



# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Pharmakologische Aktivität eines neu synthetisierten  
Thiokohlensäure-Derivats MAH12.HCl  
an isolierten Organen von Meerschweinchen“

verfasst von

Hanna Reumann

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Pharmazie

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

## **DANKSAGUNG**

Ich möchte mich herzlich bei meiner lieben Familie bedanken, vor allem bei meinen Eltern, die mir dieses Studium überhaupt ermöglicht haben.

Vielen Dank, dass ihr mich immer unterstützt habt und ich in jeder erdenklichen Situation auf euch zählen konnte.

Meinem Freund Thomas möchte ich ebenfalls herzlich danken, dass er mich immer tatkräftig unterstützt hat und mir in schwierigeren Zeiten immer wieder Mut gemacht hat.

Natürlich möchte ich auch meinem Diplomarbeitsbetreuer Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik danken, dass er es mir ermöglicht hat, diese Diplomarbeit zu schreiben.

Danke für die gute Betreuung während der Arbeit an meiner Diplomarbeit.

Ebenfalls danken möchte ich dem Department für Pharmazeutische Chemie für die Bereitstellung der Testsubstanz.

Zu guter Letzt bedanke ich mich auch herzlich bei meinen Studienkolleginnen und Studienkollegen, die mich auf diesem Weg begleitet haben und liebe Freunde geworden sind.

## INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. FRAGESTELLUNG .....</b>                                        | <b>1</b>  |
| <b>2. EINLEITUNG .....</b>                                           | <b>2</b>  |
| <b>3. MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>                             | <b>7</b>  |
| <b>3.1 Testsubstanz .....</b>                                        | <b>7</b>  |
| 3.1.1 MAH12.HCl .....                                                | 7         |
| 3.1.2 Lösungsmittel .....                                            | 7         |
| <b>3.2 Versuchstiere .....</b>                                       | <b>8</b>  |
| <b>3.3 Physiologische Elektrolytlösung .....</b>                     | <b>9</b>  |
| <b>3.4 Kaliumchloridlösung .....</b>                                 | <b>10</b> |
| <b>3.5 Isolierung und Präparation der Organe.....</b>                | <b>11</b> |
| 3.5.1 Lungenarterie (Arteria pulmonalis).....                        | 11        |
| 3.5.2 Rechter Vorhof (Atrium cordis dextrum).....                    | 12        |
| 3.5.3 Papillarmuskel (Musculus papillaris) .....                     | 12        |
| 3.5.4 Aorta (Aorta descendens).....                                  | 13        |
| 3.5.5 Dünndarm (Ileum terminalis).....                               | 14        |
| <b>3.6 Apparaturen für die Versuche .....</b>                        | <b>14</b> |
| 3.6.1 Apparatur A – Beschreibung und Anwendung .....                 | 15        |
| 3.6.2 Apparatur B – Beschreibung und Anwendung .....                 | 16        |
| 3.6.3 Kraftwandler .....                                             | 18        |
| 3.6.4 Verstärker und Schreiber.....                                  | 18        |
| 3.6.5 Versorgung mit Oxy mix .....                                   | 18        |
| <b>3.7 Durchführung der Versuche .....</b>                           | <b>19</b> |
| 3.7.1 Versuchsablauf an der Lungenarterie .....                      | 19        |
| 3.7.2 Versuchsablauf am rechten Vorhof.....                          | 20        |
| 3.7.3 Versuchsablauf am Papillarmuskel .....                         | 21        |
| 3.7.4 Versuchsablauf an der Aorta .....                              | 23        |
| 3.7.5 Versuchsablauf am Dünndarm .....                               | 23        |
| <b>3.8 Untersuchung des Wirkmechanismus .....</b>                    | <b>24</b> |
| 3.8.1 Glibenclamid.....                                              | 24        |
| 3.8.2 Versuchsablauf am Dünndarm in Gegenwart von Glibenclamid ..... | 25        |

|            |                                                              |           |
|------------|--------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.9</b> | <b>Auswertung und Statistik .....</b>                        | <b>25</b> |
| 3.9.1      | Aorta, Lungenarterie, Dünndarm .....                         | 25        |
| 3.9.2      | Vorhof.....                                                  | 26        |
| 3.9.3      | Papillarmuskel .....                                         | 26        |
| 3.9.4      | Statistik.....                                               | 27        |
| <b>4.</b>  | <b>ERGEBNISSE.....</b>                                       | <b>28</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Ergebnisse der Testsubstanz MAH12.HCl .....</b>           | <b>28</b> |
| 4.1.1      | Lungenarterie .....                                          | 28        |
| 4.1.2      | Rechter Vorhof .....                                         | 31        |
| 4.1.3      | Papillarmuskel .....                                         | 34        |
| 4.1.4      | Aorta.....                                                   | 37        |
| 4.1.5      | Dünndarm.....                                                | 40        |
| <b>4.2</b> | <b>Analyse des Wirkmechanismus von MAH12.HCl am Dünndarm</b> | <b>43</b> |
| 4.2.1      | Versuchsablauf am Dünndarm .....                             | 43        |
| 4.2.2      | Ergebnisse .....                                             | 43        |
| <b>5.</b>  | <b>DISKUSSION.....</b>                                       | <b>49</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Wirkung von MAH12.HCl auf die glatte Muskulatur .....</b> | <b>49</b> |
| 5.1.1      | Wirkung von MAH12.HCl auf die Aorta.....                     | 50        |
| 5.1.2      | Wirkung von MAH12.HCl auf die Lungenarterie.....             | 50        |
| 5.1.3      | Wirkung von MAH12.HCl auf den Dünndarm.....                  | 50        |
| <b>5.2</b> | <b>Möglicher Wirkmechanismus anhand des Dünndarms.....</b>   | <b>51</b> |
| <b>5.3</b> | <b>Wirkung von MAH12.HCl auf die Herzmuskulatur.....</b>     | <b>52</b> |
| 5.3.1      | Wirkung von MAH12.HCl auf den Vorhof.....                    | 52        |
| 5.3.2      | Wirkung von MAH12.HCl auf den Papillarmuskel .....           | 53        |
| <b>6.</b>  | <b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>                                  | <b>54</b> |
| <b>7.</b>  | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>                            | <b>56</b> |
| <b>8.</b>  | <b>LEBENS LAUF .....</b>                                     | <b>58</b> |

## 1. FRAGESTELLUNG

Im Zuge meiner Diplomarbeit wurde die neu synthetisierte Substanz MAH12.HCl an isolierten Organen von Meerschweinchen getestet. Ziel meiner Arbeit war es dadurch den pharmakologischen Charakter dieser Substanz näher zu untersuchen.

Die Testsubstanz wurde vom Department für Pharmazeutische Chemie neu synthetisiert und zur Testung bereitgestellt.

Es wurden elektromechanische Untersuchungen durchgeführt an fünf verschiedenen Organen.

Stellvertretend für die quergestreifte Muskulatur wurde am Papillarmuskel die Inotropie gemessen und am Vorhof wurde die Chronotropie gemessen.

An den Organen mit glatter Muskulatur, im Speziellen an der Aorta und Lungenarterie, wurde eine potentiell vasodilatierende Wirkung der Substanz gemessen und am Darm eine spasmolytische Wirkung.

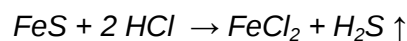
Eine gewebsselektive Wirkung an einem Organ wäre wünschenswert.

Die Substanz MAH12.HCl hat ein Schwefelatom im Molekül und man vermutet eine Freisetzung von Schwefelwasserstoff und dadurch eine Wirkung auf ATP-abhängige Kaliumkanäle, was zu einer Gefäßdilatation führen sollte.

## 2. EINLEITUNG

Schwefelwasserstoff ( $\text{H}_2\text{S}$ ) ist ein farbloses und sehr giftiges Gas. Es besitzt einen unangenehmen Geruch und die Löslichkeit in Wasser ist gering.

Die Herstellung erfolgt durch Behandeln eines Sulfids mit einer starken Säure [Ehlers 2003].



$\text{H}_2\text{S}$  ist eine stark giftige Verbindung und führt bei Konzentrationen von über 100 ppm zu Reizerscheinungen an Augen-, Nasen- und Rachenschleimhaut.

Konzentrationen von 150 ppm führen zu Kopfschmerz, Schwindel und Durchfall.

Chronischer Kontakt mit geringen Konzentrationen von  $\text{H}_2\text{S}$  kann zur Schädigung der Hornhaut des Auges führen.

Ab einer Konzentration von 300 ppm kann es zu Vergiftungserscheinungen kommen, die auch tödlich enden können. Bei hohen Konzentrationen (1400ppm) kommt es zum sofortigen Tod durch zentrale Atemlähmung.

Hohe Konzentrationen betäuben die Geruchsrezeptoren und können daher nicht wahrgenommen werden [Hunnius 2004].

Der genaue Wirkungsmechanismus einer Vergiftung mit  $\text{H}_2\text{S}$  ist noch nicht vollständig geklärt.  $\text{H}_2\text{S}$  bzw. das daraus gebildete Hydrogensulfid-Ion blockiert die eisenhaltigen Atmungsenzyme ähnlich wie die Blausäure.

Man nimmt auch an, dass  $\text{H}_2\text{S}$  zu einer Störung des Zellstoffwechsels und dadurch zu einer Hypoxie führt. Die Behandlung erfolgt symptomatisch durch künstliche Beatmung.

Als Antidot kann man Dimethylaminophenol heranziehen, zur Bildung von Methämoglobin, das eine höhere Affinität zu Hydrogensulfid-Ionen hat als die Cytochromoxidase [Mutschler et al. 2001].

Die Cytochromoxidase hat eine wichtige Funktion in der Atmungskette, einem Stoffwechselprozess in der menschlichen Zelle.

Ein wichtiger Prozess ist die Bildung von ATP, diese kann durch eine Vergiftung mit  $\text{H}_2\text{S}$  verhindert werden und dadurch kommt es zu einer Hypoxie (verminderte Sauerstoffversorgung des Organismus) [Mutschler et al. 1999].

Im Laufe der letzten Jahre hat man dieses giftige Gas genauer untersucht und damit geforscht.

$\text{H}_2\text{S}$  ist ein gasförmiger Mediator, der viele verschiedene biologische Effekte hervorruft. Vor allem wurden kardiovaskuläre Effekte beschrieben wie Vasodilatation, antithrombotische Effekte, sowie antiinflammatorische Effekte und eine Reduktion des oxidativen Stresslevels.

$\text{H}_2\text{S}$  hat die physiologische Rolle eines gefäßprotektiven Faktors.

Es wurde gezeigt, dass  $\text{H}_2\text{S}$  eine positive Wirkung auf kardiovaskuläre Erkrankungen, Hypertonie und Arteriosklerose hat [Streeter et al. 2013].

$\text{H}_2\text{S}$  findet man in vielen Geweben und Organen von Säugetieren.

Es gibt zwei verschiedene Wege für die Herstellung von endogenem  $\text{H}_2\text{S}$ , einen enzymatischen und einen nicht-enzymatischen Weg.

Der größere Teil des endogenen  $\text{H}_2\text{S}$  wird über den enzymatischen Weg hergestellt und zwar beim Cystein-Abbau durch Cystathionin-B-Synthase (CBS) oder durch Cystathionin- $\gamma$ -Lyase (CSE).

Der nicht-enzymatische Weg geht über Glucose, welche abgebaut wird und sich mit dem Schwefel des Blutes verbindet. Dabei wird nur eine geringe Menge  $\text{H}_2\text{S}$  gebildet [Wang et al. 2014].

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass  $\text{H}_2\text{S}$  ähnliche Eigenschaften wie die gasförmigen Signalmoleküle Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenmonoxid (CO) aufweist [Wang et al. 2014].

NO ist ein Transmitter, der muskelrelaxierende und somit vasodilatierende Wirkung zeigt. NO stimuliert die cytosolische Guanylatcyclase, die eine Umwandlung von GTP (Guanosintriphosphat) zu cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) bewirkt. cGMP führt zu einer Abnahme der intrazellulären Calcium-Konzentration und somit zu einer Erniedrigung des Gefäßtonus.

Diesen Wirkmechanismus macht man sich bereits bei Erkrankungen wie Angina pectoris zunutze in Form von Nitrat-Sprays.

Nitrate sind Prodrugs und werden im Organismus zur Wirksubstanz NO biotransformiert. Somit können Gefäßspasmen in arteriosklerotisch veränderten Koronargefäßen mit nicht funktionstüchtigem Endothel aufgehoben werden [Mutschler et al. 2001].

Der Wirkmechanismus von  $H_2S$  beruht auf einer Aktivierung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen, was bei einer bestehenden Hypertonie zu einer Vasodilatation und daher zu einer Blutdrucksenkung führt [Tan et al. 2011].

ATP-abhängige Kaliumkanäle sind im Myokard stark exprimiert. Durch die Öffnung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen kommt es zur Hyperpolarisation.

Dadurch wird der Calcium-Einstrom in die Herzmuskelzelle reduziert und verhindert einen Anstieg der Calcium-Konzentration im Zellinneren. Die Öffnung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen ist ein wichtiger kardioprotektiver Mechanismus im Körper [Liu et al. 2012].

Hypertonie ist eine anhaltende Erhöhung des arteriellen Blutdrucks.

Laut Definition der World Hypertension League (WHL) besteht eine Hypertonie, wenn der systolische Wert über 140 mmHg und der diastolische Wert über 90 mmHg beträgt bei körperlicher Ruhe [Mutschler et al. 1999].

Eine medikamentöse Therapie eines Bluthochdrucks ist mit sehr unterschiedlich wirkenden Substanzen möglich.

Mittel der Wahl sind derzeit:

- $\beta$ -Adrenozeptorenblocker, die  $\beta$ -Rezeptoren blockieren
- ACE-Hemmer, die das Angiotensin-Konversions-Enzym hemmen, damit kein Angiotensin II gebildet werden kann
- Diuretika, die Elektrolyt- und Wasserausscheidung erhöhen
- Calciumantagonisten, die Calciumkanäle blockieren und die intrazelluläre Calcium-Konzentration senken

Eine Normalisierung des Blutdrucks wird angestrebt und die Blutdrucksenkung sollte möglichst langsam erfolgen und der Gesamtsituation des Patienten angepasst werden [Mutschler et al. 2001].

Vasodilatierende Effekte sind sowohl bei Hypertonie als auch bei Koronarer Herzkrankheit erwünscht.

Koronare Herzkrankheit (KHK) beruht auf einer Reduktion der Koronarreserve, das heißt, dass ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffversorgung und Sauerstoffverbrauch besteht. Koronararterien können von einer Arteriosklerose betroffen und dadurch verengt sein [Mutschler et al. 1999].

Das Krankheitsbild Koronare Herzkrankheit ist eine maßgebliche Todesursache weltweit. Schwerwiegende Folgeerkrankungen sind eine Hypertrophie des Herzmuskels und im schlimmsten Fall ein Herzinfarkt.

Der protektive Effekt von  $H_2S$  auf diese pathologischen Veränderungen wird in Studien diskutiert [Liu et al. 2012].

Im ischämischen Herzgefäß wird eine verminderte Konzentration von endogenem  $H_2S$  beobachtet, daher vermutet man, dass die verminderte Produktion von endogenem  $H_2S$  für die Verengung der Herzgefäße verantwortlich sein könnte [Liu et al. 2012].

Koronare Herzkrankheiten können zu einer pulmonalen Hypertonie (PH) führen. Die endogene  $H_2S$ -Konzentration ist ein Biomarker zur Vorhersage von PH [Ling et al. 2014].

Eine schwere pulmonale Hypertonie ist eine seltene Erkrankung.

PH kann die körperliche Leistungsfähigkeit erheblich reduzieren und schränkt die Lebenserwartung stark ein. Eine Therapie ist schwierig, da die eigentliche zugrundeliegende Störung meist nicht bekannt ist [Olschewski et al. 2011].

Wenn der mittlere Pulmonalarteriendruck in Ruhe mehr als 20 mmHg beträgt, dann liegt eine pulmonale Hypertonie vor. Eine Druckbelastung des rechten Herzens ist die Folge und kann bei längerer Dauer zu einer Hypertrophie oder Dilatation des rechten Ventrikels führen [Mutschler et al. 1999].

Studien haben gezeigt, dass  $H_2S$  ein potenter Vasodilatator von Lungenarterien ist und signifikant den Arteriendruck in den Lungenarterien senkt. Das therapeutische Potential von  $H_2S$  in der Behandlung von pulmonaler Hypertonie sollte daher bewertet werden, da es eine mögliche Rolle in der Behandlung dieser Erkrankung spielen könnte [Ariyaratnam et al. 2013].

Bei frühgeborenen Babys kommt es oft zu Lungenerkrankungen, welche ein häufiger Grund für den Tod eines Neugeborenen sind.

Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) ist eine dieser chronischen Lungenerkrankungen, die bei Frühgeborenen auftreten kann.

Diese Erkrankung wird durch eine verminderte Entwicklung der Alveolen charakterisiert und kann zu einer pulmonalen Hypertonie führen. Momentan gibt es keine spezifische Behandlungsmethode für BPD.

H<sub>2</sub>S hat einen protektiven Effekt auf die Lunge von Frühgeborenen in einem Experiment mit O<sub>2</sub>-induzierter Lungenverletzung [Vadivel et al. 2014].

### 3. MATERIALIEN UND METHODEN

#### 3.1 Testsubstanz

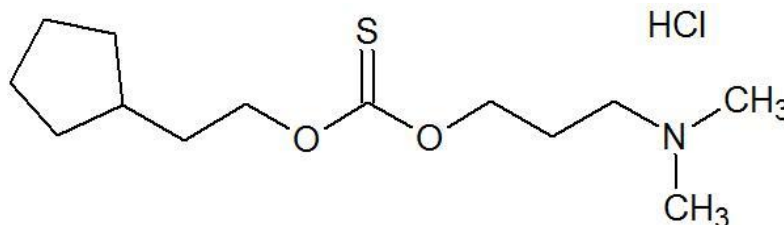
Die neu synthetisierte Substanz MAH12.HCl wurde vom Department für Pharmazeutische Chemie von Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker und seinem Team für diese Arbeit zur Testung bereitgestellt.

##### 3.1.1 MAH12.HCl

MAH12.HCl ist ein Molekül, das ein Schwefelatom enthält und man erhofft sich durch die Testung zu dem Ergebnis zu kommen, dass dieses Molekül im Organismus  $\text{H}_2\text{S}$  freisetzt.

Die Nomenklatur von MAH12.HCl lautet:

**3-(Dimethylamino)-propoxy-2-cyclopentylethoxy-methanthioat Hydrochlorid**



**Abbildung 1:** Struktur von MAH12.HCl

##### 3.1.2 Lösungsmittel

Die Testsubstanz MAH12.HCl war gut wasserlöslich, daher diente destilliertes Wasser als Lösungsmittel zur Herstellung der Stammlösungen. Mit Hilfe des Molekulargewichts wurde die geeignete Konzentration an Testsubstanz für 100  $\mu\text{l}$  Stammlösung berechnet. Das Molekulargewicht der Testsubstanz betrug 295,87 g/mol. Es gab zwei verschiedene Größen von Organbädern mit unterschiedlichem Fassungsvermögen, 8 ml und 25 ml. Je nach Fassungsvermögen wurde die entsprechende Menge an Testsubstanz eingewogen und in 100  $\mu\text{l}$  destilliertem Wasser gelöst.

| Testsubstanz | Molare Masse | Organbad (ml) | Einwaage (mg/100µl) |
|--------------|--------------|---------------|---------------------|
| MAH12.HCl    | 295, 87      | 8             | 0,24                |
| MAH12.HCl    | 295, 87      | 25            | 0,74                |

**Tabelle 1:** Stammlösungen der Testsubstanz

Die in 100 µl Wasser gelöste Testsubstanz wurde in das Organbad pipettiert. Der Reihe nach wurden aus den 100µl Stammlösung zuerst 3 µl, 7 µl, 20 µl und 70 µl entnommen und mit einem Abstand von je 45 Minuten in das Organbad pipettiert.

Die Endkonzentration der Testsubstanz im Organbad sollte daher 3 µmol/l, 10 µmol/l, 30 µmol/l und 100 µmol/l betragen.

Dies geschah mit einer 100 µl-Kolbenhubpipette. Nach 45 Minuten sollte die Steady-state Konzentration erreicht sein und sich somit ein Gleichgewicht eingestellt haben.

| Menge der Stammlösung (µl) | Endkonzentration im Organbad (µmol/l) |
|----------------------------|---------------------------------------|
| 3                          | 3                                     |
| 7                          | 10                                    |
| 20                         | 30                                    |
| 70                         | 100                                   |

**Tabelle 2:** Pipettierschema

## 3.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche Meerschweinchen vom TRIK-Stamm, welcher eine Auszüchtung ist mit wenig direkter Verwandtschaft. Die Tiere waren 4-8 Wochen alt und hatten ein Durchschnittsgewicht von 400-500g.

Meerschweinchen und Menschen haben einen sehr ähnlichen Organismus, vor allem die Ionenkanäle sind vergleichbar und daher sinnvoll für derartige Untersuchungen.

Die Substanzen wurden an den isolierten Organen der Meerschweinchen getestet, welche am Beginn des Arbeitstages durch einen Genickschlag schnell und möglichst schmerzfrei getötet wurden.

Nach Eintritt des Todes wurde der Brustkorb eines Meerschweinchens geöffnet und die benötigten Organe entnommen. Das Herz, Teile der Lunge, die Aorta und ein Teil des Dünndarms wurden vorsichtig herausgeschnitten und sofort in die bereitgestellte physiologische Elektrolytlösung eingelegt, welche so bald wie möglich mit Oxymix begast wurde.

### 3.3 Physiologische Elektrolytlösung

Die entnommenen Organe des Meerschweinchens wurden sofort in eine physiologische Elektrolytlösung eingelegt und mit Oxymix begast, dies ist ein Gasgemisch aus 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>, damit die Organe ausreichend mit Sauerstoff versorgt wurden.

Diese physiologische Elektrolytlösung soll die entnommenen Organe optimal mit Nährstoffen versorgen, damit die Organe überleben können und die ex vivo-Untersuchungen mit Erfolg durchzuführen sind. Wichtig ist auch, dass diese Nährlösung einen pH-Wert von 7,2-7,4 hat und eine Temperatur von 35-37°C, um die physiologischen Bedingungen möglichst exakt nachzuahmen. Die Nährlösung ist eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung, die sogenannte Tyrode Lösung.

Diese wurde nach Maurice Vejux Tyrode benannt, einem Pharmakologen aus Cambridge. Sie ist eine blutisotonische Lösung als Blutersatz, zur Gewebezüchtung und Konservierung [Hunnius 2004].

| Substanz                        | Molare Masse (g/mol) | Stocklösung  | ml/Stocklösung/l Tyrode | mmol/l |
|---------------------------------|----------------------|--------------|-------------------------|--------|
| NaCl                            | 58,44                | 1000,25 g/5l | 33,6                    | 115,01 |
| KCl                             | 74,55                | 50,33 g/5l   | 35,0                    | 4,73   |
| NaHCO <sub>3</sub>              | 84,01                | 125,0 g/5l   | 83,7                    | 24,91  |
| MgSO <sub>4</sub>               | 120,37               | 147,02 g/5l  | 1,18                    | 0,29   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 136,09               | 62,0 g/250ml | 1,18                    | 2,15   |
| CaCl <sub>2</sub>               | 110,98               | 34,0 g/250ml | 3,2                     | 3,92   |
| Glucose                         | 180,16               | Reinsubstanz | 1,98                    | -      |

**Tabelle 3:** Zusammensetzung der physiologischen Elektrolytlösung (Tyrode)

| Substanz                        | Menge    |
|---------------------------------|----------|
| NaCl                            | 67,2 ml  |
| KCl                             | 70 ml    |
| NaHCO <sub>3</sub>              | 167,4 ml |
| MgSO <sub>4</sub>               | 2,36 ml  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 2,36 ml  |
| CaCl <sub>2</sub>               | 6,4 ml   |
| Glucose                         | 3,96 g   |

**Tabelle 4:** Zusammensetzung für 2 Liter

Jeden Tag vor Arbeitsbeginn wurden 2 Liter der Tyrode frisch hergestellt. In einen 2-Liter-Messkolben wurden zuerst die Stammlösungen von NaCl, KCl und NaHCO<sub>3</sub> hineingefüllt und etwas destilliertes Wasser dazugegeben und durchmischt, damit die Lösung nicht zu hoch konzentriert war. Dann gab man MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und Glucose dazu und befüllte den Messkolben zu Dreiviertel mit destilliertem Wasser und durchmischte ihn noch einmal gut. Danach wurde die Lösung für 20 Minuten mit Oxymix begast, bis sie mit Sauerstoff gesättigt war. Währenddessen wurde die Stammlösung von CaCl<sub>2</sub> mit einer automatischen Kolbenhubpipette langsam und tropfenweise hinzugefügt, um ein Ausfallen von schwerlöslichen Calciumsalzen zu verhindern.

Dann wurde mit destilliertem Wasser auf 2 Liter aufgefüllt.

### 3.4 Kaliumchloridlösung

Kaliumchloridlösung wurde zur Vorkontraktion der glattmuskulären Organe verwendet. Es sollte sich eine maximale Kontraktion der Organe einstellen, da in den Versuchen die Vasodilatation (Aorta, Lungenarterie) und spasmolytische Wirkung (Darm) gemessen wurde.

Der Darm wurde mit einer 60 mmol Kaliumchloridlösung versetzt. Dafür wurden 0,45 g KCl in 100 ml Tyrode gelöst. Die Aorta und die Lungenarterie wurden mit einer 90 mmol Kaliumchloridlösung versetzt, dafür wurden 0,67 g KCl in 100 ml Tyrode gelöst.

Diese zwei Kaliumchloridlösungen wurden ebenfalls jeden Tag frisch zubereitet.

### 3.5 Isolierung und Präparation der Organe

Wie schon beschrieben wurden die Versuchstiere vor Arbeitsbeginn getötet und deren Thorax geöffnet, um die Organe (Herz, Lunge, Aorta und Dünndarm) zu entnehmen. Zuerst wurden das Herz und die Lunge entnommen, dann wurde vorsichtig die Aorta entlang des Rückgrades herausgeschnitten und zum Schluss wurde noch ein Teil des Dünndarms abgeschnitten.

Für die Versuche wurden die Aorta, der Dünndarm, die Lungenarterie, der Papillarmuskel und der rechte Vorhof benötigt. Daher wurden diese Organe entsprechend präpariert. Nachdem die Organe entnommen wurden, legte man sie sofort in die mit Oxymix begaste Nährlösung (Tyrode) ein. Man bereitete sich eine Petrischale vor, die mit einer Korkplatte ausgelegt wurde, welche mit einem Gummischlauch am Rand fixiert wurde.

Die Petrischale wurde mit Tyrode befüllt und dann legte man das zu präparierende Organ hinein. Das entnommene Organ wurde mit Hilfe von Nadeln, Pinzetten, kleinen Scheren, kleinen Häkchen und Zwirn unter einem Auflichtmikroskop präpariert.



**Abbildung 2:** Mikroskop, Petrischale mit Kork und Präparierbesteck

#### 3.5.1 Lungenarterie (Arteria pulmonalis)

Das Blut wird von der rechten Herzkammer über die Lungenarterie in die Lunge transportiert [Mutschler et al. 1999].

Der Teil der Lungenarterie, der verwendet wurde, war der Lungenstamm.

Dieser entspringt direkt aus der rechten Herzkammer und ist nur ca. 1 cm lang, daher konnte man nur ungefähr drei brauchbare Stücke gewinnen. Das umgebende Fettgewebe musste wieder vorsichtig entfernt werden. Danach wurde die Lungenarterie wie die Aorta in 2 mm breite, ringförmige Stücke zerschnitten. Man musste sehr vorsichtig damit hantieren, da das Gewebe dünner und instabiler war als das der Aorta. Diese wurden umgehend in ein Becherglas mit begaster Tyrode gelegt.

### **3.5.2 Rechter Vorhof (Atrium cordis dextrum)**

Der rechte Vorhof nimmt das Blut aus den großen Hohlvenen auf und von dort wird es an die rechte Kammer weitergeleitet [Mutschler et al. 1999].

Aus dem Thorax des Meerschweinchens wurden das Herz und die Lunge entnommen.

Dann wurde das Herz vorsichtig herausgeschnitten und die Lungenfragmente und anhaftendes Fettgewebe abgetrennt. Danach wurden die Kammern von den Vorhöfen getrennt und der rechte Vorhof vorsichtig herausgeschnitten.

Zur Präparation wurde der Vorhof am oberen und unteren Ende mit zwei Nadeln am Korkboden der Petrischale fixiert, welche mit Tyrode befüllt war. Man musste sehr gut darauf achten, dass der Vorhof nicht gedehnt wurde, damit der Sinusknoten nicht beschädigt wurde. An beiden Enden wurden Metallhäkchen mit einem Zwirn befestigt und dann sollte der Vorhof so schnell wie möglich in die für den Versuch vorgesehene Apparatur gegeben werden.

### **3.5.3 Papillarmuskel (Musculus papillaris)**

Die Papillarmuskeln sind kegelförmige Muskelvorsprünge und liegen an den Innenwänden der Herzkammern [Mutschler et al. 1999].

Um den Papillarmuskel zu isolieren, musste das Herz geöffnet werden, um die Herzkammern freizulegen. Die Herzkammern wurden aufgeklappt und der Papillarmuskel herausgeschnitten. Dann wurden die Purkinje-Fasern abgetrennt, weil diese das Ergebnis des Versuchs verfälschen könnten.

Die Präparation erfolgte wieder in einer Petrischale mit Korkboden, in die Tyrode gefüllt war. Jedoch musste die Tyrode öfter gewechselt werden, weil es während der Präparation zu Blutungen kam.

Der Papillarmuskel wurde nur an einem Ende mit einem Metallhäkchen versehen, da es für den Versuch eine spezielle Apparatur gab.

Es wurden pro Meerschweinchen ungefähr 3-4 Papillarmuskeln erhalten. Nach der Präparation musste man den Papillarmuskel wieder schnell in begaste Tyrode einlegen.

#### **3.5.4 Aorta (Aorta descendens)**

Die Aorta ist die Hauptschlagader und nimmt das Blut auf, das vom linken Ventrikel ausgeworfen wird und leitet es in die Äste des Körperkreislaufs weiter

[Mutschler et al. 1999].

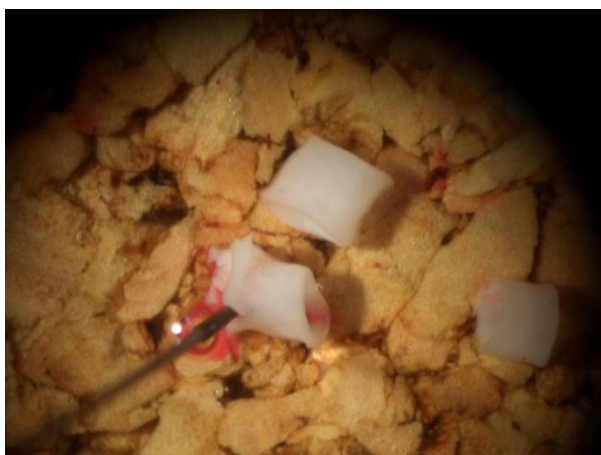
Die Aorta wurde sehr vorsichtig entlang des Rückgrades mithilfe einer Pinzette und einer kleinen Federschere herausgeschnitten.

Man musste gut drauf achten, dass die Aorta weder zu stark gedehnt noch verletzt wurde. Wären zu viele Löcher in der Aorta, würde es schwierig werden genügend große Stücke für die Versuche zu erhalten.

Das 2-3 cm lange Stück der Aorta wurde sofort in die Tyrode überführt.

Zum Präparieren wurde es in die Petrischale gelegt und an den zwei Enden mit Nadeln am Kork fixiert. Dann wurde vorsichtig mit einer kleinen Federschere das überschüssige Fettgewebe rund um die Aorta entfernt, ohne die Aorta dabei zu verletzen.

Dann wurde die gereinigte Aorta mit der Federschere in ca. 2 mm breite Ringe zerschnitten. Diese Stücke wurden wieder in ein Becherglas mit begaster Tyrode gelegt bis sie für die Versuche gebraucht wurden.



**Abbildung 3:** Präparierte Aorta

### **3.5.5 Dünndarm (Ileum terminalis)**

Im Dünndarm werden die niedermolekularen Bruchstücke der Nahrung zum größten Teil resorbiert. Er wird in drei Abschnitte unterteilt: Zwölffingerdarm (Duodenum), Leerdarm (Jejunum) und Krummdarm (Ileum) [Mutschler et al. 2001].

Der Dünndarm wurde an einen Faden gebunden zur besseren Entnahme. Dann wurde ein ca. 20 cm langes Stück abgeschnitten und sofort in die Tyrode gelegt.

Von diesem Stück wurde schräg ein ca. 1 cm langes Stück des Dünndarms heruntergeschnitten. Dieses kleine Stück brachte man wieder auf die vorbereitete Petrischale auf und fixierte die schrägen Enden mit Nadeln am Korkboden.

Mit einer kleinen Pipette wurde der Darm mit Tyrode durchgespült, um Reste vom Chymus zu entfernen. Dann wurden an den zwei schrägen Enden des Darms kleine Metallhäkchen mit einem Zwirn angebunden, die danach zur Befestigung an der Apparatur dienten. Man musste darauf achten, dass man die Darmöffnung nicht versehentlich mit dem Zwirn verschloss, da sonst die Versuche nicht funktionieren würden, weil der Wirkstoff nicht durch die Darmöffnung fließen könnte.

Auch musste man wieder vorsichtig sein, um den Darm nicht zu verletzen oder zu überdehnen.

Das fertig präparierte Darmstück wurde sofort wieder in ein Becherglas mit begaster Tyrode gelegt, bis es benötigt wurde.

## **3.6 Apparaturen für die Versuche**

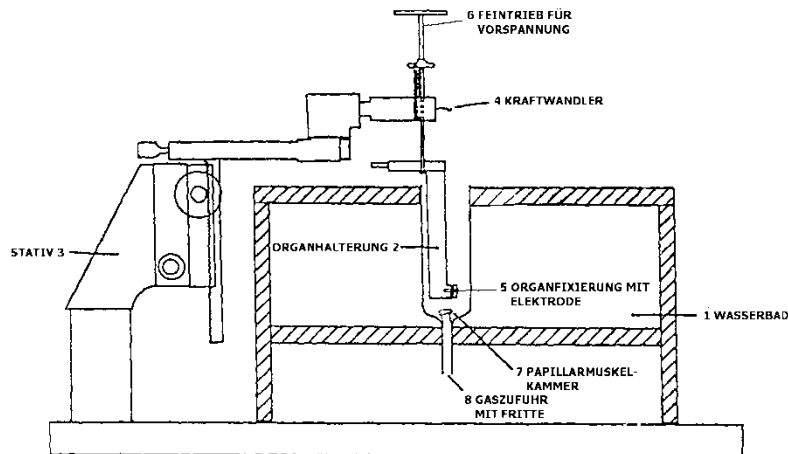
Es gab zwei verschiedene Arten von Apparaturen für die Versuche.

Apparatur A wurde speziell für den Papillarmuskel verwendet und Apparatur B für Lungenarterie, Vorhof, Aorta und Dünndarm.

Die Organe wurden mit den Metallhäkchen an einem Silberdraht befestigt, der mit einem Kraftwandler verbunden war. Dieser wandelte das Mechanische in ein elektrisches Signal um und gab es an einen Verstärker weiter. Am Ende wurde das Signal durch einen Schreiber aufgezeichnet.

Wichtig war, dass die Organe vollständig mit der Tyrode bedeckt waren und diese genügend mit Oxymix versorgt wurde. Die konstante Temperatur sollte mit einem Wasserbad gewährleistet sein.

### 3.6.1 Apparatur A – Beschreibung und Anwendung



**Abbildung 4:** Skizze der Apparatur A

Apparatur A (Abbildung 4) wurde nur für die Präparate des Papillarmuskels verwendet.

Die Apparatur besteht aus einem Wasserbad aus Acrylglas, in das eine sogenannte Muskelkammer hineinragt, in der sich dann der Papillarmuskel befindet.

Das Wasserbad für die Papillarmuskelpräparate sollte möglichst konstant 35°C betragen, um physiologische Bedingungen nachzuahmen, und wird mit einem Thermostat reguliert.

Die Muskelkammer (Organbad) hat ein Fassungsvermögen von 25 ml. Diese wird mit Tyrode befüllt. Nach Gebrauch muss man die Tyrode mit einer Plastikspritze entfernen, da es keinen Ablauf gibt.

Über der Muskelkammer befindet sich ein Stativ mit einer Halterung für die Organe. Daran sind ein Kraftregler und der Feintrieb für die Vorspannung der Organe angebracht. Die Organhalterung kann man in das Organbad absenken.

Der präparierte Papillarmuskel wurde mit dem Metallhäkchen an dem Silberdraht befestigt, welcher mit dem Kraftwandler verbunden ist, und in die Organhalterung eingespannt. Dabei wurde der Papillarmuskel zwischen einem Elektrodenplättchen und einem Acrylglasplättchen eingeklemmt. Er musste die Elektrode ausreichend berühren.

Dann wurde das Organ in das Organbad abgesenkt, welches ständig mit Oxymin begast wurde.

Da der Papillarmuskel nicht spontan aktiv ist, wurde er mit einem Accupulser Stimulator (Model A310, WPI, Hamden, USA) elektrisch gereizt, wodurch er dann kontrahiert wurde. Das mechanische Signal, das durch die Kontraktion ausgelöst wurde, wurde durch den Kraftwandler in ein elektrisches Signal umgewandelt, an den Verstärker weitergegeben und dann durch den Schreiber aufgezeichnet.

### **3.6.2 Apparatur B – Beschreibung und Anwendung**

Apparatur B (Abbildung 5) wurde für Lungenarterie, Vorhof, Aorta und Dünndarm verwendet.

Das Organbad hat eine doppelte Wand und es wird von Wasser von 37°C umspült. Das Wasser kommt über ein Schlauchsystem aus dem temperierten Wasserbad.

Das Organbad wird für die Versuche mit Tyrode befüllt und nach dem Versuch kann diese durch einen Ablauf am unteren Ende wieder abgelassen werden.

Die Organhalterung ist beweglich und kann in das Organbad abgesenkt werden.

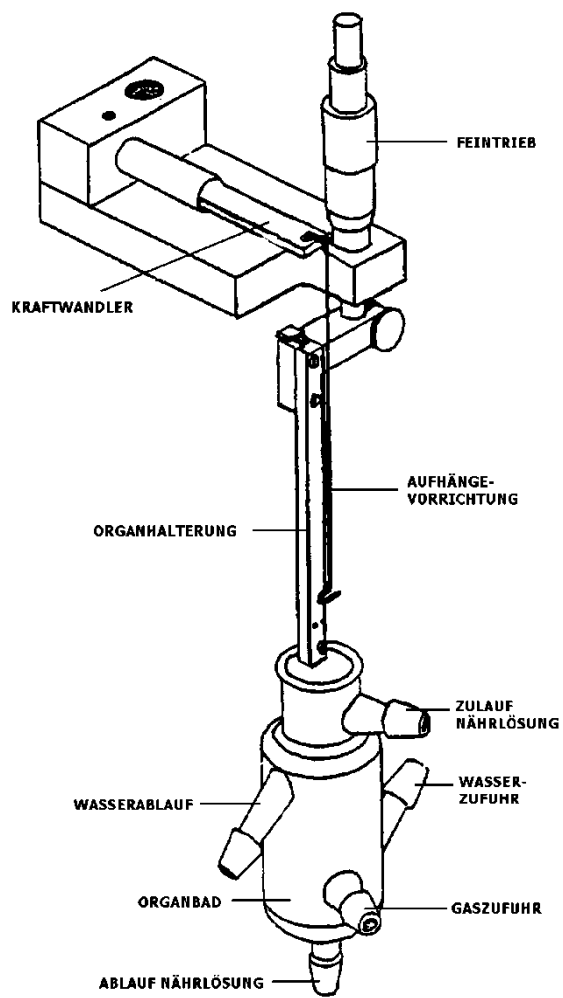
Über der Organhalterung befinden sich ein Feintrieb für die Vorspannung der Organe und ein Kraftwandler, der mit dem Silberdraht verbunden ist.

Der präparierte Vorhof und Darm wurden mithilfe der kleinen Metallhäkchen an einer Aufhängevorrichtung befestigt, welche mit dem Silberdraht in Kontakt stand.

Die Lungenarterie und die Aorta konnten direkt zwischen zwei Silberdrähten eingespannt werden, da die Stücke ringförmig waren.

Das Organbad wurde je nach Größe mit 8 ml oder 25 ml Tyrode befüllt und mit Oxymin begast. Dann wurden die Organe in das Organbad abgesenkt.

Ein mechanisches Signal entstand durch die Veränderung der Schlagfrequenz des Vorhofs bzw. durch spasmolytische Aktivität des Darms oder durch die Veränderung des Gefäßtonus von Aorta und Lungenarterie. Es wurde wieder durch den Kraftwandler in ein elektrisches Signal umgewandelt und über den Verstärker an den Schreiber weitergeleitet, der die Veränderungen dann aufgezeichnet hat.

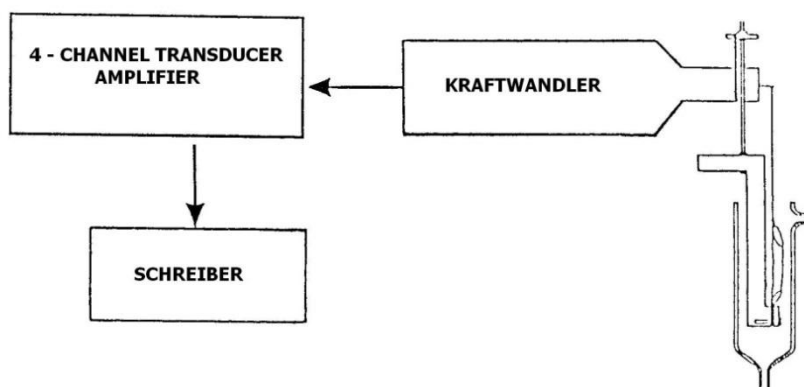


**Abbildung 5:** Skizze der Apparatur B

### 3.6.3 Kraftwandler

Durch die Versuche erhält man mechanische Signale, welche man so nicht aufzeichnen könnte. Daher braucht man einen Kraftwandler, der das mechanische Signal in ein Elektrisches überführt. Dies funktioniert über einen Dehnungsmessstreifen, der die Veränderung der Kontraktion des Organs wahrnimmt und dadurch kommt es zu einer Veränderung des Stromflusses.

Der Kraftwandler sendet das Signal an einen Verstärker weiter.



**Abbildung 6:** Skizze des Kraftwandlers

### 3.6.4 Verstärker und Schreiber

Das Signal vom Kraftwandler wird an den Verstärker weitergeleitet und in seiner Intensität verstärkt.

Der Verstärker ist ein 4-Channel Transducer Amplifier von der Firma WPI (USA).

Ein Flachbettschreiber von der Firma Kipp & Zonen (Modell BD 112) zeichnet die umgewandelten Signale auf Millimeterpapier auf.

### 3.6.5 Versorgung mit Oxy mix

Um optimale Bedingungen zum Überleben der Organe zu schaffen, ist die Versorgung mit Sauerstoff essentiell. Die präparierten Organe werden wie schon erwähnt in die Nährlösung (Tyrode) eingebracht und diese wird mit Oxy mix begast.

Oxy mix ist ein Gasgemisch aus 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>.

Der pH-Wert der begasten Tyrode muss bei 7,2-7,4 liegen, um physiologische Bedingungen zu gewährleisten. Während der Versuche wird Oxymix über Schläuche in das Organbad eingeleitet. Die Tyrode darf nicht zu stark begast werden, daher wird das Gas durch Glasfritten eingeleitet und kann über Klemmen am Schlauch reguliert werden.

### **3.7 Durchführung der Versuche**

Am Beginn des Arbeitstages wurden die Wasserbäder eingeschaltet, damit sie schnell die benötigte Temperatur erreichten. Die Organbäder wurden gereinigt, indem man sie mit destilliertem Wasser und danach mit Tyrode durchspülte. Danach wurden die Organbäder mit Tyrode befüllt und mit Oxymix begast.

Dann wurde an den präparierten Organen des Meerschweinchens, wie folgt beschrieben, die Wirkung der Testsubstanz MAH12.HCl untersucht.

#### **3.7.1 Versuchsablauf an der Lungenarterie**

Ein ringförmiges Stück der präparierten Lungenarterie wurde aus der Tyrode entnommen und an die Apparatur B angebracht. Das Stück wurde zwischen zwei L-förmigen Silberdrähten eingespannt, wobei man darauf achten musste, das Stück nicht zu stark zu dehnen. Sobald das Stück der Lungenarterie fixiert war, wurde es in das temperierte Organbad abgesenkt, das mit Tyrode befüllt war und ständig mit Oxymix begast wurde.

Nach Einschalten des Verstärkers und des Schreibgeräts, wurde der Schreiber auf den Nullpunkt eingestellt und eine Vorspannung des Organs von 9,81 mN bei einer Spannung von 5mV vorgenommen. Dann wurde der Schreiber wieder zum Nullpunkt zurückgestellt und man wartete ungefähr 20 Minuten, bis sich das Organ akklimatisiert hatte.

Sobald die Zeit vergangen war, wurde die Tyrode abgelassen und stattdessen die Kaliumchloridlösung in das Organbad eingefüllt zur Vorkontraktion der Organe. Für die Lungenarterie wurde die 90 mmol Kaliumchloridlösung verwendet. Der Schreiber wurde wieder auf den Nullpunkt gestellt, auf das Papier aufgesetzt und die Aufzeichnung wurde gestartet mit Speed 1mm/Minute.

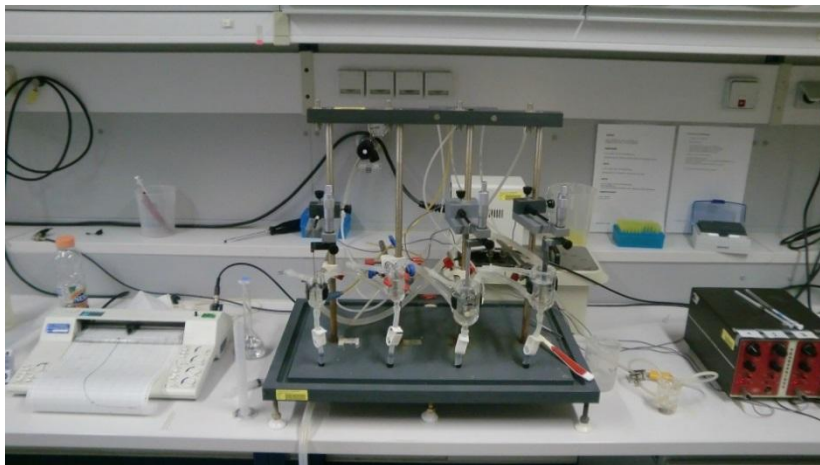
Es kam sofort zu einer starken Kontraktion des Organs, was durch einen hohen Ausschlag des Schreibers zu erkennen war. Der Ausschlag sollte über 5 cm liegen, ansonsten war das Organ für den Versuch unbrauchbar.

Nach etwa 45 Minuten sollte die Kurve ein Plateau erreicht haben, wenn nicht, musste man noch warten, bis die Plateauphase konstant war. Ebenso sollte die Kurve noch immer über 5 cm liegen.

Dann wurde nach dem Pipettierschema (siehe Kapitel 3.1.2) die in 100  $\mu$ l Wasser gelöste Testsubstanz in das Organbad mit einer Pipette zugegeben.

Sobald die Plateauphase erreicht war, wurden 3  $\mu$ l der Stammlösung zugegeben.

Nach 45 Minuten wurden 7  $\mu$ l Stammlösung dazugegeben, nach weiteren 45 Minuten 20  $\mu$ l und nach den letzten 45 Minuten 70  $\mu$ l Stammlösung, bis eine Konzentration von 100  $\mu$ mol/l des Wirkstoffes erreicht wurde. Dabei wurde eine Veränderung der Kurve bzw. der Kontraktion des Organs beobachtet.



**Abbildung 7:** Originalabbildung Apparatur B

### 3.7.2 Versuchsablauf am rechten Vorhof

Der präparierte Vorhof wurde ebenfalls in die Apparatur B mithilfe der Metallhäkchen an der Organhalterung befestigt. Der Vorhof durfte nicht überdehnt werden, da er eine Spontanaktivität aufweist, die für die Versuche sehr wichtig war und die nicht beeinflusst werden durfte. Im Gegensatz zum Papillarmuskel musste der Vorhof daher nicht elektrisch gereizt werden.

Der Vorhof wurde in das mit Tyrode befüllte und mit Oxymix begaste Organbad abgesenkt. Der Verstärker und das Schreibgerät wurden eingeschaltet und der Schreiber wurde wieder auf den Nullpunkt gesetzt.

Eine Spannung von 5 mV wurde angelegt und das Organ wurde auf 10,4 mN vorgespannt. Anschließend wurde der Schreiber wieder zum Nullpunkt zurückgedreht.

Dann wartete man ungefähr 30-45 Minuten, bis sich das Organ akklimatisiert hatte.

Nach dieser Eingewöhnungsphase konnte mit der Messung begonnen werden. Bevor man die Testsubstanz zugab, machte man etwa 7 Kontrollwerte. Der Schreiber wurde am Papier aufgesetzt und es wurde 12 Sekunden lang die Schlagfrequenz (Chronotropie) gemessen bzw. aufgezeichnet. Die Schreibgeschwindigkeit lag bei Speed 5mm/Sekunde. Auf dem Millimeterpapier sollte die Messung über 6 Kästchen gehen. Dies wiederholte man so oft bis die Schläge konstant waren.

Die aufgezeichneten Schläge pro Messeinheit wurden gezählt und mit 5 multipliziert, um die Schlagfrequenz pro Minute zu erhalten.

Dann konnte man 3 µl der Stammlösung zugeben und in Abständen von 5 Minuten die Messungen durchführen. Dies wurde 9 Mal wiederholt und nach diesen 45 Minuten wurde die nächste Konzentration laut Pipettierschema (siehe Kapitel 3.1.2) zugegeben. Das wurde so lange wiederholt bis die Konzentration von 100 µmol/l erreicht wurde bzw. bis das Organ abgestorben war.

### **3.7.3 Versuchsablauf am Papillarmuskel**

Der präparierte Papillarmuskel wurde in die Apparatur A eingespannt. Das Metallhäkchen wurde auf die Organhalterung gehängt und der Papillarmuskel wurde zwischen das Elektrodenplättchen und das Acrylglasplättchen eingeklemmt. Dann wurde das Organ in die auf 35 °C aufgeheizte, mit Tyrode befüllte und begaste Muskelkammer eingetaucht.

Der Verstärker und das Schreibgerät wurden eingeschaltet. Die Aufzeichnung erfolgte beim Papillarmuskel bei Speed 20 mm/Sekunde.

Der Schreiber wurde auf den Nullpunkt gesetzt. Die Vorspannung des Papillarmuskels betrug 3,92 mN bei 2 mV bzw. 5 mV Spannung, je nachdem wie stark der Papillarmuskel schlug.

Während des Versuchs war es nötig, die Vorspannung des Organs immer wieder nachzujustieren, da es sonst zu einer Abnahme der Kontraktionskraft kommen konnte [Reiter 1967].

Zuerst musste sich der Papillarmuskel im Organbad akklimatisieren, dann wurde er elektrisch gereizt. Das war nötig, weil der Papillarmuskel keine Spontanaktivität wie der Vorhof aufweist.

Dies geschah mit einem Accupulser Stimulator (Model A310, WPI, Hamden, USA), einem elektrischen Reizgerät, das elektrische Impulse an den Papillarmuskel sendet, damit dieser kontrahieren konnte.

Wie bei der Präparation des Papillarmuskels schon erklärt wurde, war es wichtig, dass die Purkinje-Fasern vollständig entfernt wurden, da diese eine Spontanaktivität aufweisen und somit das Ergebnis verfälschen würden. Man konnte das überprüfen, indem man darauf achtete, ob der Papillarmuskel schon vor der Reizung zur Kontraktion gebracht wurde.

Die Reizimpulse wurden über das Elektrodenplättchen aus Platin an den Papillarmuskel weitergeleitet und hatten eine Frequenz von 1 Hz und dauerten 3 msec.

Die Stromstärke durfte nur 10% über der minimalen Reizschwelle liegen, denn sonst würden sich sofort die Katecholaminspeicher vollständig leeren und es käme zu einem verfälschten Ergebnis.

Die Stromstärke durfte aber auch nicht zu schwach ausfallen, da man sonst keine Kontraktion erkennen würde.

Die Kontrollperiode dauerte 30 Minuten lang, wobei alle 5 Minuten Schläge des Papillarmuskels aufgezeichnet wurden. Die Amplituden der Schläge wurden gemessen und sollten größer als 2 cm sein. Sobald die Amplituden konstant waren, konnte man die Testsubstanz nach dem bekannten Pipettierschema (siehe Kapitel 3.1.2) zugeben.

Dabei wurde nach Zugabe der Stammlösung alle 5 Minuten eine Aufzeichnung von 7 Amplituden gemacht, welche dann vermessen wurden und somit die Kontraktionskraft (Inotropie) des Papillarmuskels bewertet werden konnte.



**Abbildung 8:** Originalabbildung der Apparatur A

### **3.7.4 Versuchsablauf an der Aorta**

Der Versuchsablauf an der Aorta ist dem an der Lungenarterie sehr ähnlich.

Die ringförmigen Stücke der Aorta wurden ebenfalls in die Apparatur B eingespannt und in das Organbad mit begaster Tyrode abgesenkt.

Der Verstärker und das Schreibgerät wurden eingeschaltet und der Schreiber auf den Nullpunkt eingestellt. Dann wurde das Organ auf 10 mN vorgespannt bei einer Spannung von 10 mV und musste sich 20 Minuten im Organbad akklimatisieren. Bevor mit der Messung begonnen wurde, musste man die Spannung von 10 mV auf 5 mV umstellen.

Die Tyrode wurde wieder durch eine 90 mmol Kaliumchloridlösung ersetzt und die Messung konnte beginnen.

Der Schreiber zeichnete die Kurve mit Speed 1mm/Minute auf. Die Kurve sollte wieder mindestens bis zur 5 cm Marke oder weiter reichen. Nun wartete man wieder rund 45 Minuten, bis die Kurve bzw. die Kontraktion konstant blieb. Nach dieser Kontrollzeit wurde wieder nach dem vorher beschriebenen Pipettierschema (siehe Kapitel 3.1.2) die Testsubstanz zugegeben und die Kurve beobachtet und die vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz auf das Organ bewertet.

### **3.7.5 Versuchsablauf am Dünndarm**

Der präparierte Dünndarm wurde ebenfalls in die Apparatur B mit den Metallhäkchen eingehängt und in das temperierte und begaste Organbad eingetaucht.

Man musste den Darm sehr vorsichtig behandeln, da eine Verletzung des Gewebes das Ergebnis verfälscht hätte.

Die Geräte, Verstärker und Schreibgerät, wurden eingeschaltet und der Schreiber auf den Nullpunkt zurückgesetzt. Dann wurde wieder eine Vorspannung des Organs vorgenommen auf 4,92 mN bei einer Spannung von 5mV. Das Organ sollte sich ebenfalls etwa 20 Minuten an die Bedingungen im Organbad gewöhnen.

Danach wurde die Tyrode aus dem Organbad abgelassen und durch eine 60 mmol Kaliumchloridlösung ersetzt, welche eine maximale Kontraktion des Darms bewirken sollte. Der Schreiber wurde auf den Nullpunkt zurückgesetzt und man startete die Messung mit Speed 1 mm/Minute.

Der Ausschlag der Kurve sollte hoch genug sein (mindestens 5 cm), das zeigte die Kontraktion der glatten Muskulatur des Darms an und wurde vom Schreiber erfasst.

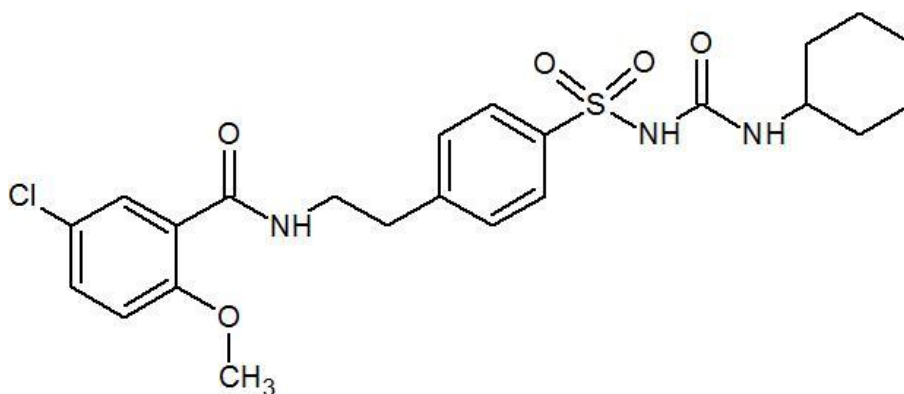
Sobald die Kurve Konstanz zeigte und somit die Kontraktion des Gewebes, nach mindestens 45 Minuten Wartezeit, wurde die erste Konzentration (3 µl Stammlösung) der Testsubstanz zur Kaliumchloridlösung ins Organbad zugefügt.

Nach weiteren 45 Minuten wurde die nächste Konzentration erreicht (Zugabe von 7 µl Stammlösung) und weiter laut Pipettierschema verfahren (siehe Kapitel 3.1.2).

Ging die Kurve nach einer gewissen Zeit gegen Null, dann bedeutete das, dass die Kontraktion nachließ.

### 3.8 Untersuchung des Wirkmechanismus

#### 3.8.1 Glibenclamid



**Abbildung 9:** Struktur von Glibenclamid

Glibenclamid ist eine Sulfonylharnstoffverbindung und wird als orales Antidiabetikum bei Diabetes Typ II angewendet. Das therapeutische Ziel ist eine Senkung des Blutzuckerspiegels. Glibenclamid ist ein Antagonist am ATP-abhängigen Kaliumkanal und hat ein Molekulargewicht von 494,0 g/mol.

Glibenclamid blockiert die ATP-abhängigen Kaliumkanäle in den B-Zellen der Pankreas. Es kommt zu einer Depolarisation der Membran und spannungsabhängige Calciumkanäle werden geöffnet. Calcium strömt in die Zelle ein und fördert die Insulinsekretion in den Extrazellarraum [Aktories et al. 2009].

### **3.8.2 Versuchsablauf am Dünndarm in Gegenwart von Glibenclamid**

Die Untersuchung des Wirkmechanismus von MAH12.HCl wurde am Dünndarm vorgenommen, da die Substanz die stärkste Wirkung am Gewebe des Darms zeigte.

Dazu gab man zusätzlich zur Testsubstanz den Antagonisten Glibenclamid in das Organbad. Man machte zwei unterschiedliche Versuchsreihen mit Konzentrationen von 30  $\mu\text{mol/l}$  und 100  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid.

Die entsprechende Menge an Glibenclamid für die Konzentrationen von 30  $\mu\text{mol/l}$  und 100  $\mu\text{mol/l}$  wurde in DMSO gelöst, um eine Stammlösung herzustellen.

Das Präparat des Dünndarms wurde wie schon beschrieben (siehe Kapitel 3.7.5) in die Apparatur B eingespannt und in das begaste und mit Tyrode befüllte Organbad abgesenkt und alle Geräte eingeschaltet.

Nach einer 20-minütigen Akklimationszeit wurde die Messung gestartet, nachdem die Tyrode durch 60 mmol Kaliumchloridlösung ersetzt wurde.

Sobald die Kurve konstant war, pipettierte man 30  $\mu\text{mol/l}$  bzw. 100  $\mu\text{mol/l}$  Stammlösung von Glibenclamid in das Organbad.

Nach 45 Minuten wurden 10  $\mu\text{mol/l}$  Testsubstanz (MAH12.HCl) zugefügt. Die Menge der Testsubstanz sollte dem  $\text{EC}_{50}$ -Wert entsprechen.

Nach weiteren 45 Minuten konnte man den Versuch beenden.

## **3.9 Auswertung und Statistik**

### **3.9.1 Aorta, Lungenarterie, Dünndarm**

Die Wirkung der Testsubstanz auf die glatte Muskulatur wurde an den glattemuskulären Organen Aorta, Lungenarterie und Dünndarm getestet.

Am Dünndarm wurde eine spasmolytische Wirkung untersucht und an der Aorta und Lungenarterie wurde eine vasodilatierende Wirkung untersucht.

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die glattemuskulären Organe mit einer Kaliumchloridlösung versetzt, um eine maximale Kontraktion der Organe hervorzurufen.

Nachdem das Organ eine konstante Kontraktion aufgewiesen hatte, wurde alle 45 Minuten eine gewisse Menge an Testsubstanz dazugegeben und der Zeitpunkt der Zugabe an der Kurve markiert, um zu beobachten, ob die Kontraktion des Organs daraufhin nachließ.

Der Kontrollwert war die in cm angegebene Breite der Kurve, von der Nulllinie ausgehend bis zur konstanten Plateauphase. Dieser Wert entsprach der 100%igen Kontraktionskraft des Organs.

Wenn die Kontraktion des Organs nachließ bzw. es eben zu einer Relaxation kam, dann verlief die Kurve in Richtung Nullwert.

Die Markierungen nach der Wirkstoffzugabe wurden zur Nulllinie hin vermessen und in Verhältnis zum Kontrollwert gesetzt.

Dann wurde ein Ergebnis in Prozent berechnet, wobei man einen Eichfaktor berücksichtigen musste. Für 5 mV war ein Eichfaktor von 0,98 mN mit einzubeziehen und für 10 mV ein Eichfaktor von  $2 \times 0,98$  mN.

### **3.9.2 Vorhof**

Am Vorhof wurde anhand der Versuche die Veränderung der Schlagfrequenz (Chronotropie) des Sinusknotens unter dem Einfluss der Testsubstanz gemessen.

Nach Zugabe der Testsubstanz in das Organbad wurden alle 5 Minuten 12 Sekunden lang die Schläge des Vorhofs auf ein Millimeterpapier aufgezeichnet.

Ausgewertet wurde jedoch nur die letzte Aufzeichnung jeder Konzentration, da sich schon eine Gleichgewichtskonzentration eingestellt hatte.

Die aufgezeichneten Schläge wurden abgezählt und mit 5 multipliziert, um die Schläge/Minute zu erhalten.

Die Schläge/Minute wurden mit dem Kontrollwert, der Wert vor Zugabe der Testsubstanz, in Relation gesetzt.

### **3.9.3 Papillarmuskel**

Am Papillarmuskel wurde die Veränderung der Kontraktionskraft (Inotropie) in Gegenwart der Testsubstanz gemessen. Wie beim Versuch mit dem Vorhof wurden alle 5 Minuten etwa 7 Schläge auf ein Millimeterpapier aufgezeichnet.

Zur Auswertung wurde wieder nur die letzte Messung jeder Konzentration herangezogen, da schon eine Gleichgewichtskonzentration erreicht war.

Dabei wurden die letzten 7 Amplituden mit einem Lineal vermessen und ein Durchschnittswert der Amplitudenlängen in cm berechnet. Dieser Wert musste mit einem Eichfaktor des Kraftwandlers multipliziert werden, um eine Aussage über die Kontraktionskraft des Organs zu bekommen. Wieder wurde der Wert mit dem Kontrollwert in Relation gesetzt, damit man die Veränderung der Inotropie prozentuell bewerten konnte.

Die Werte mussten mit einem Eichfaktor von 0,4 multipliziert werden, wenn die Messung bei 2 mV durchgeführt wurde und mit dem Faktor 0,98, wenn die Messung bei 5 mV durchgeführt wurde.

#### **3.9.4 Statistik**

Für die Auswertung der Messergebnisse wurde das Programm Sigmaplot 9.0 verwendet, um die Ergebnisse statistisch aufzubereiten.

Aus den Messwerten wurden die Mittelwerte und die Standardfehler berechnet und dann eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve erstellt. Auf der x-Achse wurde die Konzentration der Testsubstanz in  $\mu\text{mol/l}$  aufgetragen und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft bzw. Schlagfrequenz in %.

Mit Hilfe des Programms Sigmaplot 9.0 konnten auch die  $\text{EC}_{50}$ -Werte berechnet werden.

Aus der erstellten Konzentrations-Wirkungs-Kurve konnte der  $\text{EC}_{50}$ -Wert abgelesen werden. Dieser Wert stellt die mittlere effektive Konzentration der Testsubstanz dar, bei der es zu einer Abnahme der Kontraktionskraft bzw. der Schlagfrequenz des Organs auf 50% des Kontrollwerts kommt.

Mit dem Student-t-Test wurde die Signifikanz der Ergebnisse bewertet. Dafür musste die Irrtumswahrscheinlichkeit berechnet werden. Werte  $< 5\%$  ( $P < 0,05$ ) oder  $< 1\%$  ( $P < 0,01$ ) waren signifikant und Werte  $< 0,1\%$  ( $P < 0,001$ ) waren hochsignifikant.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Ergebnisse der Testsubstanz MAH12.HCl

#### 4.1.1 Lungenarterie

An der Lungenarterie wurde eine mögliche vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz MAH12.HCl untersucht. Es wurden 4 Versuche mit der Testsubstanz durchgeführt. Der Versuchsablauf wurde bereits beschrieben (siehe Kapitel 3.7.1).

Die Ergebnisse sind die Mittelwerte aus den 4 Versuchen.

Der Mittelwert der Kontrollwerte beträgt  $11,74 \pm 1,66$  mN und entspricht 0% Abnahme der Kontraktionskraft.

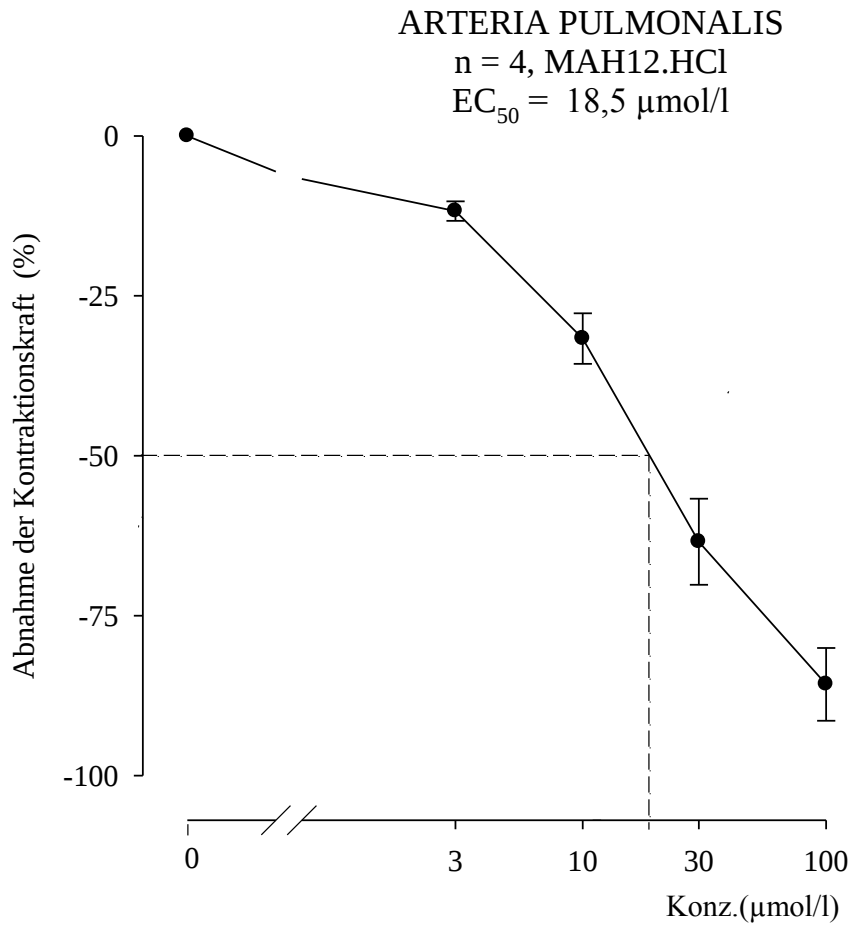
Nach Zugabe der 3  $\mu$ l Testsubstanz kann man schon eine deutliche Abnahme der Kontraktionskraft erkennen, jedoch noch deutlicher nach Zugabe der 7  $\mu$ l Testsubstanz, also bei 10  $\mu$ mol/l Endkonzentration. Auch bei einer Konzentration von 30  $\mu$ mol/l ist noch eine starke Wirkung zu bemerken, jedoch bei einer weiteren Konzentrationserhöhung ist keine starke Veränderung mehr zu sehen. Bei den 4 Versuchen ist nur ein Organ abgestorben.

Es ist eine konstante Abnahme der Kontraktionskraft zu erkennen, jedoch kann keine ausreichende vasodilatierende Wirkung an der Lungenarterie festgestellt werden.

In der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 5) sind die Konzentrationen an Testsubstanz, die Mittelwerte und Standardabweichungen, sowie Anzahl der Versuche und die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Versuche der Testsubstanz an der Lungenarterie angegeben.

| MAH12.HCl<br>( $\mu$ mol/l) | f $\pm$ SEM (mN) | f $\pm$ SEM (%)  | Anzahl der<br>Versuche (n) | Irrtums-<br>wahrscheinlichkeit (P) |
|-----------------------------|------------------|------------------|----------------------------|------------------------------------|
| Kontrolle                   | $11,74 \pm 1,66$ | $100 \pm 0$      | 4                          | -                                  |
| 3                           | $10,31 \pm 1,37$ | $88,24 \pm 1,53$ | 4                          | 0,05                               |
| 10                          | $8,10 \pm 1,41$  | $68,31 \pm 3,95$ | 4                          | 0,01                               |
| 30                          | $4,43 \pm 1,20$  | $36,55 \pm 6,74$ | 4                          | 0,001                              |
| 100                         | $1,83 \pm 0,83$  | $14,25 \pm 5,69$ | 4                          | 0,001                              |

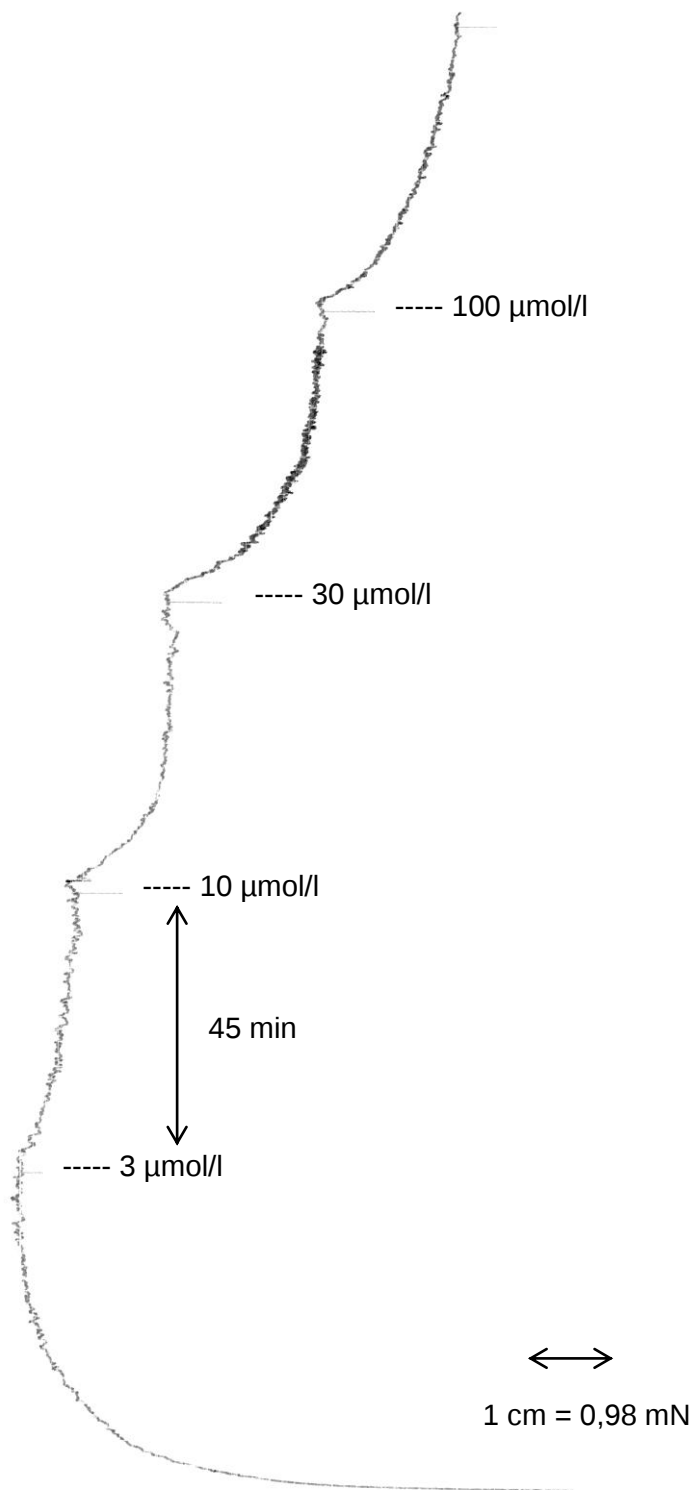
**Tabelle 5:** Ergebnisse der Testsubstanz MAH12.HCl an der Lungenarterie



**Diagramm 1:** Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MAH12.HCl an der Lungenarterie

Auf der x-Achse ist die Konzentration (µmol/l) der Testsubstanz logarithmisch aufgetragen und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in %. Die Punkte mit den vertikalen Balken stellen die Mittelwerte der Ergebnisse und die Standardabweichungen dar. Man erkennt eine deutliche Abnahme der Kontraktionskraft mit ansteigender Konzentration an Testsubstanz.

Die gestrichelte Linie zeigt den EC<sub>50</sub>-Wert an.



**Abbildung 10:** Originalaufzeichnung der Wirkung von MAH12.HCL an der Lungenarterie

Die Kurve zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft durch Zugabe der Testsubstanz. Die Zeitpunkte der Substanzzugabe sind gekennzeichnet.

#### 4.1.2 Rechter Vorhof

Am Vorhof wurde eine mögliche Veränderung der Chronotropie gemessen.

Es wurden insgesamt 4 Versuche mit der Testsubstanz MAH12.HCl am Vorhof durchgeführt. Nachdem konstante Schläge gezählt wurden, gab man in Abständen von 45 Minuten die verschiedenen Konzentrationen von 3, 10, 30, 100  $\mu\text{mol/l}$  der Testsubstanz in das Organbad.

Die Mittelwerte der Ergebnisse wurden berechnet.

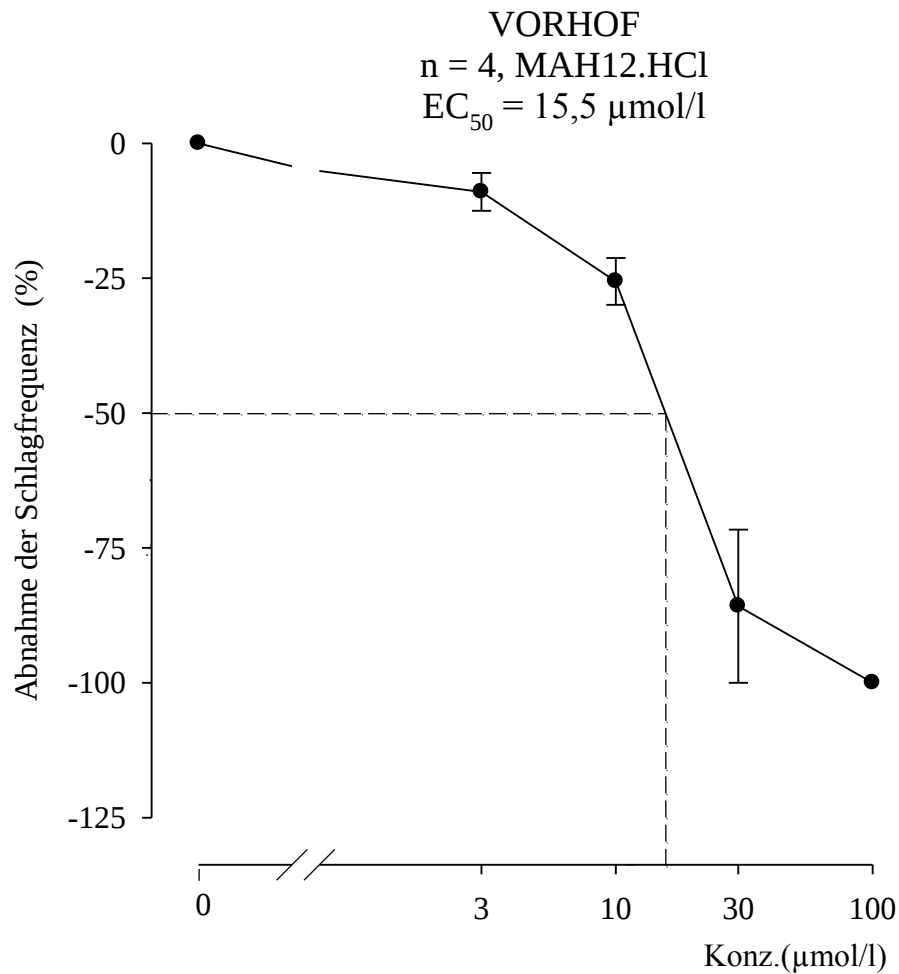
Der Mittelwert der Kontrolle beträgt  $232,50 \pm 13,15$  Schläge/Minute und entspricht 0% Abnahme der Schlagfrequenz.

Bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  der Testsubstanz kann man nur eine leichte Abnahme der Schlagfrequenz erkennen. Jedoch bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  kommt es zu einer sehr starken Abnahme der Schlagfrequenz und bei einer weiteren Konzentrationserhöhung kommt es zum Absterben des Organs. Die Testsubstanz hat eine starke Wirkung auf die Schlagfrequenz des Vorhofs, denn bei den 4 Versuchen sind 3 Organe schon bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  abgestorben und ein Organ bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$ .

In der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 6) sind Konzentrationen der Testsubstanz, Mittelwerte der Schlagfrequenz (Schläge/Minute), Standardabweichungen, Anzahl der Versuche am Vorhof und die Irrtumswahrscheinlichkeiten genau aufgelistet.

| MAH12.HCl<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | $f \pm \text{SEM (x/min)}$ | $f \pm \text{SEM (\%)}$ | Anzahl der<br>Versuche (n) | Irrtums-<br>wahrscheinlichkeit (P) |
|------------------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| Kontrolle                          | $232,50 \pm 13,15$         | $100 \pm 0$             | 4                          | -                                  |
| 3                                  | $212,50 \pm 18,43$         | $91,00 \pm 3,52$        | 4                          | 0,05                               |
| 10                                 | $173,75 \pm 16,50$         | $74,40 \pm 4,33$        | 4                          | 0,01                               |
| 30                                 | $31,25 \pm 31,25$          | $14,20 \pm 14,20$       | 4                          | 0,001                              |
| 100                                | $0,00 \pm 0,00$            | $0,00 \pm 0,00$         | 4                          | 0,001                              |

**Tabelle 6:** Ergebnisse der Testsubstanz MAH12.HCl am Vorhof

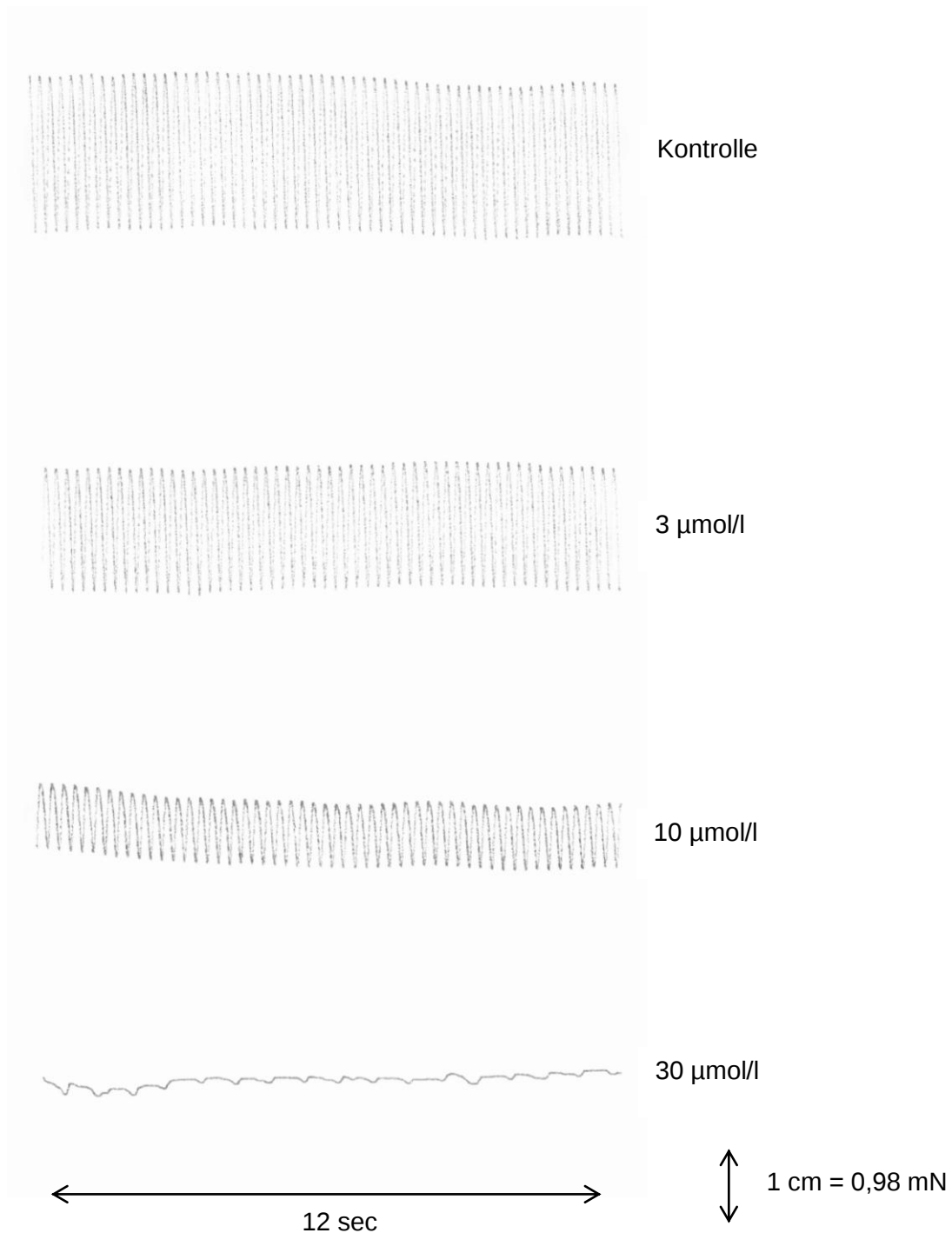


**Diagramm 2:** Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MAH12.HCl am Vorhof

An der obigen Kurve erkennt man die Abnahme der Schlagfrequenz des Vorhofs durch Erhöhung der Konzentration an Testsubstanz.

An der x-Achse ist logarithmisch die Konzentration in µmol/l aufgetragen und an der y-Achse die Abnahme der Schlagfrequenz in %. Die Punkte mit den vertikalen Balken zeigen die Mittelwerte der Ergebnisse mit Standardabweichung an.

Auch der EC<sub>50</sub>-Wert ist an der Kurve abzulesen.



**Abbildung 11:** Originalaufzeichnung der Wirkung von MAH12.HCl am Vorhof

Die Abbildung zeigt die Schlagfrequenz des Vorhofs in Anwesenheit der verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz. Man sieht, dass der Vorhof bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  abgestorben ist.

#### 4.1.3 Papillarmuskel

Am Papillarmuskel wurde anhand der Versuche eine mögliche Veränderung der Inotropie durch Zugabe der Testsubstanz MAH12.HCl untersucht.

Es wurden 4 Versuche am Papillarmuskel durchgeführt und die Mittelwerte der Ergebnisse berechnet. Der Mittelwert der Kontrolle beträgt  $1,24 \pm 0,15$  mN und entspricht 0% Abnahme der Kontraktionskraft.

Eine gewisse Menge an Testsubstanz wurde alle 45 Minuten nach dem Pipettierschema zugefügt.

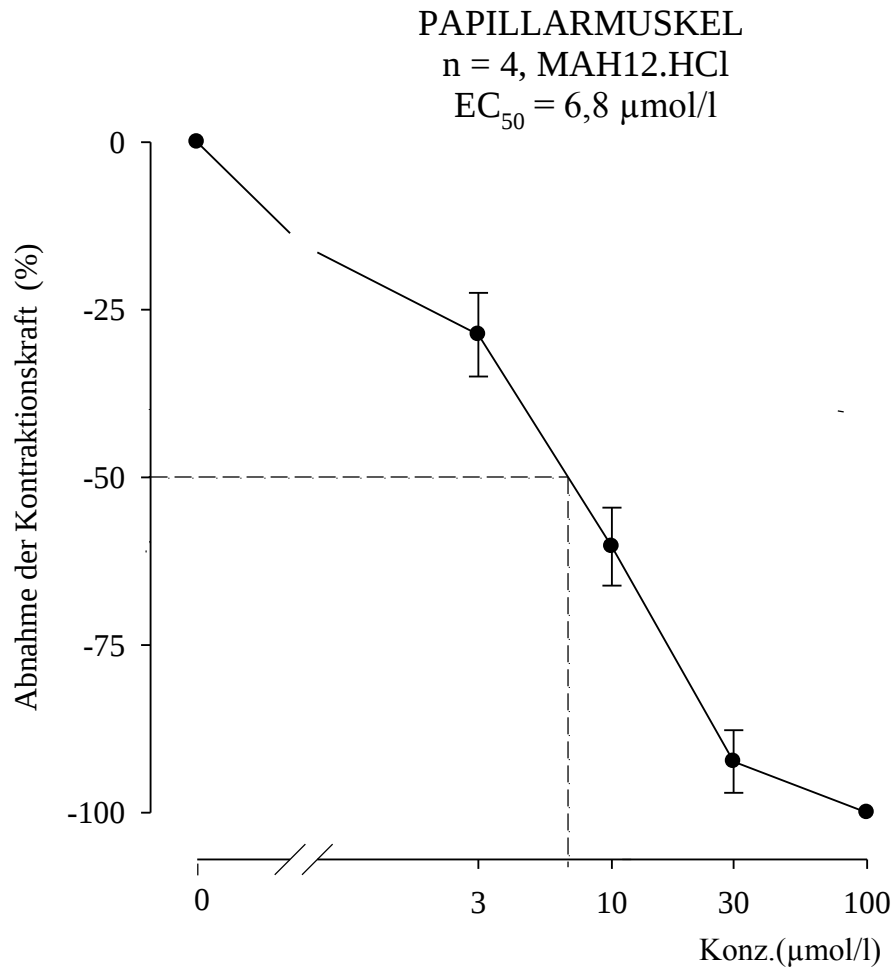
Ab einer Konzentration von  $3 \mu\text{mol/l}$  kann man schon eine deutliche Abnahme der Kontraktionskraft aus der Kurve ablesen. Eine weitere starke Abnahme entwickelt sich bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{mol/l}$  und eine weitere Abnahme bei  $30 \mu\text{mol/l}$ .

Die Testsubstanz hat eine starke Wirkung auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels, 2 der Organe sind bei einer Konzentration von  $30 \mu\text{mol/l}$  und 2 bei  $100 \mu\text{mol/l}$  abgestorben.

In der Tabelle (Tabelle 7) sind die verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz, die Mittelwerte der Ergebnisse und Standardabweichungen, Anzahl der Versuche, sowie Irrtumswahrscheinlichkeiten für die Versuche am Papillarmuskel aufgelistet.

| MAH12.HCl<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | $f \pm \text{SEM}$ (mN) | $f \pm \text{SEM}$ (%) | Anzahl der<br>Versuche (n) | Irrtums-<br>wahrscheinlichkeit (P) |
|------------------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| Kontrolle                          | $1,24 \pm 0,15$         | $100 \pm 0$            | 4                          | -                                  |
| 3                                  | $0,86 \pm 0,06$         | $71,28 \pm 6,24$       | 4                          | 0,05                               |
| 10                                 | $0,48 \pm 0,07$         | $39,68 \pm 5,81$       | 4                          | 0,001                              |
| 30                                 | $0,08 \pm 0,05$         | $7,62 \pm 4,67$        | 4                          | 0,001                              |
| 100                                | $0,00 \pm 0,00$         | $0,00 \pm 0,00$        | 4                          | 0,001                              |

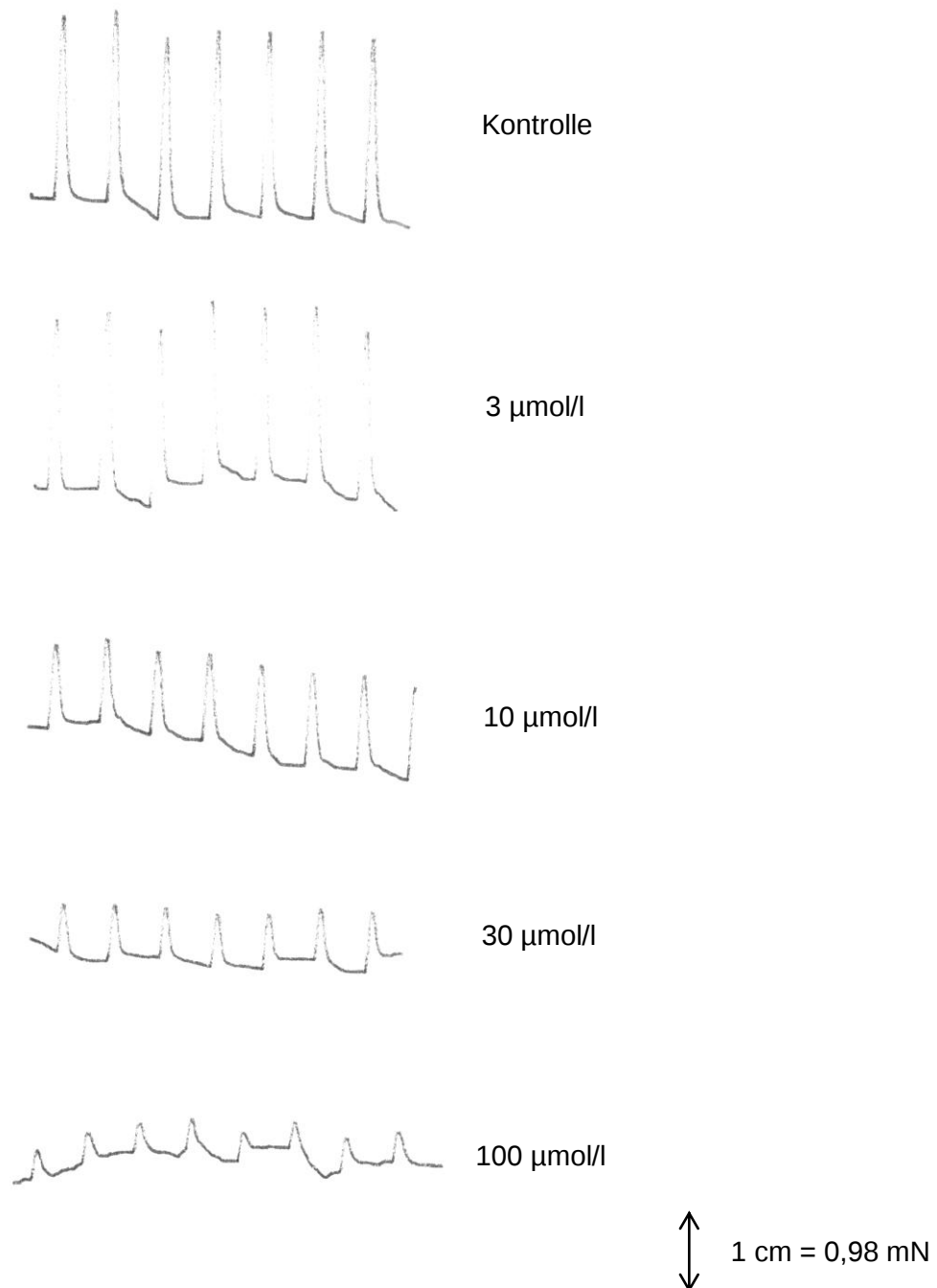
**Tabelle 7:** Ergebnisse der Testsubstanz MAH12.HCl am Papillarmuskel



**Diagramm 3:** Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MAH12.HCl am Papillarmuskel

Auf der x-Achse ist die Konzentration der Testsubstanz in µmol/l logarithmisch dargestellt und die y-Achse zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft des Papillarmuskels in %. Die Punkte zeigen die Mittelwerte der Versuchsergebnisse und die vertikalen Balken die Standardabweichungen.

Der EC<sub>50</sub>-Wert ist an der gestrichelten Linie abzulesen. Je höher die Konzentration der Testsubstanz wird, desto stärker ist die Abnahme der Kontraktionskraft.



**Abbildung 12:** Originalaufzeichnung der Wirkung von MAH12.HCl am Papillarmuskel

Die Abbildung zeigt die Veränderung der Kontraktionskraft des Papillarmuskels in Anwesenheit der verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz. Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  war kaum mehr eine Kontraktionskraft zu erkennen.

#### 4.1.4 Aorta

An den Präparaten der Aorta wurde eine mögliche vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz MAH12.HCl untersucht.

Aus den Ergebnissen der 4 Versuche wurden die Mittelwerte berechnet.

Der Mittelwert aus den Kontrollwerten beträgt  $9,38 \pm 0,58$  mN und entspricht 0% Abnahme der Kontraktionskraft.

Die Konzentrationen der Testsubstanz wurden alle 45 Minuten nach dem Pipettierschema erhöht.

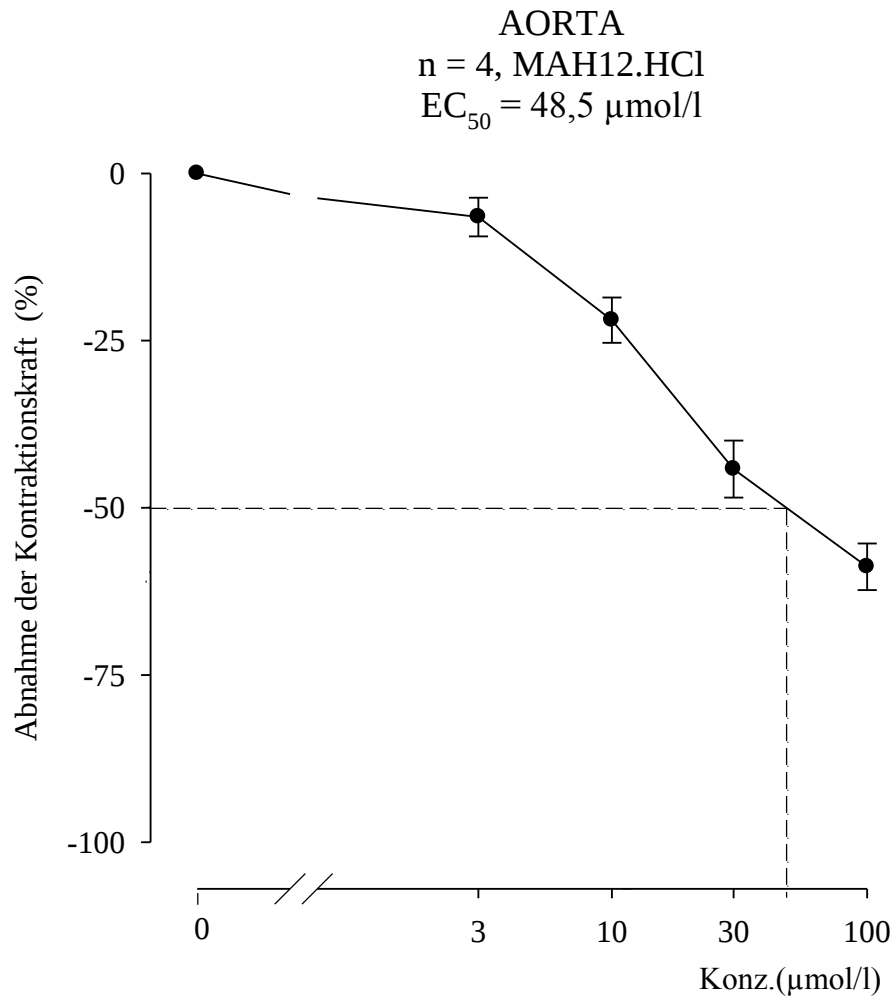
An der Aorta zeigt die Testsubstanz keine starke Wirkung. Es kommt zu einer gewissen Abnahme der Kontraktionskraft bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  und bei 10  $\mu\text{mol/l}$ . Jedoch verändert sich kaum mehr etwas bei einer weiteren Konzentrationserhöhung.

In den 4 Versuchen ist keines der Organe abgestorben.

Die folgende Tabelle (Tabelle 8) zeigt Konzentrationen der Testsubstanz, Mittelwerte der Ergebnisse und Standardabweichungen, Anzahl der Versuche und Irrtumswahrscheinlichkeit für die Versuche an der Aorta.

| MAH12.HCl<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | $f \pm \text{SEM (mN)}$ | $f \pm \text{SEM (\%)}$ | Anzahl der<br>Versuche (n) | Irrtums-<br>wahrscheinlichkeit (P) |
|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| Kontrolle                          | $9,38 \pm 0,58$         | $100 \pm 0$             | 4                          | -                                  |
| 3                                  | $8,77 \pm 0,58$         | $93,49 \pm 2,90$        | 4                          | 0,05                               |
| 10                                 | $7,30 \pm 0,42$         | $78,05 \pm 3,38$        | 4                          | 0,05                               |
| 30                                 | $5,19 \pm 0,33$         | $55,79 \pm 4,26$        | 4                          | 0,001                              |
| 100                                | $3,85 \pm 0,35$         | $41,17 \pm 3,49$        | 4                          | 0,001                              |

**Tabelle 8:** Ergebnisse der Testsubstanz MAH12.HCl an der Aorta

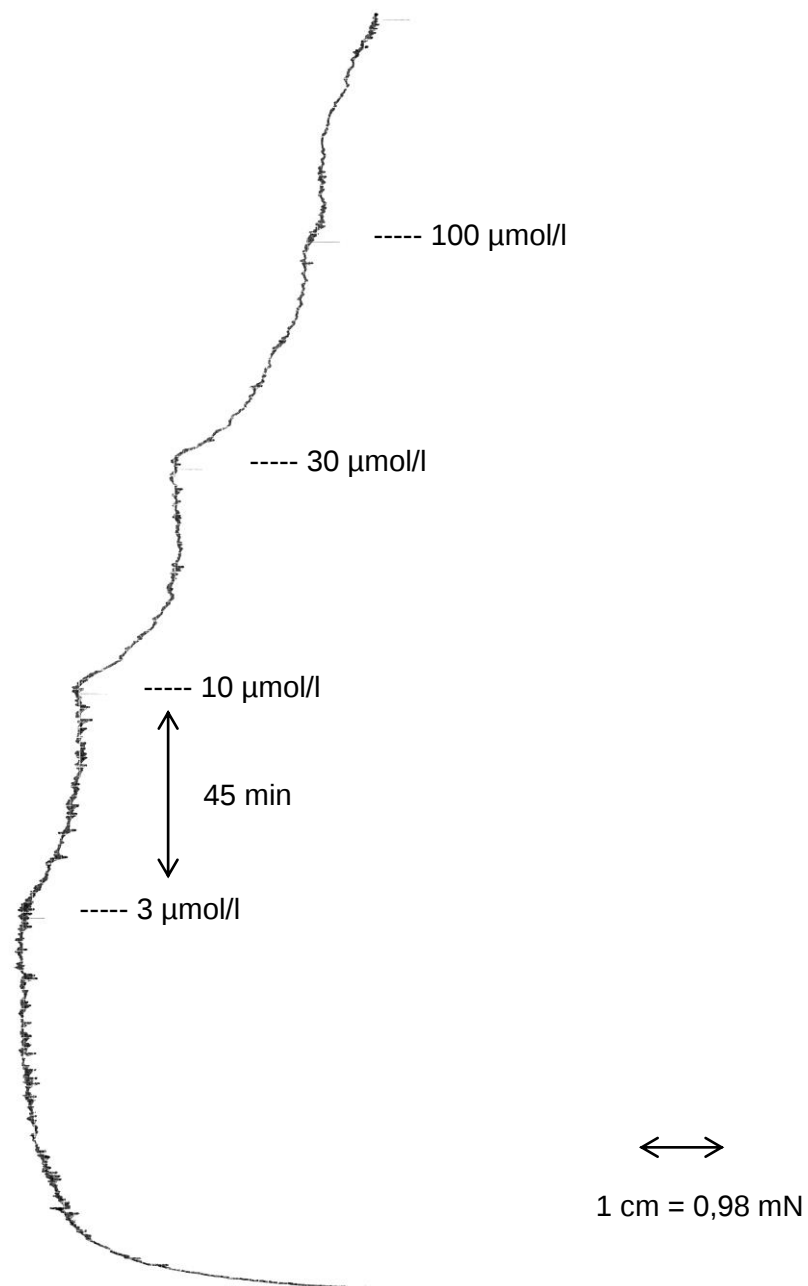


**Diagramm 4:** Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MAH12.HCl an der Aorta

Die obige Kurve zeigt die Veränderung der Kontraktionskraft der Aorta durch Zugabe der Testsubstanz MAH12.HCl.

Die x-Achse stellt die Konzentration der Testsubstanz in µmol/l logarithmisch dar und die y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in %.

Die Mittelwerte der Ergebnisse mit den Standardabweichungen werden als Punkte mit vertikalen Balken dargestellt. Auch der EC<sub>50</sub>-Wert ist an der Kurve abzulesen.



**Abbildung 13:** Originalaufzeichnung der Wirkung von MAH12.HCl auf die Aorta

Die Abbildung zeigt wie die Testsubstanz die Kontraktionskraft der Aorta beeinflusst. Die Zugabe der Substanz ist markiert. Die Testsubstanz hat jedoch keinen starken Effekt auf die Kontraktionskraft der Aorta.

#### 4.1.5 Dünndarm

Am Dünndarm wurde die spasmolytische Aktivität der Testsubstanz MAH12.HCl in 4 Versuchen getestet.

Von den Versuchen wurden die Mittelwerte der Ergebnisse berechnet. Der Mittelwert der Kontrollversuche beträgt  $8,50 \pm 0,62$  mN und entspricht 0% Abnahme der Kontraktionskraft.

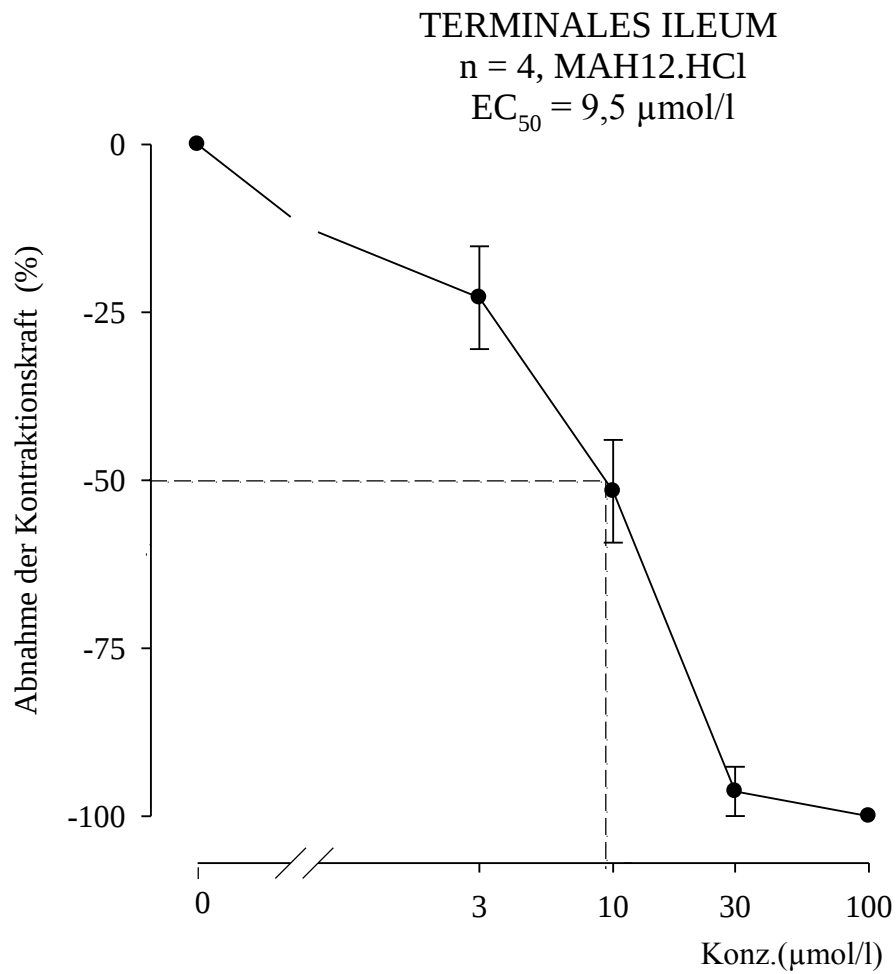
Nach dem Pipettierschema wurden gewisse Mengen an Testsubstanz in das Organbad gegeben und deren Auswirkung auf das Organ bewertet.

Die Testsubstanz hat von allen Organen auf den Darm die stärkste Wirkung. Schon bei einer Konzentration von  $3 \mu\text{mol/l}$  ist ein starker Effekt zu betrachten. Bei einer Erhöhung der Konzentration auf  $10 \mu\text{mol/l}$  ist die Wirkung noch aussagekräftiger, denn die Kontraktionskraft wird sehr stark vermindert. Bei einer Konzentration von  $30 \mu\text{mol/l}$  sind 3 der 4 Organe bereits abgestorben, daher schließt man daraus, dass die Testsubstanz eine sehr starke spasmolytische Aktivität am Dünndarm auslöst.

Die genauen Ergebnisse (Konzentrationen, Mittelwerte, Standardabweichungen, Anzahl der Versuche, Irrtumswahrscheinlichkeit) werden in Tabelle 9 gezeigt.

| MAH12.HCl<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | $f \pm \text{SEM (mN)}$ | $f \pm \text{SEM (\%)}$ | Anzahl der<br>Versuche (n) | Irrtums-<br>wahrscheinlichkeit (P) |
|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| Kontrolle                          | $8,50 \pm 0,62$         | $100 \pm 0$             | 4                          | -                                  |
| 3                                  | $6,60 \pm 0,96$         | $77,18 \pm 7,66$        | 4                          | 0,05                               |
| 10                                 | $4,17 \pm 0,89$         | $48,36 \pm 7,65$        | 4                          | 0,001                              |
| 30                                 | $0,37 \pm 0,37$         | $3,68 \pm 3,68$         | 4                          | 0,001                              |
| 100                                | $0,00 \pm 0,00$         | $0,00 \pm 0,00$         | 4                          | 0,001                              |

**Tabelle 9:** Ergebnisse der Testsubstanz MAH12.HCl am Dünndarm

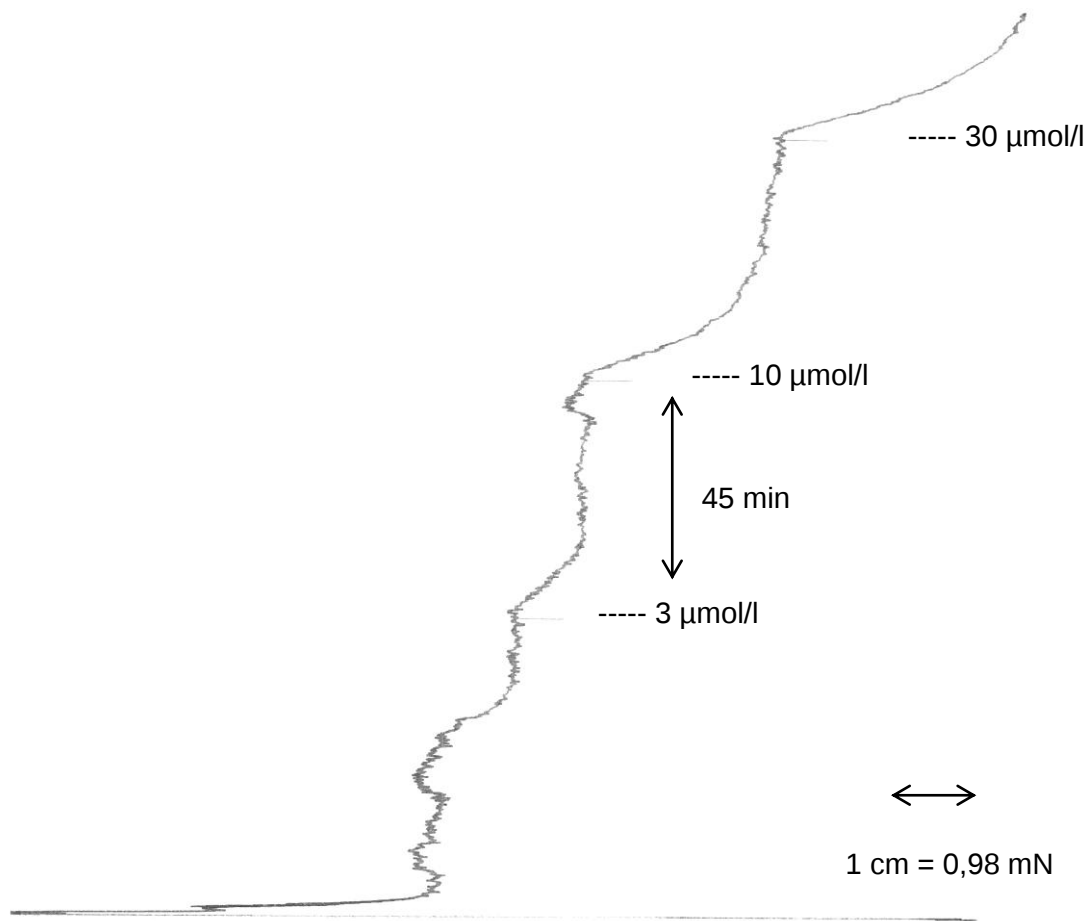


**Diagramm 5:** Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MAH12.HCl am Dünndarm

In der Kurve sieht man deutlich, wie stark die Kontraktionskraft des Darms in Gegenwart der Testsubstanz MAH12.HCl abnimmt.

An der x-Achse ist logarithmisch die Konzentration in µmol/l und an der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in % aufgetragen. Die Mittelwerte der Ergebnisse und deren Standardabweichungen werden als Punkte mit vertikalen Balken dargestellt.

Der EC<sub>50</sub>-Wert wird durch eine gestrichelte Linie angezeigt.



**Abbildung 14:** Originalaufzeichnung der Wirkung von MAH12.HCl auf den Dünndarm

Die Kurve geht stark nach rechts, das zeigt die starke Wirkung der Testsubstanz auf den Dünndarm an. Das Organ ist bei einer Konzentration von  $30 \text{ } \mu\text{mol/l}$  schon abgestorben.

## **4.2 Analyse des Wirkmechanismus von MAH12.HCl am Dünndarm**

Durch die Versuchsreihe kam man zu dem Ergebnis, dass die Testsubstanz MAH12.HCl die stärkste Wirkung am Dünndarm aufweist. Es war deutlich zu erkennen, dass die Kontraktionskraft sehr stark vermindert wurde durch Erhöhung der Konzentration der Testsubstanz.

Daher wurde versucht, den vermuteten Wirkmechanismus der Testsubstanz aufzuklären, indem man die Auswirkung der Testsubstanz auf die Kontraktionskraft des Darms in Gegenwart des Kaliumkanalblockers Glibenclamid beobachtete. Glibenclamid sollte den Antagonisten der Testsubstanz darstellen, da man vermutet, dass die Testsubstanz Kaliumkanäle öffnet.

### **4.2.1 Versuchsablauf am Dünndarm**

Der Versuchsablauf zur Bestimmung des Wirkmechanismus wurde bereits in Kapitel 3.8.2 besprochen.

Bei der Versuchsreihe wurde zuerst Glibenclamid und anschließend die Testsubstanz in das Organbad gegeben. Man arbeitete mit zwei verschiedenen Konzentrationen von Glibenclamid, in der einen Versuchsreihe mit 30  $\mu\text{mol/l}$  und in der zweiten Versuchsreihe mit 100  $\mu\text{mol/l}$ .

Die Konzentration der Testsubstanz wurde entsprechend dem  $\text{EC}_{50}$ -Wert berechnet.

Durch die Versuchsreihen wollte man nachweisen, ob die Testsubstanz tatsächlich die ATP-abhängigen Kaliumkanäle öffnet, indem ebendiese Kaliumkanäle durch Glibenclamid blockiert wurden.

### **4.2.2 Ergebnisse**

Der Kontrollwert bei den 3 Versuchen mit 30  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid beträgt  $5,91 \pm 0,09 \text{ mN}$ .

Der Kontrollwert entspricht 100 % der Kontraktionskraft.

Nach der Zugabe von Glibenclamid konnte eine Abnahme der Kontraktionskraft auf ca. 66 % festgestellt werden. Nach 45 Minuten wurde die Testsubstanz zugegeben und die Kontraktionskraft nahm weiter stark ab auf einen Wert von ca. 16 %.

Der Kontrollwert bei den 4 Versuchen mit 100  $\mu\text{mol/l}$  beträgt  $8,94 \pm 0,84 \text{ mN}$ .

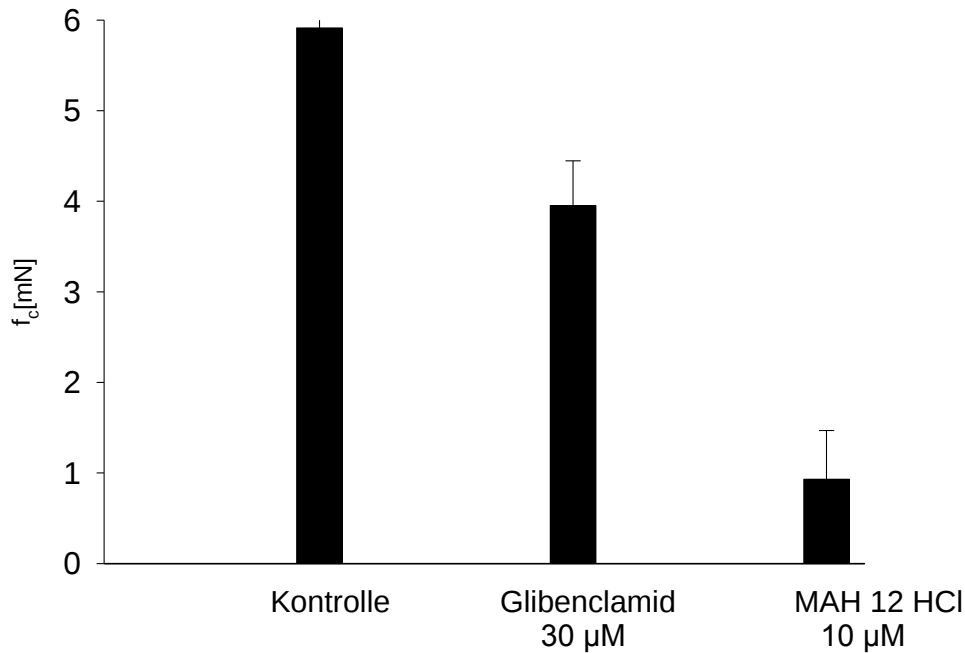
Nach der Zugabe von 100  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid nahm die Kontraktionskraft sofort sehr stark ab auf einen Wert von ca. 26 %. Nach Zugabe der Testsubstanz war nur noch eine Kontraktionskraft von ca. 1% zu erkennen.

Daher kommt man zu dem Ergebnis, dass die Testsubstanz mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht zur Öffnung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen führt.

In den Tabellen auf den nächsten Seiten (Tabelle 10 und Tabelle 11) sind die genauen Ergebnisse der Versuche mit 30  $\mu\text{mol/l}$  und 100  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid aufgelistet.

In den folgenden Balkendiagrammen (Diagramm 6 und Diagramm 7) werden die Veränderungen der Kontraktionskraft an der glatten Muskulatur am Gewebe des Dünndarms nach der Zugabe von 30  $\mu\text{mol/l}$  bzw. 100  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid und der Testsubstanz graphisch dargestellt.

**Terminales Ileum, Glibenclamid  
MAH12.HCl  
n=3**



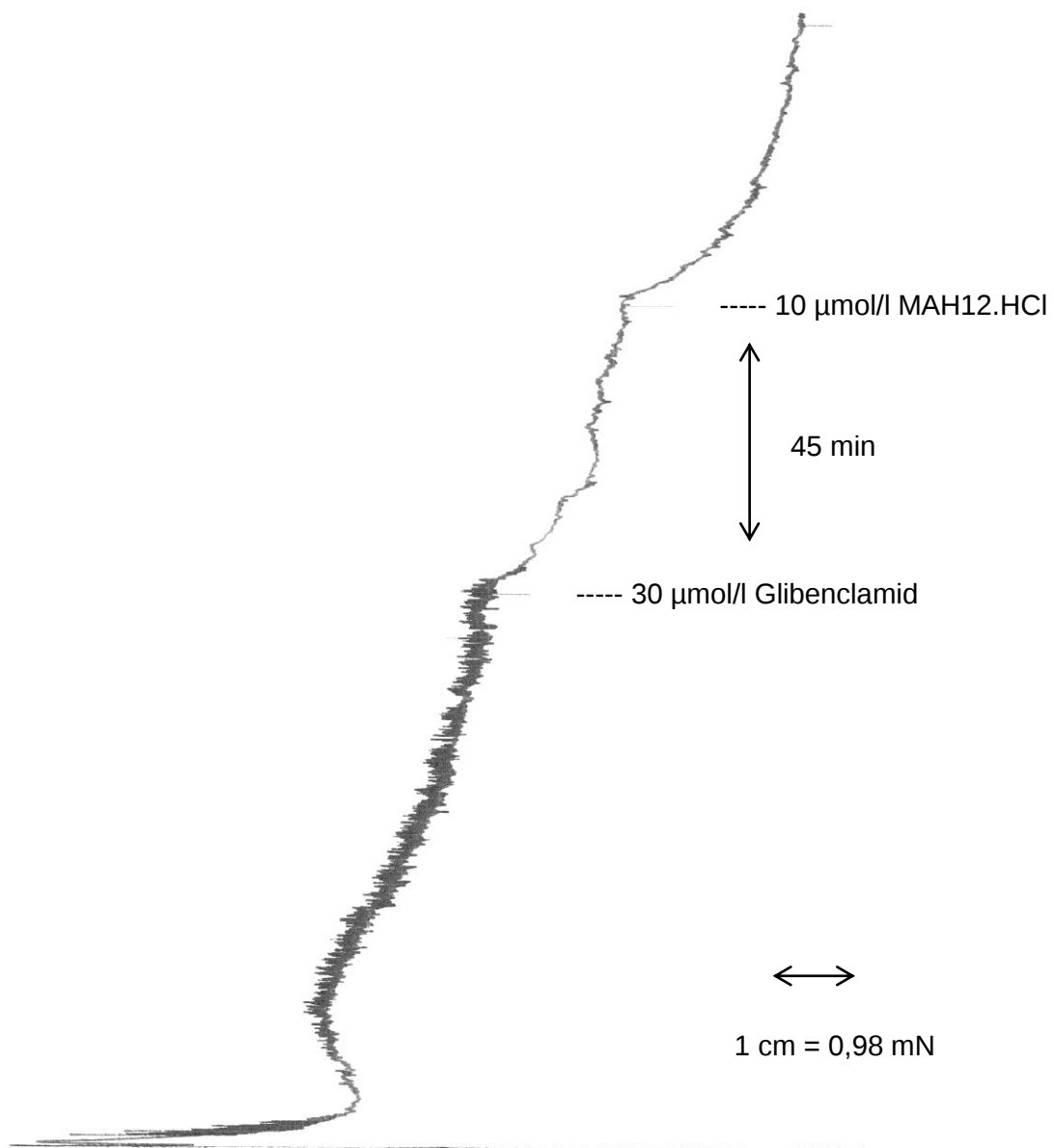
**Diagramm 6:** Darstellung der Ergebnisse mit 30 µM Glibenclamid

Auf der x-Achse des Balkendiagramms sind der Kontrollwert, die zugegebenen Mengen an Glibenclamid und Testsubstanz aufgetragen.

Auf der y-Achse ist die Kontraktionskraft dargestellt, welche für den Kontrollwert 100 % entspricht.

| Konzentration (µmol/l) | $f \pm \text{SEM (mN)}$ | Anzahl der Versuche (n) | Irrtumswahrscheinlichkeit (P) |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| Kontrolle              | 5,91 ± 0,09             | 3                       | -                             |
| Glibenclamid 30        | 3,95 ± 0,49             | 3                       | -                             |
| + MAH12.HCl 10         | 0,93 ± 0,54             | 3                       | 0,05                          |

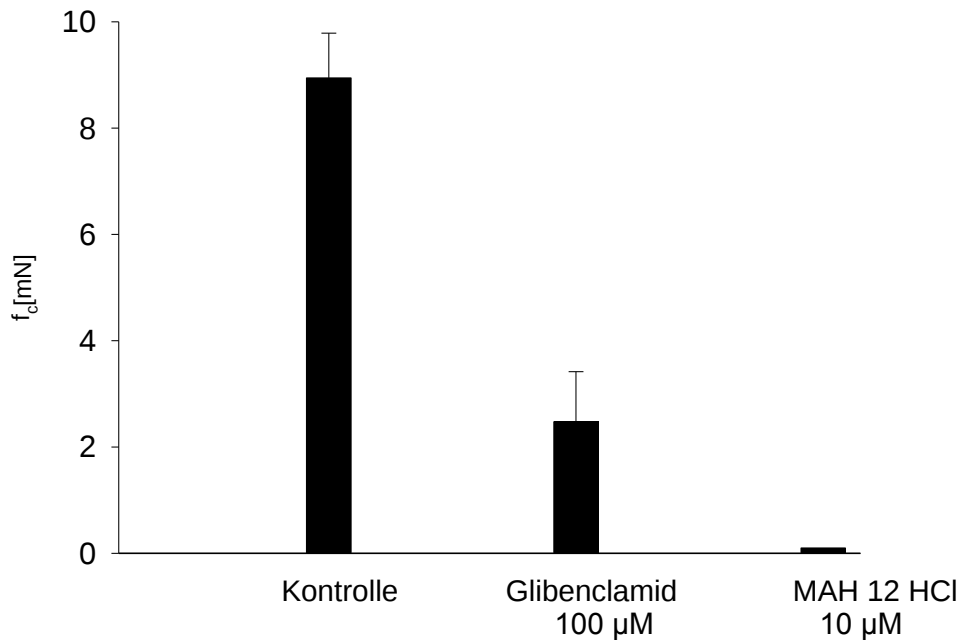
**Tabelle 10:** Ergebnisse der Testsubstanz MAH12.HCl am Dünndarm in Gegenwart von 30 µM Glibenclamid



**Abbildung 15:** Originalaufzeichnung der Untersuchung des Wirkmechanismus von MAH12.HCl mit 30 µM Glibenclamid

Die Abbildung zeigt das Verhalten der Testsubstanz in Gegenwart von 30 µM Glibenclamid. Die Substanzzugabe ist markiert.

**Terminales Ileum, Glibenclamid  
MAH12.HCl  
n=4**

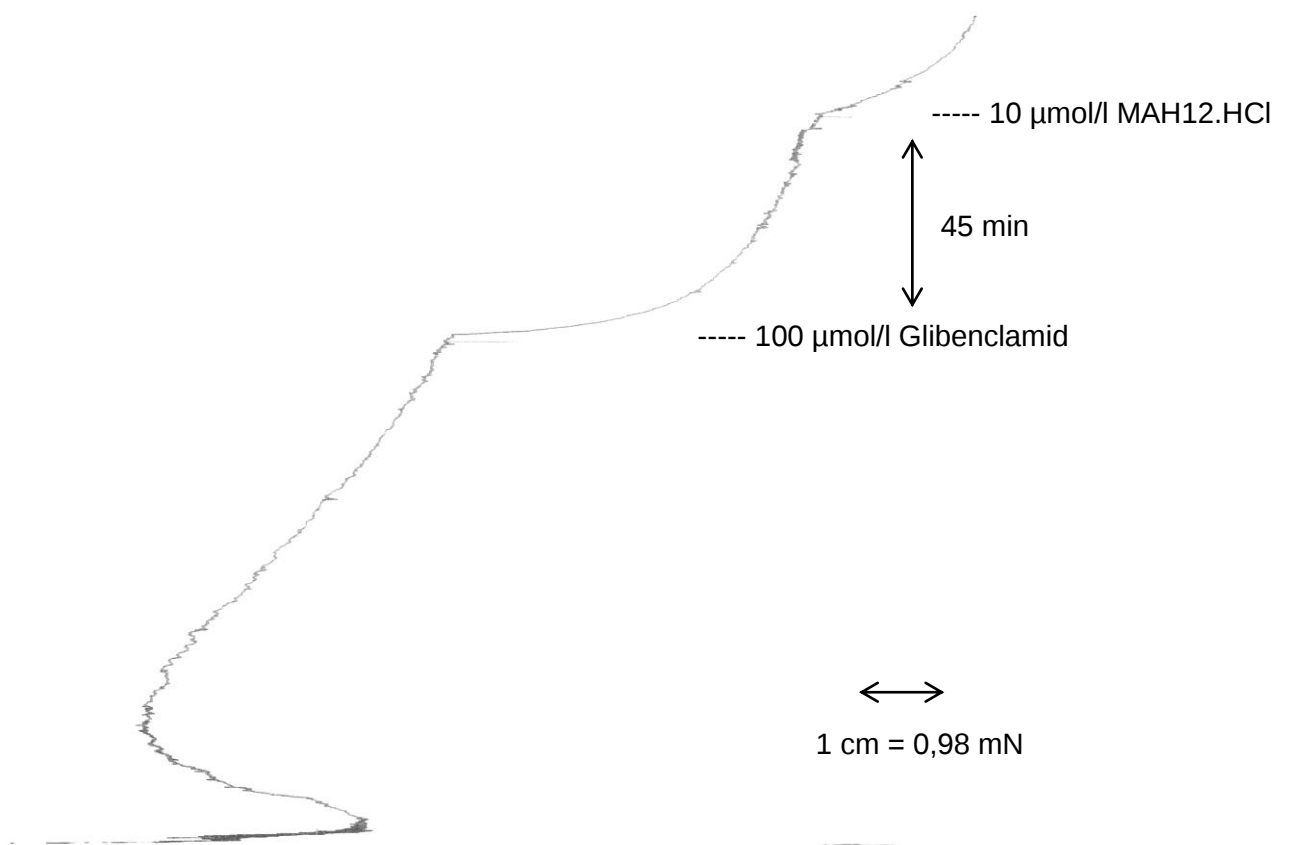


**Diagramm 7:** Darstellung der Ergebnisse mit 100 µM Glibenclamid

Es ist ebenfalls ein Balkendiagramm, auf der x-Achse ist der Kontrollwert und die Zugabe der Mengen an Glibenclamid und Testsubstanz aufgetragen und auf der y-Achse die Kontraktionskraft. Der Kontrollwert entspricht 100 % Kontraktionskraft.

| Konzentration (µmol/l) | $f \pm \text{SEM (mN)}$ | Anzahl der Versuche (n) | Irrtums-wahrscheinlichkeit (P) |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| Kontrolle              | 8,94 ± 0,84             | 4                       | -                              |
| Glibenclamid 100       | 2,47 ± 0,94             | 4                       | -                              |
| MAH12.HCl 10           | 0,10 ± 0,00             | 4                       | 0,05                           |

**Tabelle 11:** Ergebnisse der Testsubstanz MAH12.HCl am Dünndarm in Gegenwart von 100 µM Glibenclamid



**Abbildung 16:** Originalaufzeichnung der Untersuchung des Wirkmechanismus von MAH12.HCl mit 100 µM Glibenclamid

Die Abbildung zeigt das Verhalten der Testsubstanz in Gegenwart von 100 µM Glibenclamid. Die Substanzzugabe ist markiert.

## 5. DISKUSSION

In dieser Diplomarbeit ging es darum die neu synthetisierte Testsubstanz MAH12.HCl auf eine mögliche vasodilatierende Wirkung an der glatten Muskulatur der Aorta und der Lungenarterie, auf eine mögliche spasmolytische Wirkung an der glatten Muskulatur des Dünndarms, auf eine mögliche Veränderung der Chronotropie am Vorhof und auf eine mögliche Veränderung der Inotropie am Papillarmuskel zu untersuchen.

### 5.1 Wirkung von MAH12.HCl auf die glatte Muskulatur

Die vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz fiel an den Präparaten der Aorta vergleichsweise am schwächsten aus.

An der Lungenarterie konnte eine wesentlich stärkere Vasodilatation durch die Testsubstanz festgestellt werden.

Die stärkste Wirkung zeigte die Testsubstanz jedoch an den Dünndarmpräparaten. Es kam zu einer vollständigen Spasmolyse des Organs.

Daher wurden am Dünndarm die Untersuchungen zum Wirkmechanismus durchgeführt.

In der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 12) werden die Ergebnisse der glattmuskulären Organe einander gegenübergestellt. Die Unterschiede in der Wirkung der Testsubstanz an den verschiedenen Organen erkennt man deutlich an den EC<sub>50</sub>-Werten.

| Organpräparat | MAH12.HCl $f \pm \text{SEM} (\%)$ bei 100 $\mu\text{mol/l}$ | EC <sub>50</sub>       |
|---------------|-------------------------------------------------------------|------------------------|
| Aorta         | 41,17 $\pm$ 3,49                                            | 48,5 $\mu\text{mol/l}$ |
| Lungenarterie | 14,25 $\pm$ 5,69                                            | 18,5 $\mu\text{mol/l}$ |
| Dünndarm      | 0,00 $\pm$ 0,00                                             | 9,5 $\mu\text{mol/l}$  |

**Tabelle 12:** Wirkung von MAH12.HCl auf die glatte Muskulatur

### **5.1.1 Wirkung von MAH12.HCl auf die Aorta**

Die Wirkung der Testsubstanz MAH12.HCl an der Aorta fiel im Vergleich zu den anderen Organen am schwächsten aus.

Anhand der Ergebnisse konnte nur eine schwache vasodilatierende Wirkung festgestellt werden. Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  Testsubstanz lag die Kontraktionskraft des Organs noch immer bei ca. 41 %.

Daher beträgt der  $\text{EC}_{50}$ -Wert der Testsubstanz 48,5  $\mu\text{mol/l}$  und ist damit verhältnismäßig der höchste in den gesamten Versuchen.

Die Testsubstanz zeigt keinen starken Effekt auf die glatte Muskulatur der Aorta.

### **5.1.2 Wirkung von MAH12.HCl auf die Lungenarterie**

Die Wirkung der Testsubstanz MAH12.HCl an der Lungenarterie war wesentlich stärker als die an der Aorta.

Somit konnte ein vasodilatierender Effekt an der glatten Muskulatur der Lungenarterie durch die Testsubstanz festgestellt werden. Die Kontraktionskraft nahm bis auf einen Wert von ca. 14 % ab. Die Wirkung fiel zwar stärker aus als bei der Aorta, jedoch kam es auch bei diesem Organ nicht zur vollständigen Vasodilatation.

Die Organe haben auch eine Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  überlebt.

Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert der Testsubstanz beträgt bei der Lungenarterie 18,5  $\mu\text{mol/l}$  und diese hat somit einen relativ starken Effekt auf die Lungenarterie.

### **5.1.3 Wirkung von MAH12.HCl auf den Dünndarm**

Die Testsubstanz MAH12.HCl zeigte den stärksten Effekt am Gewebe des Dünndarms. Die Substanz weist eine starke spasmolytische Wirkung auf.

Die Testsubstanz hat am Dünndarm einen sehr niedrigen  $\text{EC}_{50}$ -Wert von 9,5  $\mu\text{mol/l}$ .

Bei den Versuchen kam es zu einer vollständigen Spasmolyse des Darmgewebes. Alle Organe sind während der Versuche abgestorben. Somit gab es eine Abnahme der Kontraktionskraft um 100 %, die glatte Muskulatur des Dünndarms wurde vollständig dilatiert.

Bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  wurde nur mehr eine Spannung des Organs von 0,37 mN registriert.

Aufgrund der starken Wirkung auf das Darmgewebe hat man versucht hier den Wirkmechanismus zu untersuchen.

## **5.2 Möglicher Wirkmechanismus anhand des Dünndarms**

Aufgrund der starken Wirkung der Testsubstanz MAH12.HCl am Gewebe des Dünndarms wurde der mögliche Wirkmechanismus genauer untersucht.

Zu Beginn der Versuchsreihe hat man sich von der Testsubstanz eine mögliche

H<sub>2</sub>S-Freisetzung des Wirkstoffes erwartet und dadurch eine Öffnung von

ATP-abhängigen Kaliumkanälen. Durch diesen Wirkmechanismus sollte es zu einer Vasodilatation bzw. Spasmolyse an der glatten Muskulatur kommen und zu einer Abnahme der Kontraktionskraft bzw. der Schlagfrequenz an der Herzmuskulatur.

Die Testsubstanz hatte auf alle Organe einen Effekt, jedoch die stärkste Wirkung konnte am Darm festgestellt werden.

Durch Zugabe des Kaliumkanalblockers Glibenclamid wollte man testen, ob die Wirkung auf einer Öffnung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle basiert.

Die Kaliumkanäle wurden durch Glibenclamid blockiert und es kam zu einer Abnahme der Kontraktionskraft. Die Testsubstanz müsste diese Wirkung antagonisieren.

Durch Zugabe der Testsubstanz nahm die Kontraktionskraft aber weiter stark ab.

Anhand dieser Ergebnisse kam man zu dem Schluss, dass die Wirkung wahrscheinlich nicht durch Öffnung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen zustande kommt.

Es liegt vermutlich ein anderer Wirkmechanismus vor, der noch aufgeklärt werden müsste.

Dazu wären weitere Untersuchungen der Testsubstanz am Gewebe des Dünndarms nötig.

### 5.3 Wirkung von MAH12.HCl auf die Herzmuskulatur

Die Wirkung der Testsubstanz MAH12.HCl an der glatten Muskulatur fiel relativ stark aus.

Am Vorhof wurde eine stetige Abnahme der Schlagfrequenz in Gegenwart der Testsubstanz beobachtet.

Am Papillarmuskel wurde ebenfalls eine starke Wirkung festgestellt. Eine starke Abnahme der Kontraktionskraft war sehr deutlich zu erkennen.

In der folgenden Tabelle (Tabelle 13) sieht man, dass die Kontraktionskraft bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  bei 0 % liegt, das heißt, dass die Organe ihre vollständige Kontraktionskraft eingebüßt haben.

Auch die Unterschiede in den  $\text{EC}_{50}$ -Werten sind in der Tabelle angeführt.

| Organpräparat  | MAH12.HCl $f \pm \text{SEM}$ (%) bei 100 $\mu\text{mol/l}$ | $\text{EC}_{50}$       |
|----------------|------------------------------------------------------------|------------------------|
| Vorhof         | 0,00 $\pm$ 0,00                                            | 15,5 $\mu\text{mol/l}$ |
| Papillarmuskel | 0,00 $\pm$ 0,00                                            | 6,8 $\mu\text{mol/l}$  |

**Tabelle 13:** Wirkung von MAH12.HCl auf die Herzmuskulatur

#### 5.3.1 Wirkung von MAH12.HCl auf den Vorhof

Die Testsubstanz MAH12.HCl hatte eine starke Wirkung auf den Vorhof.

Schon bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  nahm die Schlagfrequenz rapide ab. In den 4 Versuchen sind alle Organe abgestorben, daher ist anzunehmen, dass die Testsubstanz einen starken Effekt auf den Vorhof ausübt.

Die Schlagfrequenz wurde um 100 % vermindert. Am Ende der Versuche waren keine Kontraktionen des Vorhofs mehr zu erkennen.

Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert der Testsubstanz am Vorhof beträgt 15,5  $\mu\text{mol/l}$ , was auf eine starke Wirkung zurückzuführen ist.

### 5.3.2 Wirkung von MAH12.HCl auf den Papillarmuskel

Der pharmakologische Effekt der Testsubstanz MAH12.HCl auf den Papillarmuskel war ebenfalls stark. Es kam zu einer stetigen Abnahme der Kontraktionskraft bei Erhöhung der Konzentration der Testsubstanz.

Bei der Versuchsreihe mit Papillarmuskeln sind alle Organe abgestorben.

Es kam zu einem vollständigen Verlust der Kontraktionskraft.

Am Ende war die Inotropie gleich 0 %.

Die Testsubstanz weist am Papillarmuskel einen sehr niedrigen  $EC_{50}$ -Wert von 6,8  $\mu\text{mol/l}$  auf. Dies ist verglichen mit allen anderen Organen der niedrigste  $EC_{50}$ -Wert.

Wenn man nun die gesamte Versuchsreihe mit den verschiedenen Organen in Augenschein nimmt, dann erkennt man, dass die Testsubstanz MAH12.HCl nicht organspezifisch wirkt. Besonders an der Herzmuskulatur (Vorhof und Papillarmuskel) hatte die Testsubstanz eine signifikante Wirkung.

Aber vor allem auch am Dünndarm konnte man eine starke Wirkung registrieren. Daher hat man sich besonders für den möglichen Wirkmechanismus am Dünndarm interessiert, was jedoch keine eindeutigen Ergebnisse geliefert hat.

Die vermutete Wirkung an ATP-abhängigen Kaliumkanälen konnte nicht bestätigt werden und es ist sehr wahrscheinlich, dass ein anderer Wirkmechanismus vorliegt. Dies müsste in weiterer Folge genauer untersucht werden.

Auch an der Lungenarterie war die Wirkung der Testsubstanz stark. Einzig die Wirkung an der Aorta war verhältnismäßig schwach.

Aufgrund der Ergebnisse meiner Testsubstanz MAH12.HCl ist es fragwürdig, ob ein therapeutischer Einsatz sinnvoll wäre.

Die Testsubstanz zeigt an allen Organen eine Wirkung und ist daher nicht organspezifisch, was jedoch für einen Arzneistoff wünschenswert wäre.

Würde man der stark spasmolytischen Wirkung am Dünndarm nachgehen, wäre das Nebenwirkungsprofil an der Herzmuskulatur ein großes Problem.

Da die Testsubstanz auf alle Organe eine Wirkung hat, wären die Nebenwirkungen immer ein Problem, egal welche Wirkung man als Hauptwirkung selektieren würde.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Diplomarbeit ging es darum, die neu synthetisierte Substanz MAH12.HCl an isolierten Organen von Meerschweinchen zu testen.

An den glattmuskulären Organen Aorta und Lungenarterie wurde die mögliche vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz getestet, nachdem die Organe zuvor mit einer Kaliumchloridlösung maximal kontrahiert wurden.

Am Dünndarm, ebenfalls ein glattmuskuläres Organ, wurde auf eine mögliche spasmolytische Wirkung hin geprüft. Auch das Dünndarmpräparat wurde zuvor mit einer Kaliumchloridlösung vorkontrahiert.

An Organen der Herzmuskulatur wurden ebenfalls Versuche durchgeführt.

Am Vorhof wurde eine mögliche Abnahme der Schlagfrequenz beobachtet und am Papillarmuskel eine mögliche Verminderung der Kontraktionskraft.

Pro Organ wurden 4 Versuche durchgeführt und aus den Ergebnissen die Mittelwerte berechnet und Graphen erstellt. Anhand der Graphen wurden die  $EC_{50}$ -Werte ausgewertet.

Die Testsubstanz übte auf alle Organe eine starke Wirkung aus, was zu der Erkenntnis führt, dass die Testsubstanz nicht organspezifisch wirkt.

Besonders am Dünndarm kam es zu einer vollständigen Spasmolyse, daher wurde die Untersuchung des Wirkmechanismus der Testsubstanz an diesem Organ durchgeführt.

Jedoch wurde die Vermutung nicht bestätigt, dass die Testsubstanz zur Öffnung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen führt.

Die Wirkung an der Aorta war verglichen zu den anderen Organen sehr schwach.

Die Vasodilatation führte nur zu einer Abnahme der Kontraktionskraft auf rund 41 %.

Die Wirkung am zweiten untersuchten glattmuskulären Organ, der Lungenarterie, war wesentlich stärker, jedoch kam es nicht zu einer vollständigen Vasodilatation, sondern die restliche Kontraktionskraft betrug noch rund 14 %.

Die Testsubstanz hatte einen starken Effekt auf die Herzmuskulatur.

Bei den Präparaten des Vorhofs kam es zu einer 100%igen Abnahme der Schlagfrequenz.

Auch beim Papillarmuskel wurde die Kontraktionskraft bis auf 0 % vermindert.

Da die Wirkung nicht selektiv auf einem Organ beruht, ist der therapeutische Einsatz kaum sinnvoll. Das Nebenwirkungsprofil der Testsubstanz MAH12.HCl wäre für die Anwendung als Arzneimittel nicht vertretbar.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

Aktories, Förstermann, Hofman, Starke (2009) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 10. Auflage, 2009, Elsevir GmbH, München

Ariyaratnam, Priyadharshanan; Mahmoud Loubani, Alyn, H Morice (2013) Hydrogen sulphide vasodilates human pulmonary arteries: A possible role in pulmonary hypertension? Microvascular Research 90 (2013) 135-137

Ehlers, Eberhard (2003) Chemie I - Kurzlehrbuch Allgemeine und anorganische Chemie, 8. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart

Hunnius (2004) Pharmazeutisches Wörterbuch, herausgegeben von H.P.T. Ammon, 9. Auflage, Walter de Gruyter GmbH&Co.KG, 10785 Berlin

Ling, Sun; Sun Shuo, Li Yufen, Pan Wie, Xie Yumei, Wang Shushui, Zhang Zhiwei (2014) Potential biomarkers predicting risk of pulmonary hypertension in congenital heart disease: the role of homocysteine and hydrogen sulfide, Chinese Medical Journal 2014;127(5)

Liu, Yi-Hong; Ming Lu, Li-Fang Hu, Peter T.-H. Wong, George D. Webb, Jin-Song Bian (2012) Hydrogen Sulfide in the Mammalian Cardiovascular System, Comprehensive Invited Review, Antioxidants&Redox Signalling, Volume 17, Number 1, 2012

Mutschler, Ernst; Geisslinger, Gerd; Kroemer, Heyo; Schäfer-Korting, Monika (2001) Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 8. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

Mutschler, Ernst; Thews, Gerhard; Vaupel, Peter (1999) Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

Olschewski, Horst; Olschewski, Andrea (2011) Pulmonale Hypertonie, 2. Auflage, UNI-MED Verlag AG, D-28323 Bremen

Reiter M (1967) Die Wertbestimmung inotrop wirkender Arzneimittel am isolierten Papillarmuskel, Arzneimittelforschung 17: 1249-1253

Streeter, Eloise; Hooi H Ng and Joanne L. Hart (2013) Hydrogen sulfide as a vasculoprotective factor, *Medical Gas Research* 2013, 3:9

Tan, Gang; Shangha Pan, Jie Li, Xuesong Dong, Kai Kang, Mingyan Zhao, Xian Jiang, Jagat R. Kanwar, Haiquan Qiao, Hongchi Jiang, Xueying Sun (2011) Hydrogen Sulfide Attenuates Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity, Liver Cirrhosis and Portal Hypertension in Rats, *PLoS ONE* 6(10):e25943. doi:10.1371/journal.pone.0025943

Vadivel, Arul; Rajesh S. Alphonse, Lavinia Ionescu, Desiree S. Machado, Megan O'Reilly, Farah Eaton, Al Haromy, Evangelos D. Michelakis, Bernard Thebaud (2014) Exogenous Hydrogen Sulfide (H<sub>2</sub>S) Protects Alveolar Growth in Experimental O<sub>2</sub>-Induced Neonatal Lung Injury, *PLoS ONE* 9(3):e90965. doi:10.1371/journal.pone.0090965

Wang, Chao; Juan Han, Liang Xiao, Chang-E Jin, Dong-Jian Li, Zhen Yang (2014) Role of hydrogen sulfide in portal hypertension and esophagogastric junction vascular disease, *World Journal of Gastroenterology*, 2014 January 28, 20(4):1079-1087

## 8. LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

---

|                |                                         |
|----------------|-----------------------------------------|
| Name:          | Hanna Reumann                           |
| Geburtsdatum:  | 19. 12. 1984                            |
| Geburtsort:    | Eisenstadt                              |
| Nationalität:  | Österreich                              |
| Familienstand: | Ledig                                   |
| Eltern:        | Elisabeth Reumann<br>DI Herbert Reumann |
| Geschwister:   | Andreas Reumann BSc                     |

### Ausbildung

---

|             |                                               |
|-------------|-----------------------------------------------|
| 1991 - 1995 | Volksschule Deutschkreutz                     |
| 1995 - 2003 | BG/BRG/BORG Oberpullendorf                    |
| 2003 - 2014 | Studium der Pharmazie an der Universität Wien |