war, dass es durch MAH 48.HCl nur mehr zu einer geringfügigen Abnahme der Konzentrationskraft kam.

Im Kapitel 4.3. findet man dazu die graphische Darstellung.

Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass noch weitere Mechanismen an der Wirkung von MAH 48.HCl beteiligt sind. Dies müsste durch weitere Versuche erforscht werden.

5.3. Wirkung auf die Herzmuskulatur

Tabelle 13: Wirkung von MAH 48.HCl auf die quergestreifte Muskulatur

Organpräparat	MAH 48.HCL Kontraktionskraft f_c (%) ± SEM bei 100 µmol/l
Rechter Vorhof	-28,07 ± 8,02
Papillarmuskel	-58,50 ± 4,48

Die Tabelle 13 veranschaulicht die Wirkung von MAH 48.HCl auf die quergestreifte Muskulatur.

Deutlich zu erkennen ist ein starker Effekt auf den Muskulus papillaris, wo bei einer Konzentration von 67,5 µmol/l eine mittlere Effektive Konzentration (EC_{50}), erreicht wurde.

Darunter versteht man, dass bei jener Konzentration die Amplitudenstärke bzw. Kontraktionskraft um die Hälfte reduziert wurde.

Eine negative Inotropie durch MAH 48.HCl ist bereits ab einer Konzentrationszugabe von 3 µmol/l erkennbar. Bei der 100prozentigen Konzentrationszugabe lag die Wirksamkeit bei $-58,50 \pm 4,48$.

Beim rechten Vorhof kam es ebenfalls durch MAH 48.HCl zu einer Reduktion der Schlagfrequenz. Jedoch kam hier kein EC_{50} -Wert zustande.

Bei den ersten drei Konzentrationszugaben kam es nur zu einer geringen Abnahme der Chronotropie, welche jedoch nach Zugabe der letzten kumulativen Konzentration stärker abnahm. Der Effekt der Chronotropie lag hier bei $-28,07 \pm 8,02$.

Als Resumé kann eine Wirkung der Testsubstanz MAH 48.HCl auf die glatte Muskulatur sowie auch auf die quergestreifte Muskulatur festgestellt werden.

Diese ist vor allem an der negativen Inotropie des Musculus papillaris und negativen Chronotropie, sowie an der Änderung der Kontraktionskraft des terminalen Ileum zu erkennen.

Ausführliche Untersuchungen aus dem Jahre 2001, postuliert durch Zhao et al., beschrieben die Wirkung von Schwefelwasserstoff (H_2S) auf die glatte und vaskuläre Muskulatur von Ratten.

Da die in dieser Diplomarbeit zu untersuchende Testsubstanz, MAH 48.HCl, auch H_2S freisetzt, kann sie mit den Ergebnissen aus dieser Studie verglichen werden.

In der genannten Studie wurden die Aortenringe jeweils mit 20mmol KCl und 100 mmol KCl kontrahiert. Bei der ersten Konzentration kam es zu einer Relaxation von 90 $\pm$ 8,2%, bei der höheren nur zu 19 $\pm$ 3,9%. Dieser Relaxationsunterschied zeigte wie hoch zusätzlich eine mögliche Wirkung durch eine Veränderung der Kaliumleitfähigkeit der Kanäle sein könnte (Zhao et al.)

MAH 48.HCl zeigte jedoch im Vergleich zu den Ergebnissen von Zhao eine weitaus geringere relaxierende Wirkung auf die Aorta descendens.

Die maximale Kontraktion lag bei $-21,09 \pm 7,60\%$, obwohl die Präparate der Aorta mit einer 90mmolaren KCl vorkontrahiert wurden. Ein halbmaximaler Effekt wurde auch bei voller Konzentration nicht erreicht.

Die Relaxation der Arteria pulmonalis war dazu im Vergleich noch geringer. Sie lag maximal bei $-14,46 \pm 6,25\%$.

Um präzisere Informationen über die eine stärkere Wirkung auf die quergestreifte Muskulatur, sowie über die unterschiedlichen Wirkungen auf die glatte Muskulatur zu erhalten, müsste man weitere Untersuchungen zum Wirkmechanismus durchführen, vor allem weil die geringe Wirkung auf die Aorta, wie auch der Frequenz der Herzmuskulatur und der starke Einfluss auf die Schlagkraft, nicht mit den Ergebnissen von Zhao et al. (2001) übereinstimmen.

In einem Weiteren Versuch zeigte Zhao et al. Jedoch, dass der hypotensive Effekt von H_2S durch den K_{ATP} -Kanalblocker Glibenclamid antagonisiert wurde und vom K_{ATP} -Kanalöffner Pinacidil imitiert wurde (Zhao et al. 2001).

Wiederum diese Annahme aber entspricht den Ergebnissen von MAH 48.HCl, da der Wirkmechanismus unter anderem auf die Kaliumkanalöffnung zurückzuführen ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für die in dieser Diplomarbeit zu untersuchende Substanz MAH 48.HCl keine signifikante vasodilatierende Wirkung festgestellt werden konnte, was vermutlich auf eine sehr geringen oder auch fehlenden Freisetzung von H_2S zurückzuführen ist.

6. Zusammenfassung

In dieser Diplomarbeit wurde eine durch das Department für pharmazeutische Chemie neu synthetisierte Substanz namens MAH 48.HCl an den isolierten Organen von Meerschweinchen getestet.

Untersucht wurde die Wirksamkeit auf die quergestreifte Muskulatur, sowie auf die glatte Muskulatur. Für die Versuche an der quergestreifte Muskulatur wurden das Atrium cordis dexter und der Musculus papillaris verwendet. Für jene an der glatten Muskulatur wurden die Aorta descendens, die Arteria pulmonalis und das terminale Ileum herangezogen.

Die isometrischen Kontraktionsmessungen dienten der Untersuchung der dilatierenden, spasmolytischen, inotropen und chronotropen Wirkung.

Hierfür wurden die Organe jeden Tag frisch präpariert, und in mit physiologischer Nährstofflösung gefüllten Organbädern, vermessen. Die Substanz wurde in Wasser gelöst und in 5 Schritten, die einer kumulativen Zugabe entsprachen, zugespritzt und vermessen. Die daraus resultierenden Veränderungen des Zustandes wurden mittels eines Kraftwandlers und Verstärkers auf einen Flachbettschreiber übertragen, der dann die entsprechende Kurve lieferte.

Die Testsubstanz konnte keine signifikant starke Wirkung an der glatten Muskulatur erzielen, da an keinem der drei Organe eine EC_{50} erreicht wurde. Die Wirkung der Substanz war am terminalen Ileum am stärksten ausgeprägt, weshalb dort der zu Grunde liegende Wirkmechanismus näher erforscht wurde, welcher auf eine Beteiligung der ATP- abhängigen Kaliumkanäle zurückgeführt werden konnte.

Eine stark negativ inotrope Wirkung der Testsubstanz auf die quergestreifte Muskulatur konnte am Papillarmuskel festgestellt werden. Nur dort konnte auch eine EC_{50} erreicht werden. Dieser lag bei $67,5\mu\text{mol/l}$.

7. Literaturverzeichnis

Abe K, Kimura H (1996) The possible role of hydrogen sulphide as an endogenous neuromodulator. J Neurosci 16: 1066-1071

Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, Cao K, Wang R (2004) Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol 287: H2316-2323

Forth W, Henschler D, Rummel W (2009) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10. Auflage, Elsevier München

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.

Huang XL, Zhou XH, Wei P, Zhang XJ, Meng XY, Xian XH (2008) Role of endogenous hydrogen sulfide in pulmonary hypertension induced by lipopolysaccharide. Sheng Li Xue Bao 60:211-215.

Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch (2004). 9. Auflage, Gruyter

Lee SW, Cheng Y, Moore PK, Bian JS (2007) Hydrogen sulphide regulates intracellular pH in vascular smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun 358:1142-1147.

Manna PT, Smith AJ, Taneja TK, Howell GJ, Lippiat JD, Sivaprasadarao A (2010) Constitutive endocytic recycling and pkc mediated lysosomal degradation control Katp channel surface Density J Biol Chem 285: 5963-5973.

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

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

Oberdisse E, Hackenthal E, Kuschinsky K (2001) Pharmakologie und Toxikologie. 3. Auflage, Springer Berlin

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

Smith RP, Gosselin RE (1979) Hydrogen sulfide poisoning *J Occup Med* 21:93-97.

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.

Wang R (2002) Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *Faseb J* 16:1792-1798

Wang YF, Mainali P., Tang CS, Shi L, Zhang CY, Yan H, Liu Xq, Du JB (2008) Effects of nitric oxide and hydrogen sulfide on the relaxation of pulmonary arteries in rats. *Chin Med J* 121:420-423.

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

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 W, Zhang J, Lu YJ, Wang R (2001) The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. *EMBO J* 20:6008-6016.

Zhao W, Wang R (2002) H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: 474-480

8. Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 1. April 1985

Geburtsort: Erlangen

Familienstand: ledig

Staatsbürgerschaft: Deutsch

Schulbildung:

1991-1995 Volksschule in Röttenbach

1995-2004 Ohm- Gymnasium Erlangen

2005 Abitur Schule Schloss Stein,
Internatsgymnasium für Jungen und Mädchen

ab Oktober 2005 Studium der Pharmazie in Wien

Bisherige Berufserfahrung:

Ferialpraktikum „St. Mauritius Apotheke“ in 91341 Röttenbach, Juli-September 2007

Ferialpraktikum Schlosserei Matheiwetz August 2008

Geschäftsführer der „Naturafit GmbH“- Diätetische Lebensmittelproduktions GmbH,
seit Februar 2009

Tutor für das Praktikum „Arzneistoffanalytik“ am Department für Pharmazeutische
Chemie 2011-2014