



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Aufklärung des Wirkmechanismus und der Wirkstärke
eines neu synthetisierten, möglichen H₂S-Donators
(SWS1) an isolierten Präparaten von Meerschweinchen

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Verfasserin: Anna Maria Krakus

Matrikel-Nummer: 0306158

Studienrichtung

(lt. Studienblatt): A449 Pharmazie

Betreuer: Ao . Univ.-Prof. Mag. Dr. Christian Studenik

Wien, Juli 2009

DANKSAGUNG

Ich widme meine Diplomarbeit meinen Eltern Malgorzata und Marian Krakus, die mir immer Kraft gegeben haben mein Ziel zu erreichen. Ohne Euch wäre ich nicht die, die ich jetzt bin.

Ich danke von ganzem Herzen meinem Freund, der mich alle Jahre materiell und emotional unterstützt hat. Ohne Dich wäre meine Studium nicht möglich gewesen.

Ich danke auch Frau Stanislaw, meiner Nachbarin, die mir immer wieder Mut gemacht hat, weiter meinen Weg zu gehen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Ao. Univ.- Prof. Mag. Dr. Christian Studenik für die verständnisvolle und freundliche Betreuung während meiner Diplomarbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Peter Höflich, der mir immer mit Witz und guten Tipps bei der praktischen Arbeit zur Seite stand.

Außerdem danke ich meiner Freundin Rita Castek, mit der ich meine Diplomarbeit gemacht habe, für die gute Laune, die Sie immer verbreite hat.

DZIEKUJE ZA TO, ZE JESTESCIE.

DZIEKUJE ZA WASZA MILOSC, CIERPLIWOSC I WSPARCIE

DZIEKUJE ZA TO, KIM JA SIE STALAM DZIEKI WAM.

PRACE MAGISTERSKA DEDYKUJE MOIM RODZICA MALGORZACIE I MARIANOWI KRAKUS.

INHALTSVERZEICHNIS

1.EINLEITUNG.....	8
1.1 Zielsetzung der Diplomarbeit.....	8
1.2 Schwefelwasserstoff (H₂S).....	9
1.3 ATP-sensitive Kaliumkanäle.....	10
1.4 Kaliumkanalblocker und Kaliumkanalöffner.....	11
2.MATERIAL UND METHODIK.....	12
2.1 Versuchstiere.....	12
2.2 Entnahme der Organe und Präparation.....	12
2.2.1 Isolierung der Arteria pulmonalis.....	13
2.2.2 Isolierung des Atrium dexter.....	13
2.2.3 Isolierung der Musculi papillares.....	13
2.2.4 Isolierung der Aorta	
2.2.5 Isolierung des Ileums terminalis.....	14
2.3 Verwendete Lösungen.....	15

2.3.1 Nährlösung.....	15
2.3.1 Kaliumchloridlösungen.....	16
2.4 Versuchsanordnung.....	16
2.4.1 Apparatur 1.....	17
2.4.2 Apparatur 2.....	19
2.4.3 Versorgung mit Oxymin.....	22
2.4.4 Kraftwandler, Verstärker, Schreiber.....	22
2.5 Verwendete Substanzen.....	24
2.5.1 Testsubstanz (SWS1).....	24
2.5.2 Verwendete Antagonisten.....	26
2.5.3 Verwendete Agonisten.....	27
2.6 Versuchsdurchführung.....	29
2.6.1 Versuchsdurchführung: Arteria pulmonalis.....	29
2.6.2 Versuchsdurchführung: Atrium dexter.....	30
2.6.3 Versuchsdurchführung: Musculus papillaris.....	31
2.6.4 Versuchsdurchführung: Aorta.....	32
2.6.5 Versuchsdurchführung: Ileum terminale.....	32
2.6.6 Versuchsdurchführung der Testsubstanz SWS1 in Kombination mit Agonisten.....	33

2.6.6.1 Versuchsdurchführung am Darm und an der Aorta mit Histamin, Acetylcholin und Phenylephrin.....	34
2.6.6.2 Versuchsdurchführung am Darm und an der Aorta mit Glibenclamid und Nitro-L-Arginin.....	35
2.7 Auswertung der Resultate.....	35
2.7.1 Auswertung der Versuche am Atrium dexter.....	35
2.7.2 Auswertung der Versuche Musculi papillares.....	35
2.7.3 Auswertung der Versuche an der Arteria pulmonalis, Aorta und Ileum terminale.....	36
2.8 Statistische Berechnung.....	36
3. ERGEBNISSE.....	37
3.1 Ermittlung der SWS1- Wirkung auf die bestimmte Meerschweinchen- Präparate.....	37
3.1.1 Ermittlung der SWS1-Wirkung auf die kontraktile Aktivität der Arteria pulmonalis.....	37
3.1.2 Ermittlung der SWS1-Wirkung auf die kontraktile Aktivität des Atrium dexter.....	40
3.1.3 Ermittlung der SWS1-Wirkung auf die kontraktile Aktivität der Musculi papillares.....	43
3.1.4 Ermittlung der SWS1-Wirkung auf die kontraktile Aktivität der Aorta.....	46
3.1.5 Ermittlung der SWS1-Wirkung auf die kontraktile Aktivität des Ileums terminales.....	49
3.2 Aufklärung des SWS1- Wirkmechanismus mit Antagonisten.....	52

3.2.1 Analyse des Wirkmechanismus von SWS1 mit Glibenclamid an der Aorta.....	52
3.2.2 Analyse des Wirkmechanismus von SWS1 mit Glibenclamid an der Aorta.....	56
3.2.3 Analyse des Wirkmechanismus von SWS1 mit Nitro-L-Arginin am Darm.....	60
3.2.4 Analyse des Wirkmechanismus von SWS1 mit Nitro-L-Arginin an der Aorta.....	63
3.3. Aufklärung des SWS1- Wirkmechanismus mit Agonisten.....	66
3.3.1 Analyse des Wirkmechanismus von SWS1 mit Phenylephrin am Darm.....	66
3.3.2 Analyse des Wirkmechanismus von SWS1 mit Phenylephrin an der Aorta.....	70
3.3.3 Analyse des Wirkmechanismus von SWS1 mit Acetylcholin am Darm.....	73
3.3.4 Analyse des Wirkmechanismus von SWS1 mit Histamin an der Aorta.....	77
3.3.5 Analyse des Wirkmechanismus von SWS1 mit Histamin am Darm.....	80
4. DISKUSSION.....	84
4.1 Versuche an isolierten Herzmuskelpräparaten.....	84
4.2 Versuche an der glatten Muskulatur.....	85
4.3 Analyse des Wirkmechanismus mit den Antagonisten.....	86
4.3.1 Analyse des Wirkmechanismus mit Glibenclamid.....	86
4.3.2 Analyse des Wirkmechanismus mit Nitro-L-Arginin.....	86
4.4 Analyse des Wirkmechanismus mit den Agonisten.....	87
4.4.1 Analyse des Wirkmechanismus mit Phenylephrin.....	87

4.4.2 Analyse des Wirkmechanismus mit Acetylcholin.....	87
4.4.3 Analyse des Wirkmechanismus mit Histamin.....	88
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	89
6. LITERATUR.....	91
7. CURRICULUM VITAE.....	93

1.EINLEITUNG

1.1 Zielsetzung der Diplomarbeit

Die Zielsetzung der Diplomarbeit wurde die genaue und systematische Untersuchung der am Department für pharmazeutische Chemie der Universität Wien synthetisierten Substanz, nämlich SWS1.

Die erwartete Wirkung von SWS1 war die Freisetzung von Schwefelwasserstoff. Die Wirkungen des H₂S wurden im nächsten Kapitel (1.2) mit Hilfe von verschiedenen Publikationen erläutert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, ob SWS1 eine relaxierende oder dilatierende Wirkung auf die glatte Muskulatur aufweist. An den isolierten Herzpräparaten wurde eine negative bzw. positive Inotropie und Chronotropie geprüft.

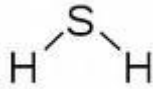
Die erwartete Wirkung auf die kontraktilen Parameter der glatter Muskulatur und des Herzens wurde an verschiedenen isolierten Meerschweinchenorganen getestet.

In den Versuchen wurde als glatte Muskulatur die Arteria pulmonalis, Aorta und terminale Ileum verwendet. Um die positive oder negative Kontraktionskraft bzw. Schlagfrequenz festzustellen, wurden der rechte Vorhof und der Papillarmuskel verwendet.

Das nächste Ziel meiner Diplomarbeit wurde den möglichen Wirkmechanismus der getesteten Substanz festzustellen. Dafür wurden folgende Antagonisten wie Glibenclamid, Nitro-L-Arginin und Agonisten wie Phenylephrin, Histamin und Acetylcholin verwendet.

1.2 Schwefelwasserstoff (H₂S)

Die zu testende Substanz SWS1 wurde entwickelt mit der folgender Hypothese: "Die Wirkung von SWS1 sollte auf der Freisetzung von Schwefelwasserstoff beruhen".



Schwefelwasserstoff (Hydrosulfid) ist ein übel riechendes, giftiges Gas. Nun die wissenschaftlichen Untersuchungen in den letzten Jahren zeigen, dass nicht nur Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenstoffmonoxid (CO), sondern auch Hydrosulfid (H₂S) ein anorganischer, gasförmiger Mediator im kardiovaskulären System eine große Rolle spielen. Schwefelwasserstoff ist mittels Cystathionin-β-Synthase (CBS) oder Cystathionin-γ-Lyase (CSE) aus der schwefelhaltigen Aminosäure L-Cystein synthetisiert. CBS katalysiert die H₂S-Synthese vor allem im Gehirn, CSE wiederum im kardiovaskulären System.

Schon in 1997 hat der Hosoki et al. eine relaxierende Wirkung von exogenem H₂S auf die glatte Muskulatur nachgewiesen.

Die Forscher konnten zeigen, dass der Schwefelwasserstoff in vivo und in vitro (Rochette et al., 2008) wahrscheinlich durch Öffnung von ATP-abhängigen K⁺-Kanälen des Gefäßendothels zu einer Vasodilatation und dadurch zu Hypotension bei Ratten führt (Bełtowski und Łowicka, 2004).

Eine weitere Wissenschaftlergruppe konnte mittels einer intrazellulären Mikroelektroden-Technik den Einfluss von H₂S auf die kardiale Elektrophysiologie nachweisen. Die Resultate veranschaulichen eine negative Chronotropie auf den Sinusknoten des Kaninchenherzens durch die Öffnung des ATP-abhängigen K⁺-Kanals (Xu et al., 2008).

Die Öffnung der Kaliumkanäle führt zu einem Einstrom von K⁺-Ionen in die Zelle, was zu Hyperpolarisation der Zellmembran führt. Es bewirkt die Schließung von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen und als Folge davon einen verringerten Einstrom von Ca²⁺-Ionen in die Zelle. Auf diese Weise kommt zu einer Erniedrigung der Calciumionen-Konzentration vor allem in den Arteriolen und zu einer Abnahme des Tonus der glatten Muskulatur. Es folgt eine Relaxation und Blutdrucksenkung (Mutschler 2008).

Eine Forschergruppe der Abteilung für Gefäßchirurgie in China konnte beweisen, dass H_2S einen protektiven Effekt in einer Konzentration von $1\mu\text{mol/l}$ auf das Herz von Ratten ausübt (Hu et al., 2007).

1.3 ATP-sensitive Kaliumkanäle

Durch die Entwicklung der Patch-Clamp-Technik (Hamill et al. 1981) konnten die Kaliumkanäle entdeckt werden. Die ersten Ionenkanäle wurden in Herzmuskel identifiziert (Noma 1983, Trube et al. 1984).

Die ATP-sensitiven Kaliumkanäle gehören zu einwärtsgerichtenden Kalium-Kanälen (Kir-Kanäle), die die Kalium-Ionen in die Zelle hinein lassen und eine wichtige Rolle bei folgenden zellulären Funktionen haben:

- Stabilisierung des Membranpotentials

- Regulierung der Kalium-Homöostase (Abraham et al., 1999).

Der K_{ATP} -Kanal ist ein Hetero-Octamer, der aus vier α -Untereinheiten und vier β -Untereinheiten besteht. Die α -Untereinheiten stellen zwei transmembranäre Domänen dar und bilden eine Pore.

Die Ionenkanäle bestehen aus einem Komplex von zwei Proteinstrukturen, einer porenformenden (Kir 6.0-Unterfamilie) und einer Sulfonylharnstoffbindenden Untergruppierung (SUR1/2). Bisher wurden zwei unterschiedliche α -Kanaluntereinheiten (Kir 6.1 bzw. Kir 6.2), sowie drei β -Untereinheiten, nämlich die ABC-Proteine (SUR 1, SUR 2A, SUR 2B), entdeckt.

K_{ATP} -Kanäle in den β -Zellen des Pankreas regulieren die Insulin-Sekretion, was auf den Glukosestoffwechsel angewiesen ist. In Herzmuskelzellen und den glatten Gefäßmuskelzellen koppeln sie den Stoffwechsel der Zellen mit der Kontraktilität (Malhi et al., 2000).

1.4 Kaliumkanalblocker und Kaliumkanalöffner

In der Therapie wurden Kaliumkanalblocker und Kaliumkanalöffner verwendet. Unter der Bezeichnung Kaliumkanalöffner oder Kaliumkanalaktivatoren wird eine Gruppe von Stoffen mit unterschiedlichen chemischen Strukturen zusammengefasst. Sie steigern die Öffnungswahrscheinlichkeit von ATP-abhängigen Kaliumkanälen.

Zelluläres ATP in physiologischer Konzentration hält diese Kanäle geschlossen. Ein Absinken des ATP-Gehaltes (zB. bei Ischämie) führt zur Öffnung der Kanäle und damit zur Hyperpolarisation. Die Kaliumkanalöffner vermindern die Empfindlichkeit des Kanals für ATP, so dass sich der Kanal auch in Gegenwart physiologischer zellulärer ATP-Konzentration öffnen kann (Estler et al., 2000). Die Koronar- und Hirngefäße reagieren am empfindlichsten auf die dilatierende Wirkung von den Therapeutika.

Therapeutika: Minoxidil, Diazoxid, Nicorandil

Anwendung: Arterielle Hypertonie, Angina pectoris, Blasenmotilitätsstörungen

Zu den Kaliumkanalblockern gehört Amiodaron, das durch die Hemmung von Kaliumkanälen zur Verlängerung des Aktionspotentials führt. Amiodaron wurde bei Herzrhythmusstörungen angewendet. Eine sehr wichtige Arzneistoffgruppe ist die Sulfonylharnstoffgruppe (orale Antidiabetika), die eben diesen Kaliumkanal hemmen, dadurch wurde die Membrandepolarisation verursacht. Kalzium strömt in die β -Zelle hinein und die Sekretionskaskade für Insulin wurde eingeschaltet.

2. MATERIAL UND METHODIK

2.1 Versuchstiere

In den folgenden Versuchen wurden Meerschweinchen beider Geschlechter aus dem Department der Toxikologie und Labortierzucht in Dobra Voda (Bratislava) verwendet. Die Tiere hatten ein Gewicht von 250-600 mg und sie waren wenige Wochen alt.

Das Versuchstier wurde einen Tag vor der Versuchsdurchführung nüchtern gestellt, um die erfolgreiche Versuche zu erzielen, da die Darmmotilität herabgesetzt worden war. Die Tötung erfolgte durch einen schnellen, gezielten Genickschlag. Gleich danach wurden die bestimmte Organe entnommen.

2.2 Entnahme der Organe und Präparation

Unmittelbar nach dem Tod wurde der Thorax sorgfältig mittels einer Schere geöffnet und zuerst das Herz entnommen, dann die Arteria pulmonalis und schließlich Ileum terminalis. Die Präparation der isolierten Organe erfolgte unter einem Mikroskop (Nikon SMZ-10A, Japan). Alle Organe wurden in getrennten Bechergläsern, die mit Nährlösung gefüllt und mit Oxymin begast waren, übergeführt. Die Begasung ist sehr wichtig, um die Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten, da es sonst zu einer Hypoxie der Organe kommen kann.

Abbildung 1: Foto von Präparierbesteck und Mikroskop



2.2.1 Isolierung der Arteria pulmonalis

Die Arteria pulmonalis (die Lungenarterie) wurde so nahe wie möglich am Herzen abgetrennt. Dann wurde das ein ziemlich kleines meist ca. 1 cm langes Stück der Pulmonalarterie am Korkboden der Petrischale mit zwei Präpariernadel befestigt und von restlichen Muskelgewebe und Fettgewebe befreit. Danach wurde es in ca. 3 mm breite Ringe geschnitten und bis zum Versuch in der durch Oxymix begasten Nährlösung aufbewahrt.

2.2.2 Isolierung des Atrium dexter

Das isolierte Herz wurde sofort nach der Tötung präpariert. Nach der Entfernung des Pericards (Herzbeutels) wurde an Basis und Spitze mit zwei Präpariernadel in einer mit Kork ausgekleideter Petrischale fixiert. Anschließend wurde der Vorhof (Atrium) entlang des Sulcus coronarius (äußere Furche) von der Herzkammer (Ventrikel) abgetrennt.

Im rechten Vorhof an der Einmündung der Vena cava superior (obere Hohlvene) ist der Sinusknoten lokalisiert, da ist es sehr wichtig den Vorhof sehr vorsichtig zu präparieren, um eine Verletzung oder Überdehnung zu vermeiden und somit ein Schlagen ermöglichen.

Nach der erfolgreichen Präparation wurden jeweils zwei Silberdrahthäkchen mit Hilfe von einem Faden an der unteren und der oberen Seite des Vorhofs angebracht. Bis zum Versuch wurde der Vorhof in einer mit Oxymix durchperlten Nährlösung aufbewahrt.

2.2.3 Isolierung der Musculi papillares

Die Papillarmuskeln befinden sich in den Herzventrikeln und verbinden die Sehnenfäden mit den Segelklappen. Um zu die Muskeln zu erreichen, wurde der rechte Ventrikel entlang des Septums bis zu Herzspitze aufgeschnitten, ausgeklappt und mit den Präpariernadeln am Korkboden fixiert.

Durch die Spontanaktivität der Purkinje-Fasern, die den Erregungsleitungssystem bilden, mussten diese entfernt werden, um den Versuchsablauf nicht zu stören.

Anschließend wurde am Ansatz der Sehne des Papillarmuskels ein Silberdrahthäkchen mit Hilfe von einem Faden befestigt. Analog zu den anderen wurde das Präparat in oxygenierten Nährlösung aufbewahrt.

2.2.4 Isolierung der Aorta

Die Isolierung der Aorta erfolgt mittels einer Pinzette und Schere durch sorgfältiges herauspräparieren entlang des Rückgrades. Das etwa 3 cm lange Stück wurde in einen Becherglass mit begaster Nährlösung übergeführt.

Die weitere Präparation wurde unter einem Mikroskop durchgeführt. Die Aorta wurde in einer mit Nährlösung gefüllte Petrischale transferiert und die zwei Enden der Aorta mit Präpariernadeln am Korkboden fixiert. So konnte man das eventuell vorhandene Muskel- oder Fettgewebe vorsichtig entfernen. Dann wurden löcherfreie Ringe von ca. 2 mm geschnitten und in die Versuchsanordnung eingespannt.

2.2.5 Isolierung des Ileum terminale

Ein Teil der Diplomarbeit ist die Untersuchung der Versuchssubstanz an der glatten Muskulatur. Ein sehr gutes Beispiel dafür ist der Darm, genau ein Teil davon, der vor dem Caecum liegt. Es wurde ein ca. 20 cm langes Stück am jejunalen Ende entnommen und markiert mit einem Faden. Da der Darm sehr zart ist und leicht zu durchtrennen ist, sollte man mit ihm vorsichtig umgehen. Das Darmstück wurde in begaster Elektrolytlösung aufbewahrt.

Für den Versuch wurde ein 0,5-1 cm langes Stück vom caecal gelegenen Ende schräg abgeschnitten und am Korkboden der Petrischale mit Präpariernadeln befestigt. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde der Darmstück mit Nährlösung durchgespült und damit gesäubert. Um eine Verwechslung der beiden Darmenden (jejunale und caecale Ende) zu verhindern, wurden sie mit rotem und schwarzem Faden markiert. Anschließend wurde an jedem Ende des Stücks jeweils ein Silberdrahthäkchen vorsichtig fixiert, um das Präparat in die Apparatur einspannen zu können. Wichtig ist, dass die beiden Enden eine Öffnung

haben, damit die Versuchssubstanz auch das Darmlumen erreichen kann. Bis zum Versuch wurde das fertig präparierte Ileum in mit Oxymix durchperlter Nährlösung aufbewahrt.

2.3 Verwendete Lösungen

2.3.1 Nährlösung

Bei der Nährlösung handelt es sich um eine physiologische Lösung von Glucose und Elektrolyten auf Wasserbasis. Sie gewährleistet den Präparaten eine künstlich physiologisches Milieu. Es ist eine modifizierte Krebs-Hanseleit-Lösung, nach der Vorschrift von Reiter (1967).

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der Zusammensetzung der physiologischen Nährlösung

Substanz	Stocklösung	ml Stocklösung/ l Tyrode	mmol/l
KCl	50,33 g / 5 l	35,00	4,73
NaCl	1000,25 g / 5l	33,60	114,90
NaHCO ₃	125,00 g / 5 l	83,70	24,90
MgSO ₄	147,02 g / 5 l	3,20	1,18
KH ₂ PO ₄	62,00 g / 250 ml	1,18	1,18
Glucose	rein	1,98	10,00
CaCl ₂	34 g / 250 ml	1,18	3,20

Die Nährlösung musste in einem Volumen von 2 Liter an jedem Versuchstag frisch zubereitet werden. Dafür wurden in der Tabelle aufgelisteten Stocklösungen miteinander vermischt: KCl, NaCl, NaHCO₃, KH₂PO₄, MaSO₄. Anschließend wurde Glucose hinzugefügt und mit destilliertem Wasser bis zu 2/3 aufgefüllt. Die Lösung wurde demnächst 20 Min. mit Oxymix begast und dann wurde eine CaCO₃-Lösung langsam zugetropft, um eine Trübung zu verhindern. Die fast fertige Nährlösung wurde anschließend mit destilliertem Wasser ergänzt.

2.3.2 Kaliumchloridlösungen

Die Kaliumchloridlösungen wurden in zwei verschiedenen Konzentrationen hergestellt, je nachdem für welches Präparat sie angewendet wurden.

Die 90 mmolare KCl- Lösung bestand aus 0,67 g KCl in 100 ml Nährlösung und wurde für die notwendige Vorkontraktion der Arteria pulmonalis und Aorta verwendet.

Die 60 mmolare KCl-Lösung aus 0,45 g KCl in 100 ml Nährlösung bewirkt die Vorkontraktion des Ileum terminalis.

2.4 Versuchsanordnung

Für die Versuchsdurchführung im Rahmen der praktischen Diplomarbeit standen zwei verschiedene Apparaturen zu Verfügung.

Die Apparatur 1 wurde verwendet für die folgenden Präparate:

- Aretria pulmonalis
- Atrium cordis dextrum
- Ileum terminale
- Aorta

Die Apparatur 2 wurde verwendet für:

- Musculus papillaris

2.4.1 Apparatur 1

Um die Funktionalität der Präparate aufrecht zu erhalten, wurden die Versuche im Organbad aus doppelwandigem Glas mit drei verschiedenen Ab- und Zulaufsystem, jeweils für die Nährlösung, Begasung und für die Temperaturregelung. Das Organbad hatte ein Volumen von 25 ml. In den doppelwandigen Glas zirkuliert das auf $37 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ temperierte Aqua destillata. Die Temperatur des Wassers musste während der Versuchsdauer konstant sein, um die physiologischen Bedingungen zu stimulieren. Es wurde mit Hilfe eines Thermostats mit einer Heizspirale gewährleistet.

Das Organbad hat die Aufgabe, ein möglich konstantes physiologisches Milieu für das Präparat darzustellen. Es wurde von unten durch Glasfritten mit Oxy mix begast, somit bekommen die Organe den lebensnotwendigen Sauerstoff. Die einströmende Gasmenge konnte mit einem Hahn reguliert werden. Die Lösung sollte nicht so stark durchperlt werden, sonst würde es den Versuchsablauf beeinträchtigen.

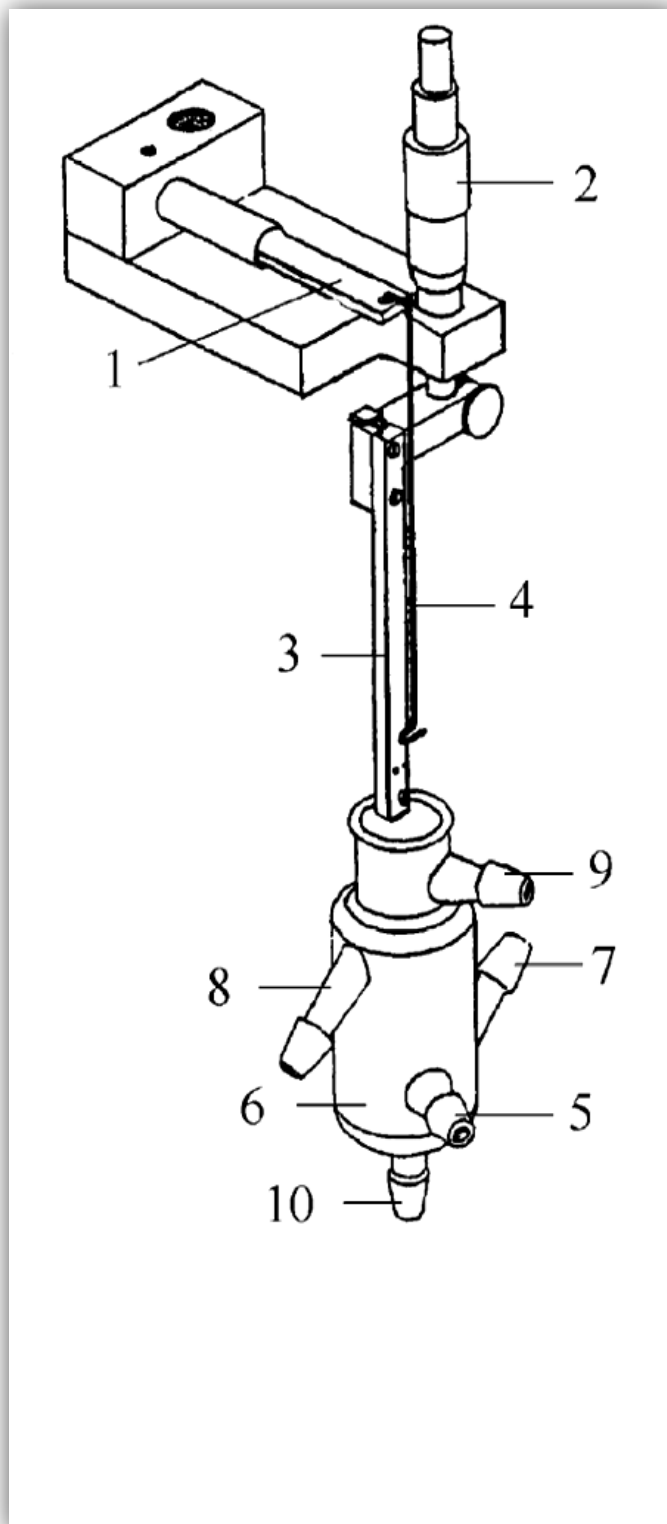
Da das zentrale Bad von oben offen ist, wurde die Nährlösung sowie die zu testenden Substanzen per Hand von oben hinein pipettiert.

Die Präparate wie das Ileum terminale und der rechte Vorhof wurden mittels den zuvor angebrachten Silberdrahthäkchen einerseits an einem Silberdraht am Kunststoffsteg der Organhalterung, andererseits am Silberdraht, der als Aufhängevorrichtung die Verbindung zu Kraftwandler darstellte, befestigt. Wiederum die Aorta und Lungenarterie wurden zwischen dieselben Silberdrähten direkt eingespannt. Danach wurde die Organhalterung in das, mit begaster Nährlösung aufgefüllte, Organbad hineingelassen.

Der Aufhängevorgang sollte möglichst schnell ablaufen, um Mangelversorgung des Organs zu verhindern.

Anschließend, mit Hilfe einer Mikrometerschraube, wurde an das Präparat eine für die maximale Kontraktionskraft notwendige Vorspannung angelegt. Die Kontraktionen wurden durch den Kraftwandler gemessen, der diese in eine Stromimpulse transformierte. Die Ergebnisse wurden an dem Schreiber sichtbar.

Abbildung 2: Schilderung der Apparatur 1



1-KRAFTWANDLER

2-MIKROMETERSCHRAUBE

3-PRÄPARATHALTERUNG

4- SILBERDRAHT

5- BEGASUNG

6- ORGANKAMMER

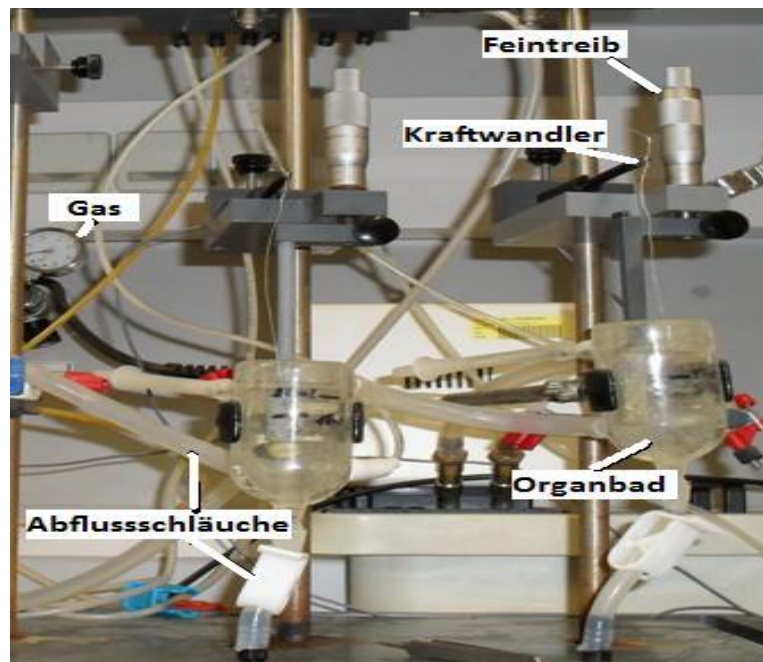
7- ZUFLUSS DES WASSERS

8- ABFLUSS DES WASSERS

9-ZUFLUSS VON NÄHRLÖSUNG

10-ABFLUSS VON NÄHRLÖSUNG

Abbildung 2: Foto von Apparatur 1



2.4.2 Apparatur 2

Die zweite Versuchsapparatur wurde nur für den Papillarmuskel verwendet. Sie bestand, analog zu Apparatur 1, aus der Organkammer mit begaster (Oxymix) Nährlösung, das aber in diesen Fall direkt in ein Wasserbad aus Acrylglas hinein tauchte. Das Volumen des Organbades betrug 27 ml. Die Temperatur des Wassers ist konstant auf 35 ± 1 °C gehalten mit Hilfe von Wasserbad, dessen Temperatur mit Thermostat und Heizspirale kontrolliert wurde.

Das Organbad hat hier nur eines Zulaufsystem, nämlich für Gaszufuhr. Die Nährlösung und die Muskelkammer wurden mit einer Kunstspritze gereinigt.

Der Unterschied bestand auch in der Fixierung des Präparates. Der Papillarmuskel, mit schon an einer Seite zuvor angebrachten Haken, wurde an einen Silberdraht vertikal befestigt. Der Silberdraht stellte eine Verbindung zum Kraftwandler dar. Danach wurde das freie untere Ende des Muskels zwischen zwei Plexiglasstückchen mit Hilfe einer Schraube eingeklemmt. Gleichzeitig wurde das Präparat an einer Silberchlorid-Elektrode angelegt, der für den elektrischen Reiz zuständig war.

Das Präparat konnte mittels Stativschlitten in das mit Nährlösung gefüllte Organbad hineingeführt werden. Es sollte auf Vermeidung starker Dehnung geachtet werden, was die apoptotische Vorgänge auslösen könnte.

Die Vorgänge sollten ziemlich schnell ablaufen, um die Versorgung des Papillarmuskels mit Sauerstoff und Elektrolyten wiederherzustellen.

Mittels einer Mikrometerschraube wurde für die notwendige maximale Kontraktionskraft eine Spannung eingelegt. Die Reizung des Muskels erfolgte mit einem elektrischen Impuls, der von einem Anapulse Stimulators erzeugt wurde. Das Signal der isometrischen Kontraktion des Papillarmuskels wurde aufgenommen und in Stromimpuls transformiert und anschließend mittels eines Papierrecorder registriert.

Abbildung 4: Foto von Papillarmuskel

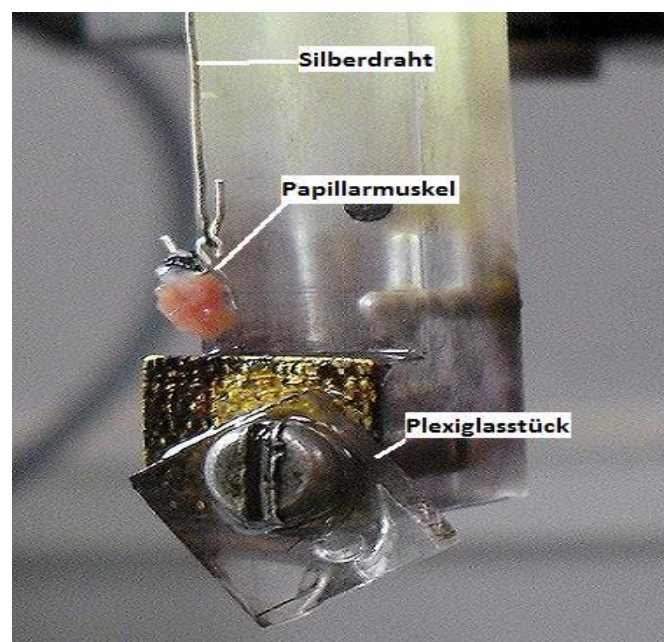
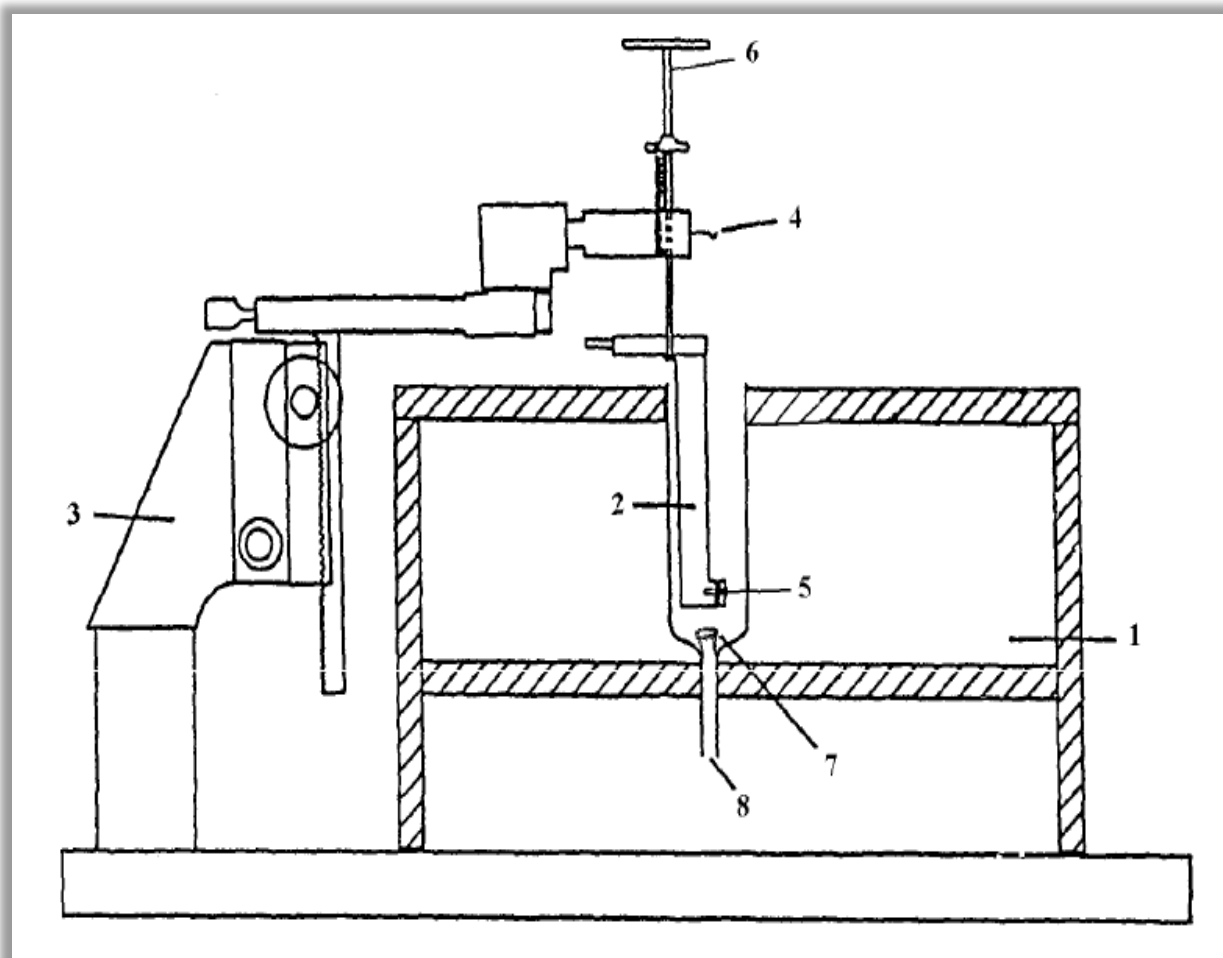


Abbildung 5: Die Beschreibung der Apparatur 2



1- TEMPERIERTES WASSERBAD

2- REIZFUSS

3- STATIV

4- AUFHÄNGEVORRICHTUNG

5- PRÄPARATHALTERUNG MIT REIZELEKTRODE

6-MIKROMETERSCHRAUBE

7- ORGANKAMMER

8- BEGASUNG

2.4.3 Versorgung mit Oxymix

Oxymix ist ein Gasgemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid. Die Zusammensetzung ermöglicht den isolierten Präparaten sowohl eine Versorgung mit den lebenswichtigen Gasen und gewährleistet auch eine physiologische pH von 7,2- 7,4.

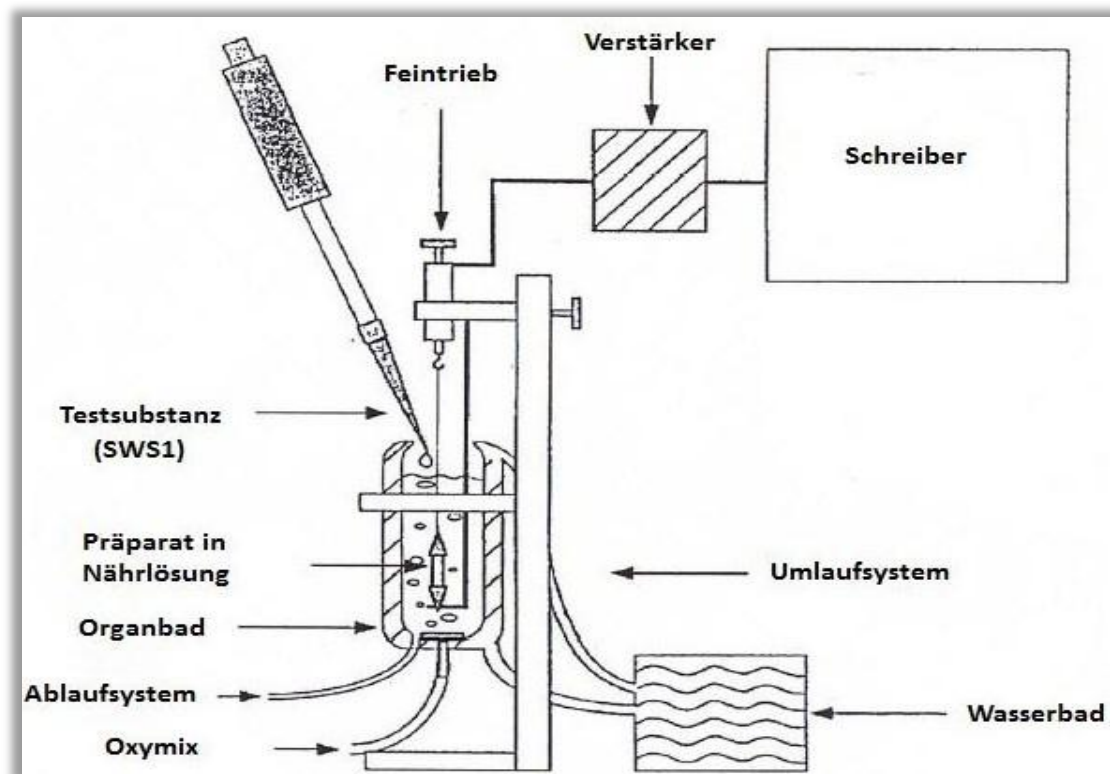
Oxymix wurde in einer Stahlflasche komprimiert. Über ein Schlauchsystem wurde das Gasgemisch ins Labor und zu den Apparaturen zugeführt. Mit den entsprechenden Gasventilen konnte man die Gaszufuhr regulieren.

2.4.4 Kraftwandler, Verstärker, Schreiber

Der Silberdraht auf dem das jeweilige Organ angebracht wurde, stellte eine Verbindung zum Kraftwandler (Transbridge, WPI, Sarasota, USA) dar. Der Kraftwandler hatte die Aufgabe, die mechanischen Spannungsänderungen (die Kontraktionskräfte) des eingespanntes Organs in elektrische Signale umzuwandeln, die dann wiederum über einen 4-Kanal-Verstärker (TM 4-Channel Transducer Amplifier, USA) auf einem Schreiber (Dual Channel BD 112, Kipp & Zonen, Niederlande) aufgezeichnet wurden.

Bei den Versuchen mit dem Papillarmuskel wurde noch zusätzlich ein Impulsgenerator verwendet, der Anapulse Stimulator (Isostim 301T, WPI, USA). Das Reizgerät erzeugte elektrische Impulse, die den Papillarmuskel stimulierten.

Abbildung 6: Schematische Zusammenstellung der Geräte und Originalphoto der Apparatur, die bei Versuchsablauf beim Papillarmuskel verwendet wird.



Apparatur 7: Foto von technischen Geräten für Papillarmuskel

Anapulse Stimulator

Amplifier

Schreiber



2.5 Verwendete Substanzen

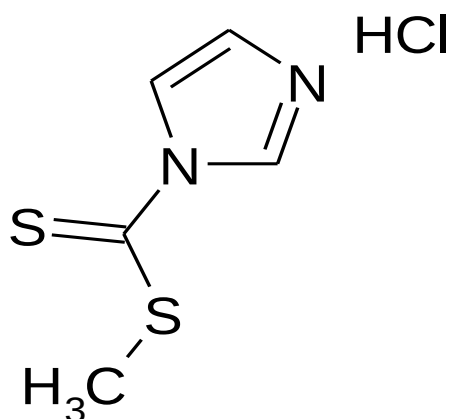
2.5.1 Testsubstanz (SWS1)

SWS1 wurde freundlicherweise von Herrn Univ.-Prof. Dr. Thomas Erker von Departement für pharmazeutische/medizinische Chemie zur Verfügung gestellt. Dort wurde die Substanz von Frau Mag. Gerda Brunhofer synthetisiert.

Nomenklatur: 1-(Methyldithiocarbonyl)imidazol-hydrochlorid

Strukturformel: MG = 194,5 g/mol

Abbildung 8: Strukturformel von SWS1



An jedem Tag vor der Versuchsdurchführung wurde die Stocklösung von SWS1 immer frisch vorbereitet. Die Einwaage der Substanz wurde unterschiedlich berechnet, je nachdem welches Organbad zu Verfügung stand. Wichtig war, dass die kumulative Konzentration im Organbad am Ende des Versuchs 100 µmol/l betrug.

Tabelle 2: Stocklösungen

Stocklösung	Volumen des Organbades in ml	Einwaage des SWS1 100 µmol/l
SWS1	25 ml	0,48 mg
SWS1	8 ml	0,15 mg

Im Verlauf des Versuchs wurden alle 45 Minuten schrittweise höhere Volumina der Stocklösung (Tabelle 3) mittels einer Kolbenhubpipette pipettiert und als Folge davon wurde eine Steigerung der Konzentration (Tabelle 3) im Organbad beobachtet. Die Zugabe der Lösung sollte im gleichen Bereich des Organbades erfolgen.

Tabelle 3: Peppitierordnung

Volumen der Stocklösung	Steigende Konzentration
1 µl	1 µmol/l
2 µl	3 µmol/l
7 µl	10 µmol/l
20 µl	30 µmol/l
70 µl	100 µmol/l

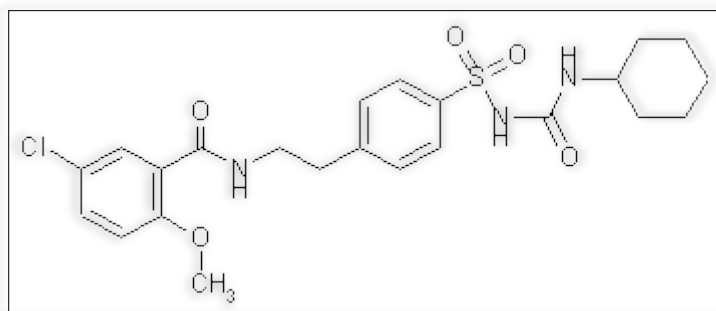
2.5.2 Verwendete Antagonisten

Folgende Antagonisten wurden in den Versuchen verwendet:

Glibenclamid, Nitro-L-Arginin.

Glibenclamid

Abbildung 9: Strukturformel von Glibenclamid

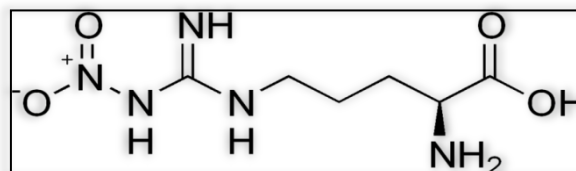


Glibenclamid gehört zu der Wirkstoffgruppe der Sulfonylharnstoffe, deren Wirkmechanismus auf der Blockade von Kaliumkanälen (K⁺ATP-Kanäle) beruht. Das führt zu einer Abnahme des Membranruhepotential. Als Folge davon kommt es zu einer Öffnung von spannungsabhängigen Ca⁺⁺-Kanälen, Calcium strömt in die Zelle hinein.

Indikation: Diabetes mellitus

Nitro-L-Arginin

Abbildung 10: Strukturformel von Nitro-L-Arginin



Nitro-L-Arginin ist ein nicht selektiver NO-Synthase-Inhibitor. Dadurch kommt es zu Hemmung der NO-Biosynthese aus L-Arginin. Stickstoffmonoxid ist ein rasch inaktivierbares Signalmolekül in Gefäß-, Nerven- und Immunsystem, im Magen-Darmtrakt und im Gehirn

und das wichtigste antiatherosklerotische Molekül. NO wird von den intakten Endothelzellen gebildet und führt zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur. Eine Hemmung der NO-Synthase führt zu einer Unterbindung der endogenen Vasodilatation.

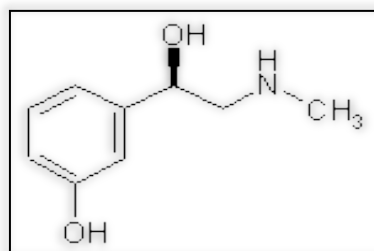
2.5.3 Verwendete Agonisten

Die folgenden Agonisten wurden in den Experimenten genutzt:

Phenylephrin, Histamin, Acetylcholin.

Phenylephrin

Abbildung 11: Strukturformel von Phenylephrin

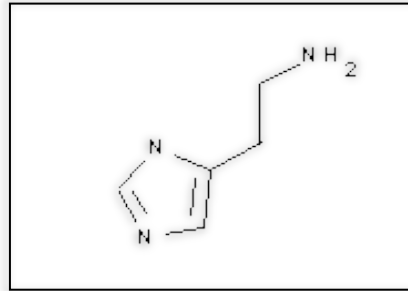


Phenylephrin ist ein Wirkstoff aus der Sympathomimetika, der direkt die α -Rezeptoren angreift. Als α_1 -Adrenozeptor-Agonist wirkt er vasokonstriktorisch und am häufigsten wird zur lokalen Schleimhautabschwellung verwendet.

Indikation: allergische Konjunktivitis, Sinusitis, Nasopharyngitis

Histamin

Abbildung 12: Strukturformel von Histamin



Histamin es ist ein Decarboxylierungsprodukt der Aminosäure Histidin. Histamin gehört zu den Gewebshormonen, deren höchste Konzentrationen sich in den Lungen, der Haut und im Magen-Darm-Trakt befinden. Es wird bei einer allergischen Reaktion aus den degranulierten Mastzellen freigesetzt. Es gibt vier Histamin-Rezeptoren, deren Stimulierung verschiedene Reaktionen im Körper auslösen.

H₁: Kontraktion der Darm-, Bronchial- und Uterusmuskulatur, Permeabilitätssteigerung der Kapillaren (Ödeme), Stimulierung freier Nervenendigungen (Juckreiz)

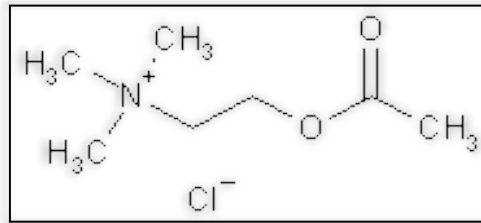
H₂: Steigerung der Magensaftsekretion, positiv inotrope und chronotrope Wirkung am Herzen

H₃: präsynaptische Autorezeptoren, Hemmung der Histamin Freisetzung

H₄: zeigt hohe Homologie zu H₃-Rezeptoren

Acetylcholin

Abbildung 13: Strukturformel von Acetylcholin



Acetylcholin zählt zu den Neurotransmittern an den Synapsen des Zentralnervensystems, an den parasympathischen Ganglien und am postganglionären Parasympathikus (Mutschler 2008). Dadurch spielt es eine wichtige Rolle bei der Regulation vieler Körpervorgänge.

Acetylcholin hat je nach Angriffspunkt eine:

→ muskarinartige Wirkung (M_1 - M_5 -Rezeptoren):

Herzfrequenzminderung, Gefäßerweiterung, Blutdrucksenkung, spasmogen auf glatte Muskelzellen des Darms und der Bronchien, Steigerung der Drüsensekretion, Miosis

→ nikotinartige Wirkung (Nicotin-Rezeptoren):

es kommt zuerst zu einer Erregung der Rezeptoren und durch relativ hohe Dosen zu einer Lähmung.

2.6 Versuchsdurchführung

2.6.1 Versuchsdurchführung: Arteria pulmonalis

Die vorbereiteten Ringe der Arteria pulmonalis wurden zwischen zwei Silberdrahtstücken vorsichtig in der Apparatur 1 (siehe 2.4.1) eingespannt. Es war wichtig die Überdehnung, aber auch die Austrocknung und die Verletzung des Präparates zu vermeiden. Danach folgte das Eintauchen in das Organbad, in dem sich schon die auf 37 ± 1 °C temperierte und mit Oxymix durchperlte physiologische Nährlösung befand.

Zuerst wurde der Schreiber eingeschaltet und auf dem Nullpunkt (Nulllinie) eingestellt, danach der Amplifier. Die eventuelle Abweichung wurde von der Nulllinie korrigiert. Es folgte dann die Vorspannung des Organs mittels des Feintribes um 9,81 mN bei 5 mV und mit Hilfe des Verstärkers wurde die sich eventuell verschobene Nulllinie ausgeglichen.

Anschließend kam es zu einer Anpassungszeit von 20 Minuten, die Nulllinie wurde wieder mit dem Feintrieb der Stellschraube nachgestellt. Danach folgte die Aufzeichnung auf dem Schreiber ("record on ", "pen down"). Die Nährlösung wurde ausgelassen und gegen 25 ml der 90 mmolaren KCl-Lösung (siehe 2.3.2) ausgetauscht.

Nach dem Verlauf von etwa 90 Minuten und der Erreichung der Plateauphase konnte die Zugabe der Testsubstanz beginnen. Die Plateauphase stellte die maximale Kontraktion dar und daher wurde mit 100% angenommen.

2.6.2 Versuchsdurchführung : Atrium dexter

Der Versuch mit dem zuvor präpariertem rechtem Vorhof (siehe 2.2.2) wurde in der Apparatur 1 durchgeführt. Der noch schlagende Vorhof wurde in die Versuchsassaparatur vorsichtig eingespannt. In diesem Fall musste das Organ nicht elektrisch gereizt werden, da er durch den sich im rechten Vorhof befindlichen Sinusknoten fähig war, spontane Schläge zu erzeugen.

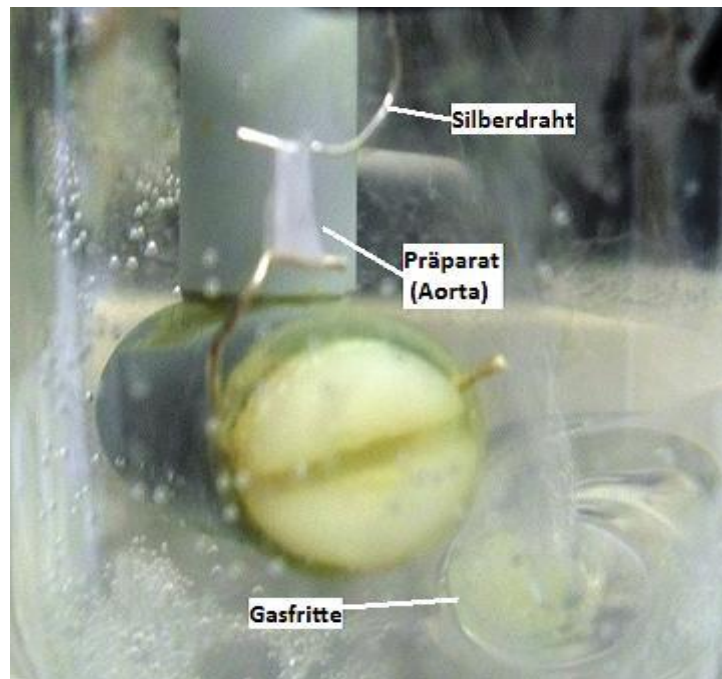
Analog wie bei Arteria pulmonalis wurde der Vorhof in das vorbereitete Organbad abgesenkt, dann wurden der Papierrecorder und der Verstärker eingeschaltet. Es folgte die Vorspannung von 10,4 mN bei 5 mV mittels eines Feintribes.

Die Anpassungszeit betrug etwa 30 Minuten. Hier wurde die Aktivität des Vorhofs, also die Schlagfrequenz, bis sie konstant war, beobachtet. Nun konnte die 45 Minuten lange Kontrollphase beginnen, in der alle 5 Minuten über 6 Kästchen des Millimeterpapiers die Vorhofsschläge aufgezeichnet wurden. Die Papiervorschubgeschwindigkeit wurde auf speed 5 eingestellt.

Sobald die Amplitude konstant war, konnte die kumulative Einspritzung der Testsubstanz mit Hilfe der Kolbenhubpipette beginnen. Die Substanz wurde in den 45 Minuten langen

Abständen hinzugefügt und analog wurden alle 5 Minuten die Messsignale auf dem Schreiber aufgezeichnet.

Abbildung 14: Foto von eingespannten Aortenring



2.6.3 Versuchsdurchführung: Musculus papillaris

Nach der Fixierung des Papillarmuskels in der Apparatur 2 (siehe 2.4.2) und der Einschaltung des Schreibers und des Verstärkers wurde eine Vorspannung über den Kraftmesser von 3,92 mN bei 5 mV angelegt. Hier wurde auch immer wieder die Spannung nachkorrigiert, um die Minderung der Ausgangsspannung, die sich in Verringerung der Kontraktionskraft zeigte, zu verhindern.

Im Gegensatz zum rechten Vorhof, wurde der Papillarmuskel elektrisch stimuliert, da er keine Erregungsbildenden Strukturen wie der Sinusknoten aufweist. Die elektrische Reizung erfolgte analog wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben.

Nach der Adaptationsphase von etwa 10 Minuten wurde der Muskel kontinuierlich mit der Reizfrequenz von 1 Hz stimuliert. Die Reizung erfolgte in Rechteckimpulsen bei einer Länge von 3 ms^{-1} .

Die Kontrollphase betrug wie bei dem Versuch mit dem Vorhof 45 Minuten. Alle 5 Minuten erfolgten die Aufzeichnungen der entstandenen Aktionspotentiale über fünf Peaks auf einem Papierschreiber, so lange bis sie ein konstantes Niveau erreichten. Danach wurde die Zugabe der Testsubstanz mittels einer Kolbenhubpipette durchgeführt. Nach jeweils 45 Minuten wurde der ununterbrochen laufende Papierschreiber auf Schnell-Lauf gestellt und jeweils fünf Aktionspotentialamplituden aufgenommen wurde.

2.6.4 Versuchsdurchführung: Aorta

Die Versuchsdurchführung ist analog der in dem Versuch mit der Arteria pulmonalis, der im Kapitel 2.6.1 beschrieben wurde. Nun die nicht Übereinstimmung ist die Vorspannung, nämlich die Aorta brauchte 9,81 mN bei 5 mV.

2.6.5 Versuchsdurchführung: Ileum terminale

Für das im Kapitel 2.2.5 vorbereitete Darmstück wurde die Apparatur 1 verwendet. Das Präparat wurde mittels den bei der Präparation angehängten Silberhäkchen zwischen zwei Silberdrähten eingespannt und in das Organbad (wie bei der Arteria pulmonalis) abgelassen. Wie bei den anderen Versuchen wurde nach der Bereitstellung des Schreibers die Nulllinie eingestellt und dann wurde der Verstärker eingeschaltet. Die eigentliche Vorspannung von 4,9 mN bei 5mV wurde angelegt. Es ist sehr wichtig, dass die Nulllinie immer wieder nachjustiert wurde.

Die Adaptationsphase dauerte 20 Minuten, dann wurde die Nährlösung ausgelassen und die entsprechende 60 mmolare KCl- Lösung (siehe 2.3.2) eingelassen. Unmittelbar danach wurde der Schreiber aktiviert ("record on ", "pen down") und es erfolgte die etwa 45 Minuten lange Aufzeichnung. Sobald die stabile tonische Kontraktion erreicht wurde (die Plateauphase), wurde die Testsubstanz eingespritzt.

2.6.6 Versuchsdurchführung der Testsubstanz SWS1 in Kombination mit den Agonisten

Die folgenden Versuche wurden am Ileum terminale und an der Aorta durchgeführt, um den Wirkmechanismus der Testsubstanz herauszufinden. Es wurden jeweils drei Versuche mit den vorbereiteten Konzentrationen erfolgen.

Die Agonisten und die Testsubstanz wurden im Kapitel 2.5 ausführlich beschrieben. Um den genaueren Vergleich mit der Testsubstanz vornehmen zu können, wurde mit den Verdünnungsreihen von den jeweiligen Agonisten gearbeitet. Die folgende Substanzen wurden in der Nährlösung bis auf Glibenclamid (in DMSO) gelöst und vor dem Versuch immer frisch vorbereitet.

Es wurden folgende Konzentrationen hergestellt:

-- für Histamin und Acetylcholin (18 ml Organbad)

0,01 μ M 0,03 μ M 0,1 μ M 0,3 μ M 1 μ M 3 μ M

-- für Phenylephrin (17 ml Organbad)

0,1 μ M 0,3 μ M 1 μ M 3 μ M

-- für Glibenclamid (25 ml Organbad)

30 μ M 100 μ M

-- für Nitro-L-Arginin (25 ml Organbad)

100 μ M

Die Testsubstanz SWS1 wurde für die drei Agonisten und für den Glibenclamid und Nitro-L-Arginin in zwei Konzentrationen von 6 μ M und 8 μ M verwendet.

2.6.6.1 Versuchsdurchführung am Darm und an der Aorta mit Histamin, Acetylcholin und Phenylephrin

Die verwendete Darmstücke bzw. Aortenringe wurden, wie bereits im Kapitel 2.2.5 bzw. 2.2.4 beschrieben, vorbereitet. Hier wurde jedoch keine Vorkontraktion mit KCl-Lösung verlaufen. Danach erfolgte die Einspannung in der Apparatur 1 und die Absenkung in das mit Nährlösung gefüllte und mit Oxymin begaste Organbad.

Nach der üblichen Vorspannung für den Darm auf 4,9 mN bzw. für die Aorta 9,81 mN folgte die 30 Minuten lange Adaptationsphase. Inzwischen konnte mit der Herstellung von der Verdünnungsreihe der jeweiligen Agonist begonnen werden.

Die Einspritzung der bestimmten Konzentrationen von Agonisten in das Organbad erfolgte immer alle 10 Minuten mittels einer Injektionsspritze (Volumen von 0,5 ml). Die 30 Sekunden lange Einwirkzeit wurde auf dem Schreiber strichweise registriert und danach mit der frischen und reinen Nährlösung zwei Mal gespült. Die Kontrollphase begann mit der niedrigsten Konzentration, die dann schrittweise erhöht wurde, damit konnte die kontraktile Aktivität der glatten Muskulatur des Organs im Bezug auf die Konzentration des Agonisten ermittelt werden.

Anschließend begann die Versuchsphase mit der Testsubstanz (SWS1). Es wurde die Mischung aus Nährlösung und SWS1 in bestimmter Konzentration (30 μ M) vorbereitet. Dann erfolgte die Adaptationsphase, in der sich das jeweilige Organ in der Mischung befand. Nach 45 Minuten wurde die erste und niedrigste Konzentration des Agonisten eingespritzt. Es war wichtig, dass das Einspritzten immer in den gleichen Bereich des Organbades ohne Berührung des Präparates durchgeführt wurde. Die Vorgehensweise war gleich wie in der Kontrollphase.

2.6.6.2 Versuchsdurchführung am Darm und an der Aorta mit Glibenclamid und Nitro-L-Arginin

Die Vorgangsweise ist analog der in dem Kapitel 2.6.6.1 beschrieben. Der Unterschied zwischen den beiden Methoden lag in der Zugabe der Substanzen und die Aufzeichnung durch den Schreiber verläuft in Form einer Kurve.

Hier wurde der Agonist, nach dem Erreichen der "steady-state"-Phase, in einer bestimmter Konzentration (siehe 2.6.6.1) zugefügt und nach 45 Minuten wurde die Testsubstanz zugegeben. Die Einwirkzeit von SWS1 betrug auch 45 Minuten.

2.7 Auswertung der Resultate

2.7.1 Auswertung der Versuche am Atrium dexter

Durch die spontane Kontraktion der Ventrikelmuskulatur wurde die Schlagfrequenz durch dem Schreiber auf dem Millimeterpapier registriert. Die Auswertung beruhte auf der Abzählung der Vorhofsschläge (siehe 2.6.2). Davon wurde ein durchschnittlicher Wert errechnet und dann mit dem Faktor 5 multipliziert. Somit konnte die Wirkung also die Abnahme bzw. Zunahme der Schlagfrequenz der Testsubstanz ermittelt werden.

2.7.2 Auswertung der Versuche am Musculi papillaris

Zur Beurteilung der Kontraktionsänderungen des Papillarmuskels wurden die fünf aufgenommenen Aktionspotentialamplituden mit einem Lineal abgemessen und die durchschnittlichen Werte wurden berechnet. Hier wurde angenommen, dass

1 cm = 1mN bei der 5mV Spannung

1 cm = 0,4 mN bei der 2 mV Spannung .

2.7.3 Auswertung der Versuche an der Arteria pulmonalis, Aorta und Ileum terminale

Die Auswertung der Kontraktionsabnahme der glatten Muskulatur erfolgte mittels der Kurven, die während des Versuchs durch den Schreiber aufgezeichnet wurden. Die Präparate wurden zuerst mit der KCl -Lösung vorkontrahiert, damit die eventuelle Wirkung der Testsubstanz deutlicher gezeigt werden konnte.

Hier wurde der Abstand zwischen der Nulllinie und den markierten Punkten auf der Kurve mit dem Lineal (in Zentimeter) abgemessen. Die Punkte spiegeln die alle 45 Minuten eingespritzte Testsubstanzkonzentration wieder. Der abgelesene Wert wurde mit dem Kalibrationsfaktor des Kraftwandlers (0,98) multipliziert, um den Endwert in mN zu erhalten.

2.8 Statistische Berechnung

Die gemessenen Parameter der Kontrollphase (ohne Substanz) wurden als Bezugswerte auf 100 % gesetzt. In der Phase wurde die Plateau-Bereich erreicht. Im Vergleich zu den registrierten Messwerten konnte die prozentuelle Abweichung von den Kontrollwerten ausgerechnet werden. Die Endwerte wurden regelmäßig in das Computerprogramm "SIGMA PLOT" eingegeben. Damit konnte auch eine graphische Darstellung als X-Y Diagramm den arithmetischen Mittelwerte mit den Standardfehlern (SEM = Standardfehler des Mittelwertes) gezeigt werden.

Aus der Konzentrations -Wirkungs-Kurve konnten die EC_{50} -Werte abgelesen werden. EC_{50} wurde als effektive Konzentration der Testsubstanz ($\mu\text{mol/l}$), bei der die kontraktile Aktivität der Präparate auf die 50 % der Ausgangaktivität absank.

Die statistische Berechnung wurde nach Student's T-Test (gepaarte Daten) durchgeführt. Die Messwerte wurden als signifikant bezeichnet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) nicht über einen festgelegten Niveau liegen wurde, also:

- | | | |
|---------------------|-------------|---------------------------|
| → kleiner als 5 %, | $p = 0,05$ | signifikant |
| → kleiner als 1%, | $p = 0,01$ | sehr signifikant |
| → kleiner als 0,1%, | $p = 0,001$ | höchst signifikant. |

3. ERGEBNISSE

3.1 Ermittlung der SWS1-Wirkung auf die bestimmte Meerschweinchen-Präparate

3.1.1 Ermittlung der SWS1-Wirkung auf die kontraktile Aktivität der Arteria pulmonalis

Die Ermittlung der Wirkung der Testsubstanz SWS1 auf die kontraktile Aktivität der Pulmonalarterie erfolgte in fünf kontrollierten Versuchen. Die gemessenen Parameter in der Kontrollphase wurden als Bezugswerte auf 0,00 % gesetzt und es handelt sich um $14,30 \pm 0,30$ mN.

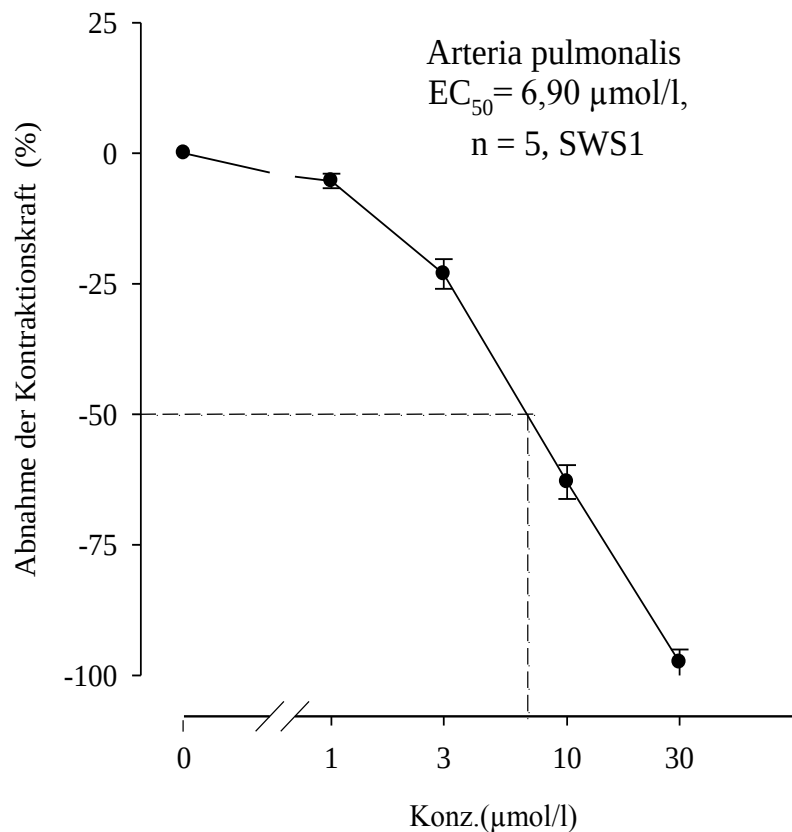
An der durch den Papierrecorder registrierten Kurve konnte die konstante Verringerung der Kontraktion von 0,00 % auf die $-97,53 \pm 2,47$ % ($0,37 \pm 0,34$ mN) beobachtet werden. Auf Grund der Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen ergaben sich die auch die $EC_{50} = 6,90 \mu\text{mol/l}$.

Tabelle 4: Tabellarische Übersicht der Versuchsergebnissen der Einwirkung von SWS1 auf die kontraktile Aktivität der glatten Muskulatur der Pulmonalarterie.

SWS1 [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Zahl der Versuche n	Irrtumswarscheinlichkeit p
Kontrolle	$14,3 \pm 0,30$	$00,00 \pm 0,00$	5	-
1	$13,53 \pm 0,31$	$-5,30 \pm 1,40$	5	n.s.
3	$10,97 \pm 0,28$	$-23,13 \pm 2,83$	5	0,05
10	$5,27 \pm 0,39$	$-62,97 \pm 3,25$	5	0,01
30	$0,37 \pm 0,34$	$-97,53 \pm 2,47$	5	0,001

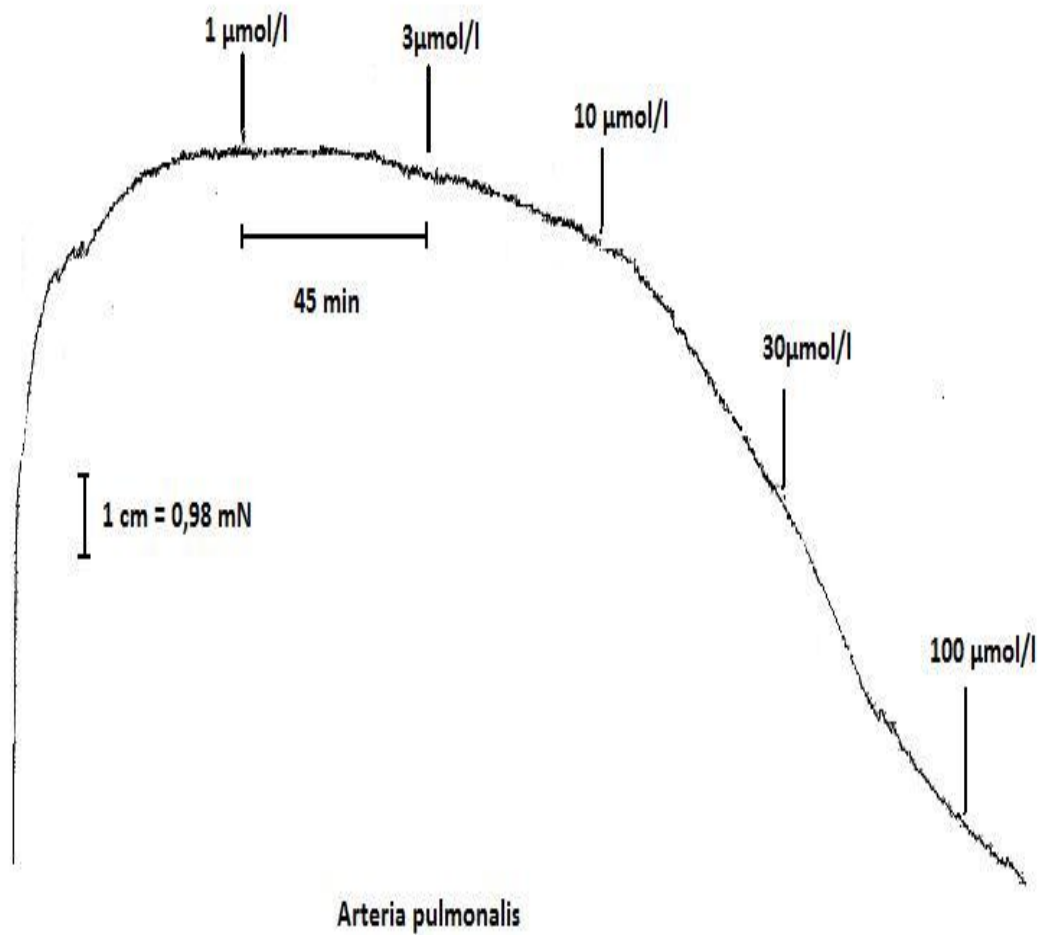
In der Tabelle 4 wurden die Versuchsergebnisse der fünf Untersuchungen gezeigt, nämlich die arithmetische Mittelwerte der Kontraktionsänderung (in mN, %) und deren Standardfehler.

Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von SWS1 an der Pulmonalarterie



Die Abbildung 15 stellt ein Verlauf der deutlichen Kontraktionsabnahme der Pulmonalarterie mit steigender Konzentration von SWS1 dar. Im Diagramm wurden die verwendeten SWS1-Menge an der X-Achse und die Tonusabnahme des Präparates an der Y-Achse angegeben. Die Mittelwerte sind als einzelne, schwarze Punkte und die darauf befindliche Balken als Standardfehler zu erkennen.

Abbildung 16: Die originale Registrierung eines Einzelversuches an der Pulmonalarterie



3.1.2 Ermittlung der SWS1-Wirkung auf die kontraktile Aktivität des Atrium dexter

Die Untersuchung der Auswirkung von SWS1 auf die Schlagfrequenz und Kontraktionsstärke des Vorhofs wurde in fünf Versuchen kontrolliert. Der Testsubstanzeffekt wurde in Bezug auf den Kontrollwert von $207,00 \pm 9,02$ mN errechnet.

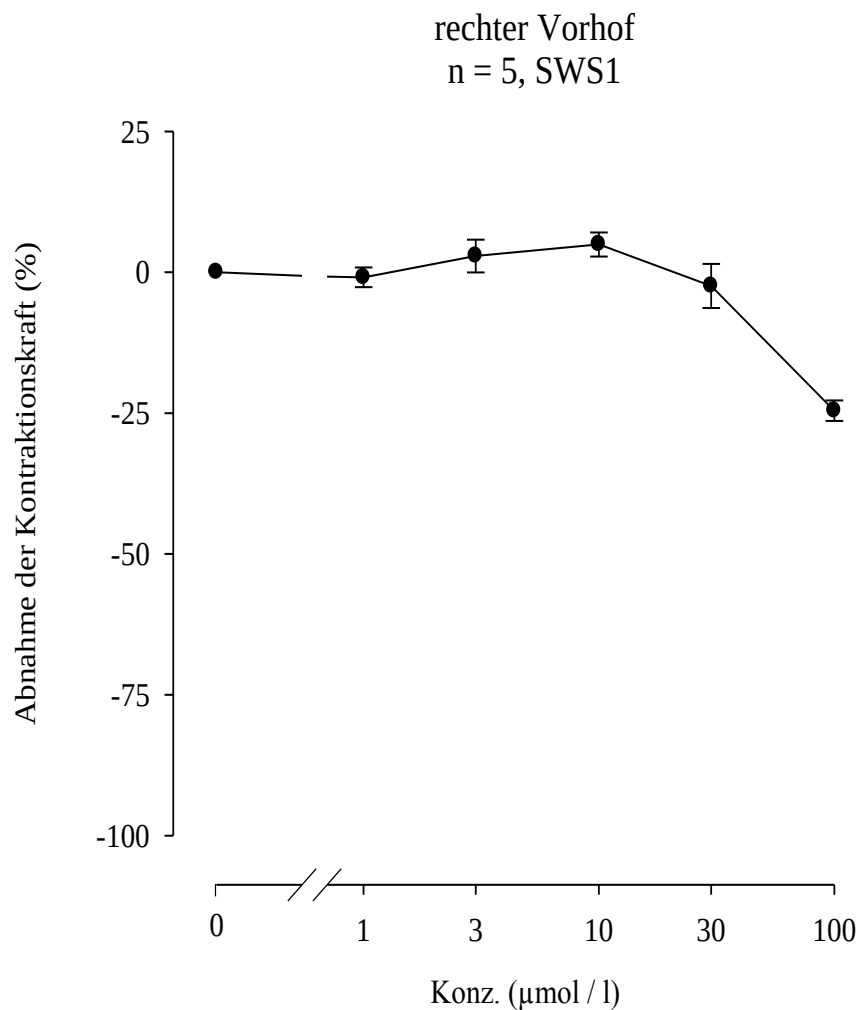
Die Frequenz des Herzschlages wurde zuerst bei der Zugabe von 1 und 3 $\mu\text{mol/l}$ des SWS1 erhöht bis auf $4,93 \pm 2,13$ % ($217,00 \pm 9,30$ mN) und dann, wurde durch die weitere kumulative Gabe eine kontinuierliche Reduzierung bis auf $-24,58 \pm 1,81$ % ($156,00 \pm 7,14$ mN) der Vorhofaktivität beobachtet. Hier wurde die EC_{50} nicht erreicht.

Tabelle 5: Tabellarische Übersicht der Versuchsergebnissen der Einwirkung von SWS1 auf die kontraktile Aktivität der Vorhofmuskulatur.

SWS1 [$\mu\text{mol/l}$]	f $\pm$ SEM [mN]	f $\pm$ SEM [%]	Zahl der Versuche n	Irrtumswarscheinlichkeit p
Kontrolle	$207,00 \pm 9,02$	$00,00 \pm 0,00$	5	-
1	$205,00 \pm 9,87$	$-0,9 \pm 1,73$	5	n.s.
3	$213,00 \pm 11,24$	$2,88 \pm 2,92$	5	n.s.
10	$217,00 \pm 9,30$	$4,93 \pm 2,13$	5	n.s.
30	$201,00 \pm 15,57$	$-2,44 \pm 3,91$	5	n.s.
100	$156,00 \pm 7,14$	$-24,58 \pm 1,81$	5	n.s.

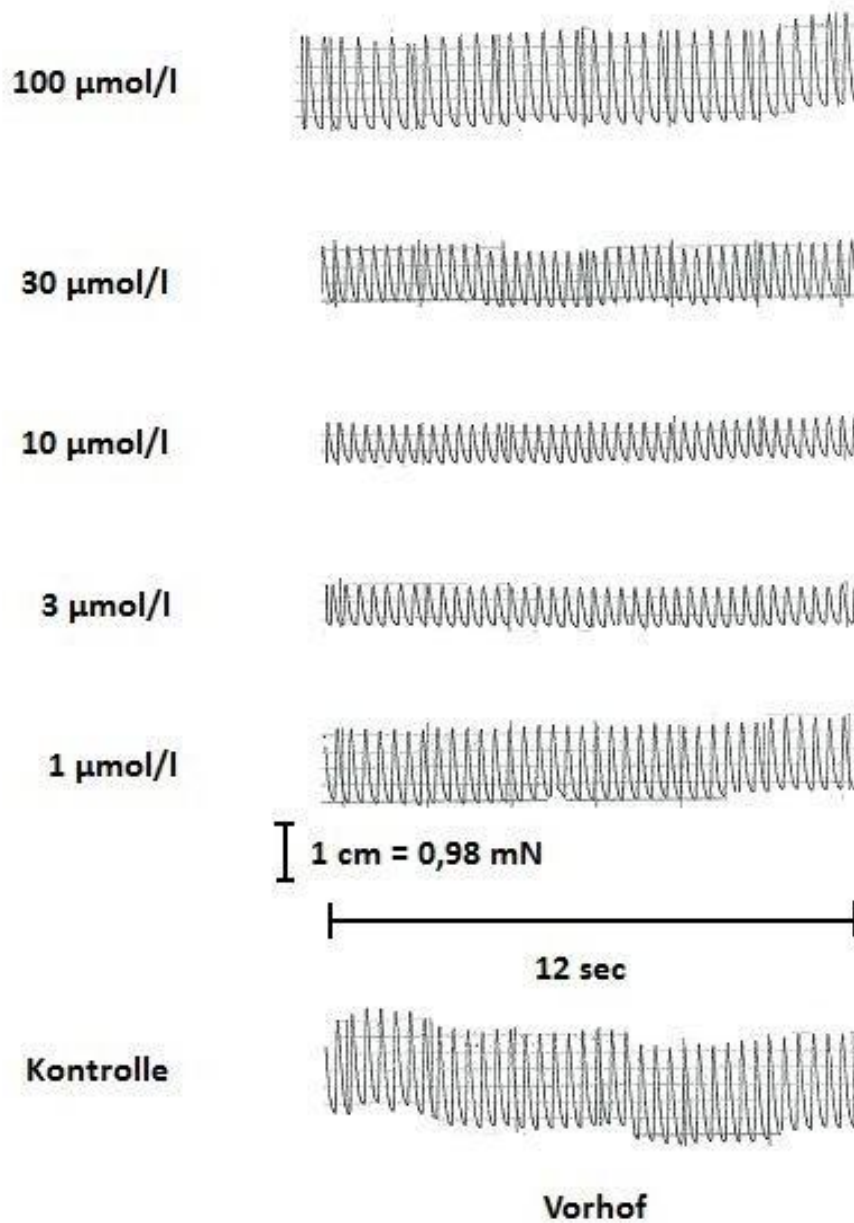
Die Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der fünf Untersuchungen, die als arithmetische Mittelwerte der Kontraktionsänderung (in mN, %) und deren Standardfehler dargestellt sind.

Abbildung 17: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von SWS1 an den Vorhof



Die Kontraktionskraftveränderungen (Y-Achse) durch die Substanzeinwirkung wurden graphisch der Konzentration (X-Achse) gegenübergestellt. Die negativ inotrope und chronotrope Wirkung zeigte sich ab der kumulativen Konzentration von 10 µmol/l. Die Analoge Beschreibung der Kurve wie bei Abbildung 15.

Abbildung 18: Die originale Registrierung eines Einzelversuches am Vorhof



Die Abbildung 18 zeigte die registrierte Messsignale bei der Kontrolle und bei der kumulativer Gabe des SWS1 durch dem Papierrecorder, wodurch die Zu/Abnahme der Amplitude zu erkennen ist.

3.1.3 Ermittlung der SWS1-Wirkung auf die kontraktile Aktivität der Musculi papillares

Der Einfluss von SWS1 auf die Konzentrationsfähigkeit am elektrisch gereizten Papillarmuskel wurde auch in fünf Versuchen geprüft. Der Kontrollwert entsprach $2,67 \pm 0,84$ mN. Es wurde anfangs eine Reduktion der Kontraktionskraft bis auf $-34,14 \pm 10,39$ % ($2,23 \pm 0,8$) beobachtet, die dann plötzlich bei der Konzentration von $3 \mu\text{mol/l}$ SWS1 stetig bis auf $-14,40 \pm 12,4$ % ($2,62 \pm 1,09$ mN) stieg und bei $30 \mu\text{mol/l}$ wiederum deutlich bis auf $-58,97 \pm 13,21$ % ($1,47 \pm 0,75$ mN) absank. Die Testsubstanz zeigte sowohl eine negative, als auch eine positiv inotrope Wirkung.

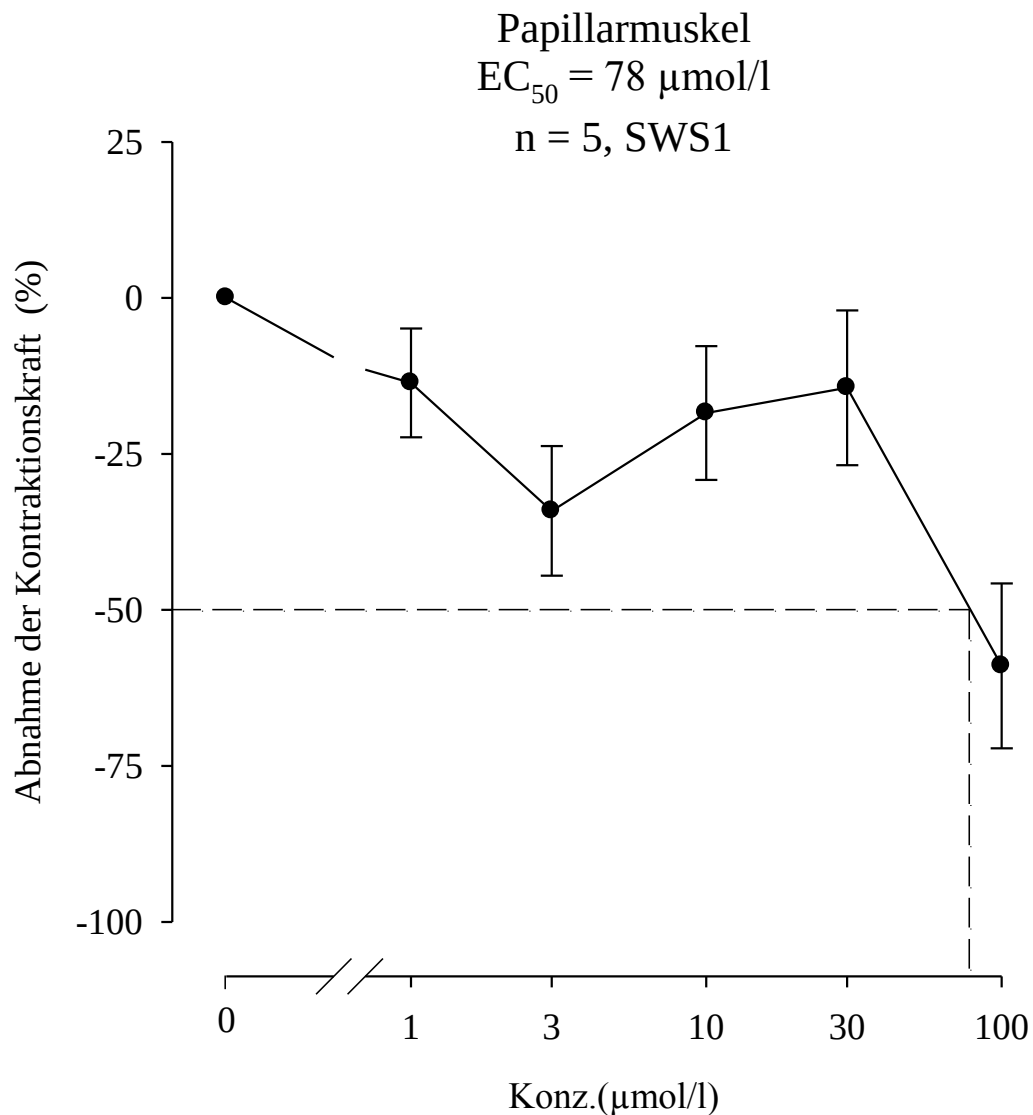
Die Substanzeffekte ermöglichen das Erreichen von EC_{50} -Wert, der entsprach $78 \mu\text{mol/l}$.

Tabelle 6: Tabellarische Übersicht der Versuchsergebnissen der Einwirkung von SWS1 auf die kontraktile Aktivität des Papillarmuskels.

SWS1 [$\mu\text{mol/l}$]	f $\pm$ SEM [mN]	f $\pm$ SEM [%]	Zahl der Versuche n	Irrtumswarscheinlichkeit p
Kontrolle	$2,67 \pm 0,84$	$00,00 \pm 0,00$	5	-
1	$2,18 \pm 0,68$	$-13,61 \pm 8,71$	5	0,005
3	$1,92 \pm 0,72$	$-34,14 \pm 10,39$	5	0,01
10	$2,23 \pm 0,8$	$-18,46 \pm 10,73$	5	0,05
30	$2,62 \pm 1,09$	$-14,40 \pm 12,40$	5	0,05
100	$1,47 \pm 0,75$	$-58,97 \pm 13,21$	5	0,01

In der Tabelle 6 konnten die Ergebnisse sämtlicher (n=5) Versuche zu erkennen, berechnet als die arithmetische Mittelwerte (in %, mN) und deren Standardfehler (SEM).

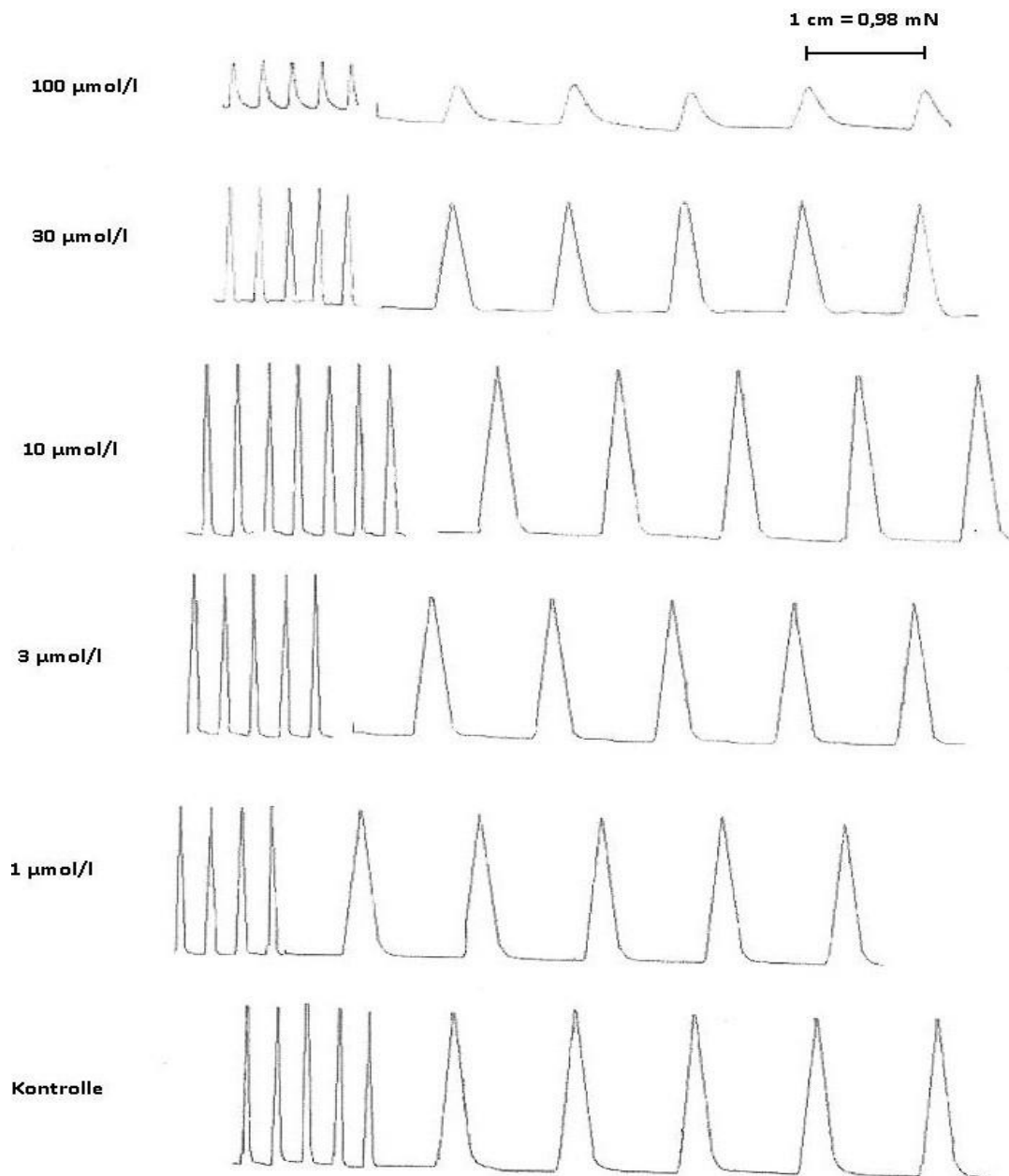
Abbildung 19: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von SWS1 am Papillarmuskel



Die eingezeichnete Wirkungskurve repräsentiert die regellosen Wirkungsschwankungen der untersuchten Substanz, die sich erst bei höherer Konzentration beruhigen.

In der graphischen Darstellung wurden die verwendeten SWS1-Konzentrationen an der X-Achse und die Kontraktionskraft des Präparates an der Y-Achse angegeben. Die Mittelwerte sind als einzelne, schwarze Punkte und die darauf befindliche Balken als Standardfehler zu erkennen.

Abbildung 20: Die originale Registrierung eines Einzelversuches am Papillarmuskel



Die Abbildung 20 zeigte die registrierte Messsignale bei der Kontrolle und bei der kumulativer Gabe des SWS1 durch dem Papierrecorder, wodurch die Zu/Abnahme der Amplitude zu erkennen ist.

3.1.4 Ermittlung der SWS1-Wirkung auf die kontraktile Aktivität der Aorta

Die Wirkungsermittlung des SWS1 auf die Änderung der Kontraktilität der Aorta wurde ebenfalls in fünf kontrollierten Versuchen geprüft. Durch die kumulative Gabe der Testsubstanz und die Steigerung der SWS1-Konzentration konnte die Veränderung der Spannung der Aorta-Gewebe beobachtet werden.

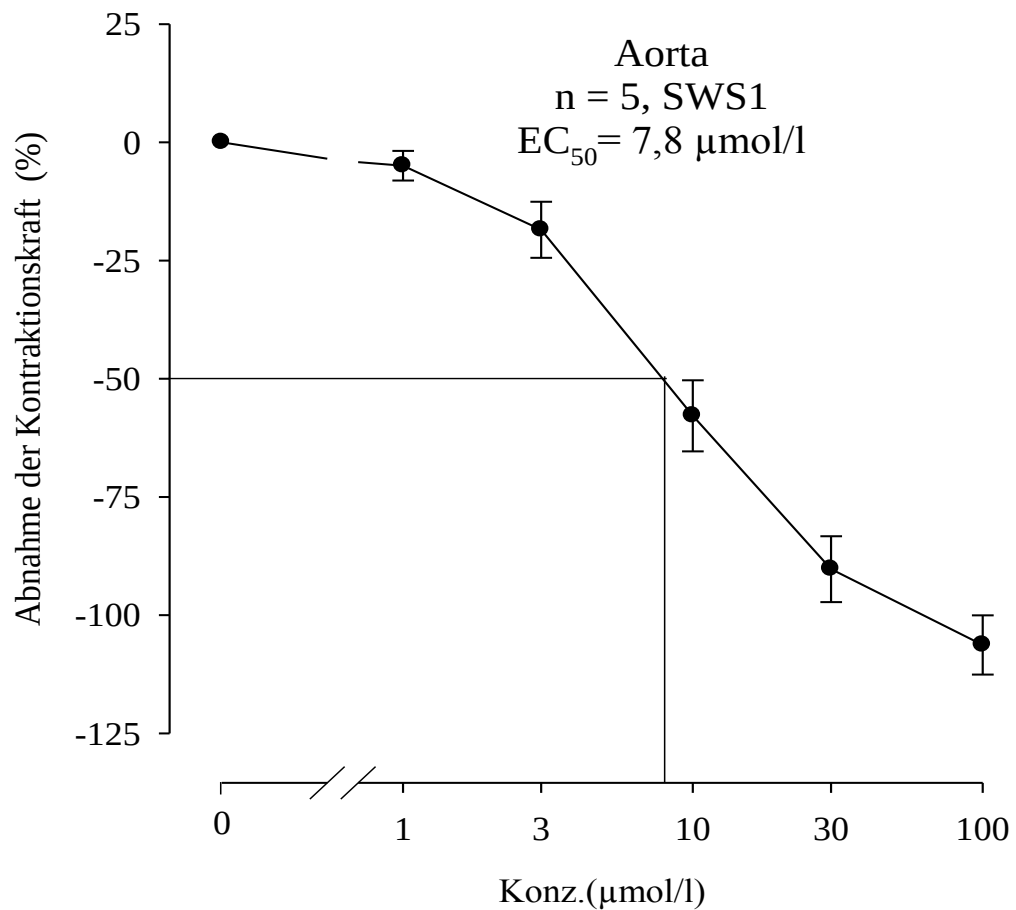
Der Kontrollwert $16,04 \pm 3,8$ mN wurde auf 0,00 % bezogen. Dadurch, aus den enthaltenen Ergebnissen, konnte die Entspannung der Aorta bis auf $-106,30 \pm 6,25$ % ($-0,44 \pm 0,65$ mN) festgestellt werden. Der EC_{50} -Wert wurde bei $7,8 \mu\text{mol/l}$ erreicht.

Tabelle 7: Tabellarische Übersicht der Versuchsergebnissen der Einwirkung von SWS1 auf die kontraktile Aktivität der Aortenmuskulatur.

SWS1 [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Zahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit p
Kontrolle	$16,04 \pm 3,8$	$00,00 \pm 0,00$	5	-
1	$15,55 \pm 4,00$	$-4,95 \pm 3,15$	5	n.s.
3	$13,59 \pm 3,75$	$-18,50 \pm 5,93$	5	0,05
10	$218,04 \pm 209,49$	$-57,85 \pm 7,51$	5	0,01
30	$2,03 \pm 1,21$	$-90,27 \pm 6,97$	5	0,001
100	$-0,44 \pm 0,65$	$-106,30 \pm 6,25$	5	0,001

In der Tabelle 7 wurden die arithmetische Mittelwerte (in mN, %) und deren Standardfehlern (SEM) der Versuchsergebnisse ausgerechnet in Bezug auf die Kontrollwerte zusammengesetzt.

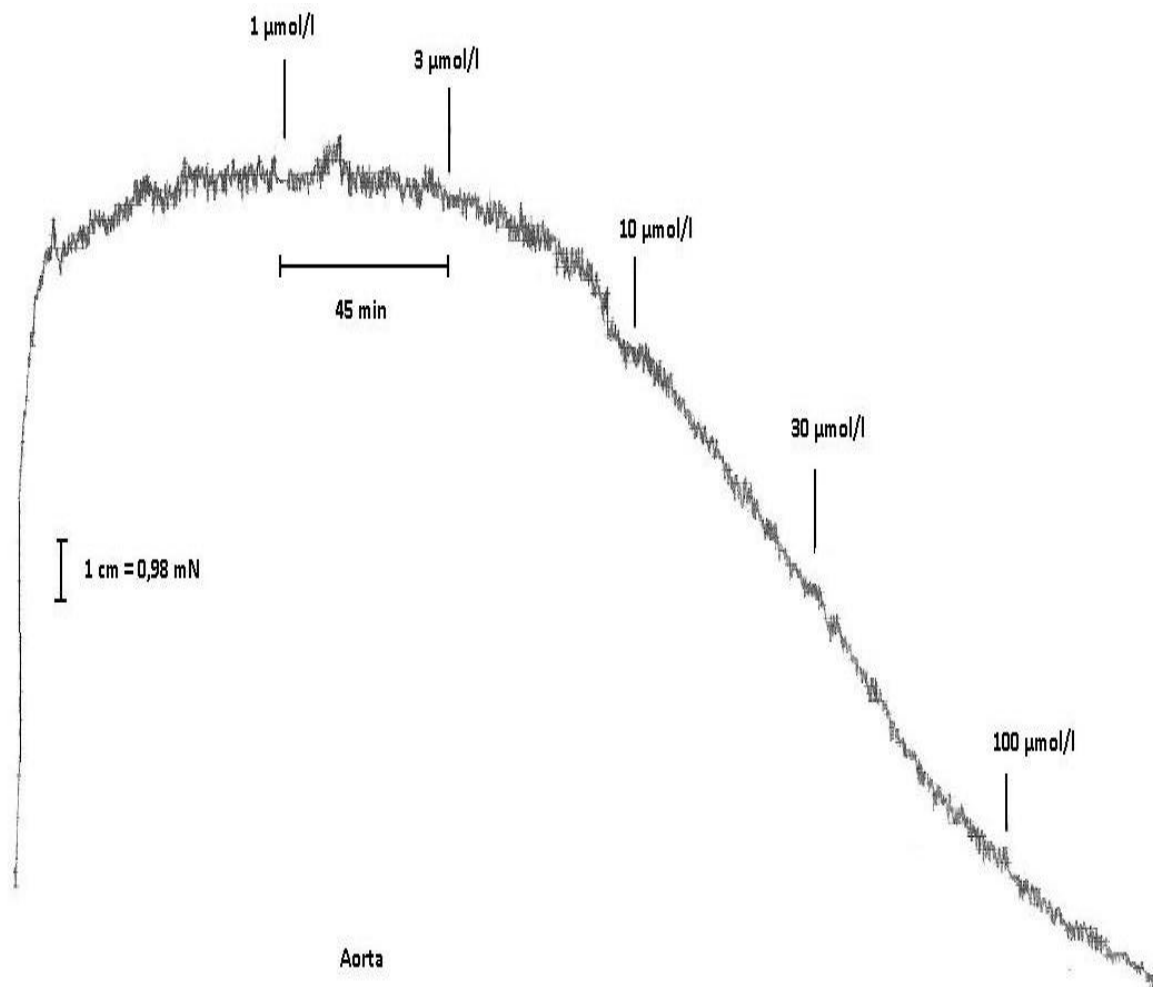
Abbildung 21: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von SWS1 an der Aorta



Die Kontraktionskraftveränderungen (auf der Y-Achse) durch die SWS1 Einwirkung wurden im Diagramm gegenüber der Konzentration (auf der X-Achse) dargestellt. Die Mittelwerte wurden als schwarze Punkte und die darauf befindlichen Balken als Standardfehler aufgetragen.

Je höher ist die Konzentration von SWS1, desto entspannter das Aorta-Gewebe ist.

Abbildung 22: Die originale Registrierung eines Einzelversuches an der Aorta



Die originale Registrierung des Schreibers wurde die Entspannung der Aorta-Gewebe betonten.

3.1.5 Ermittlung der SWS1-Wirkung auf die kontraktile Aktivität des Ileums terminalis

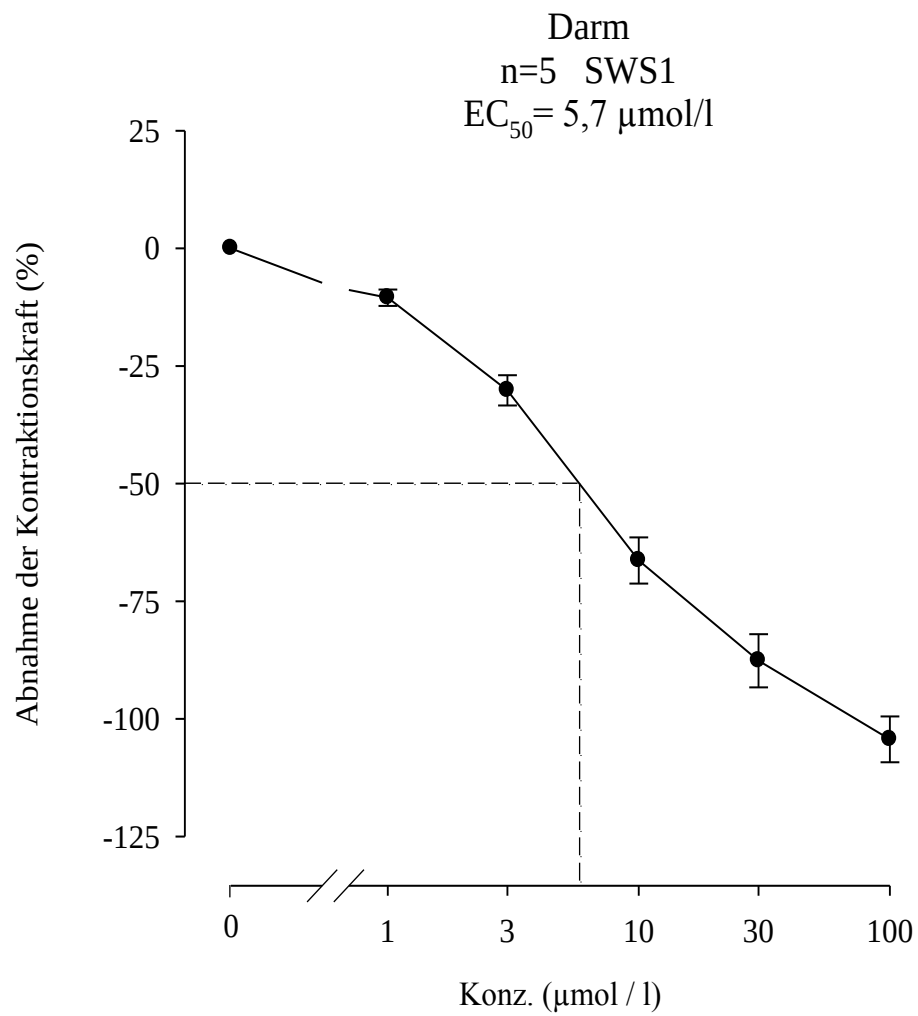
In fünf Versuchen wurde die SWS1-Wirkung auf die Tonusänderung der glatten Muskulatur des Dünndarms beurteilt. Die Abweichungen von dem Kontrollwert $12,53 \pm 1,71$ mN, der auch als 0,00 % angenommen wurde, wurden sehr deutlich. Der Endwert lag bei $-104,36 \pm 4,86$ % ($-0,52 \pm 0,54$ mN). Durch das Analyseergebnis konnte die starke Darmrelaxation erkannt werden. Es konnte auch der EC_{50} -Wert bei $5,7 \mu\text{mol/l}$ ermittelt werden.

Tabelle 8: Tabellarische Übersicht der Versuchsergebnissen der Einwirkung von SWS1 auf die kontraktile Aktivität der Darmmuskulatur.

SWS1 [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	$f_c \pm \text{SEM}$ [%]	Zahl der Versuche n	Irrtumswarscheinlichkeit p
Kontrolle	$12,53 \pm 1,71$	$00,00 \pm 0,00$	5	-
1	$11,22 \pm 1,55$	$-10,49 \pm 1,74$	5	0,05
3	$8,9 \pm 1,51$	$-30,18 \pm 3,21$	5	0,01
10	$5,14 \pm 1,21$	$-66,34 \pm 4,90$	5	0,001
30	$10,95 \pm 9,01$	$-87,64 \pm 5,65$	5	0,001
100	$-0,52 \pm 0,54$	$-104,36 \pm 4,86$	5	0,001

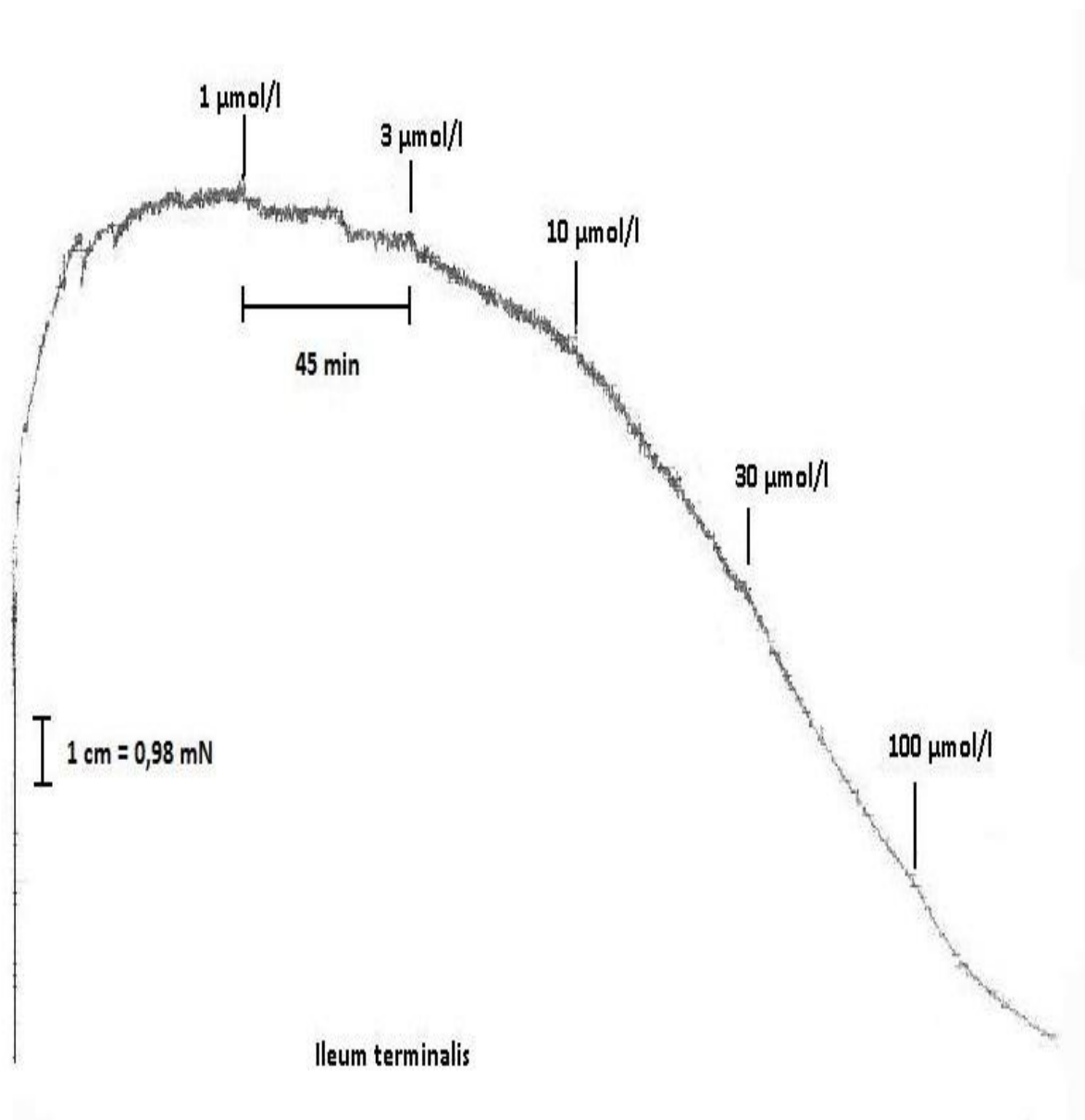
In der Tabelle 8 wurden die Resultate der fünf Untersuchungen als arithmetische Mittelwerte (in %, mN) und deren Standardfehlern (SEM) zusammengestellt.

Abbildung 23: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von SWS1 am Darm



An der Wirkungskurve konnte die deutliche Tonusabnahme des Darms erkannt werden.

Abbildung 24: Die originale Registrierung eines Einzelversuches am Darm



Der SWS1-Einfluss auf dem terminalen Ileum bewirkte eine Relaxation der Darmmuskulatur.

3.2 Aufklärung des SWS1-Wirkmechanismus mit Antagonisten

In den folgenden Versuchen wurden die möglichen Wirkmechanismen der Testsubstanz in Kombination mit Antagonisten, die im Kapitel 2.5.2 beschrieben wurden, analysiert. Die Analyse erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen von SWS1 und den Antagonisten am terminalen Ileum und an der Aorta.

3.2.1 Analyse des Wirkmechanismus von SWS1 mit Glibenclamid am Darm

Die Aufklärung des Wirkmechanismus am Darm wurde mit zwei Konzentrationen (30 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$) von Glibenclamid (siehe Kap. 2.5.2) durchgeführt. Es wurde analysiert, ob SWS1 die ATP-abhängigen Kaliumkanäle öffnen konnte, nachdem der Antagonist sie verschlossen hat.

Im Gegensatz zu vorigen Versuchen wurden hier jeweils drei Untersuchungen erfolgen. Zuerst wurde der Darm der Wirkung von Glibenclamid für 45 Minuten ausgesetzt, danach wurde SWS1 eingespritzt. Nach der 45 Minuten lange Einwirkungsphase von der Testsubstanz wurde das Versuch beendet.

Tabelle 9: Tabellarische Darstellung der Einwirkung von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid mit 6 $\mu\text{mol/l}$ SWS1 auf das Kontraktionsverhalten der glatten Darmmuskulatur.

Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	Zahl der Versuche n	Irrtumswarscheinlichkeit p
Kontrolle	$13,09 \pm 2,42$	3	-
30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid	$10,35 \pm 2,08$	3	-
+ 6 $\mu\text{mol/l}$ SWS1	$7,77 \pm 2,20$	3	n.s.

Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der Einwirkung von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid mit 6 $\mu\text{mol/l}$ SWS1 auf das Kontraktionsverhalten der glatten Darmmuskulatur.

Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	Zahl der Versuche n	Irrtumswarscheinlichkeit p
Kontrolle	$9,76 \pm 0,44$	3	-
100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid	$5,48 \pm 0,09$	3	-
+ 6 $\mu\text{mol/l}$ SWS1	$3,54 \pm 0,22$	3	0,05

Die Tabelle 9 und 10 präsentieren die arithmetischen Mittelwerte in mN und deren jeweiligen Standardfehler der drei durchgeführten Experimenten.

Abbildung 25: Bildliche Schilderung der Einwirkung von Glibenclamid alleine und in Verbindung mit SWS1 auf das Kontraktionsverhalten der glatten Darmmuskulatur.

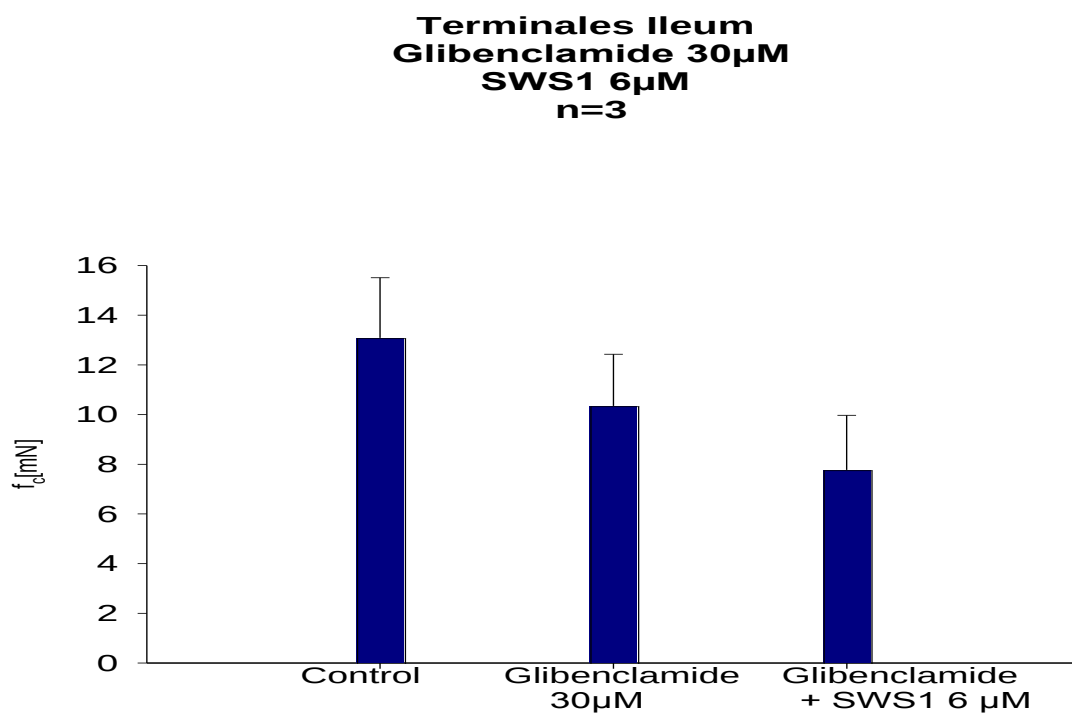
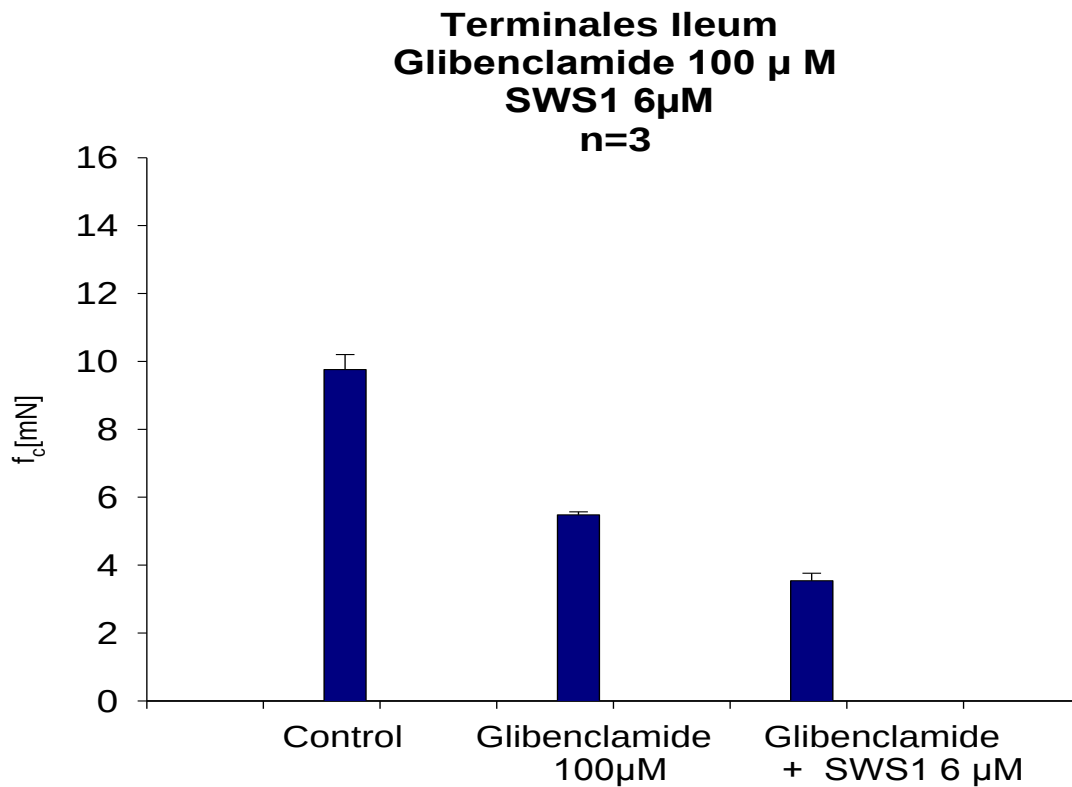


Abbildung 26: Bildliche Schilderung der Einwirkung von Glibenclamid alleine und in Verbindung mit SWS1 auf das Kontraktionsverhalten der glatten Darmmuskulatur.



Mit dem Balkendiagramm (Abbildung 25 und 26) sollte gezeigt werden, wie sich die kontraktile Aktivität mit der Zugabe von Glibenclamid aber auch in der Gegenwart von der Mischung (Antagonist + SWS1) verändert hat.

Auf der X-Achse wurde die Konzentration (μ mol) von zugegebenen Substanzen aufgetragen. Die Y-Achse präsentiert die Kontraktionskraft (mN) des verwendeten Präparates. Die einzelnen Balken repräsentieren den Mittelwert dreier durchgeführten Experimenten. Die Standardabweichung ist sichtbar in Form von einer dünnen Linie oben auf dem Balken.

Abbildung 27: Die originale Registrierung eines Einzelversuches für die Wirkungsauflärung am Darm mit 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid

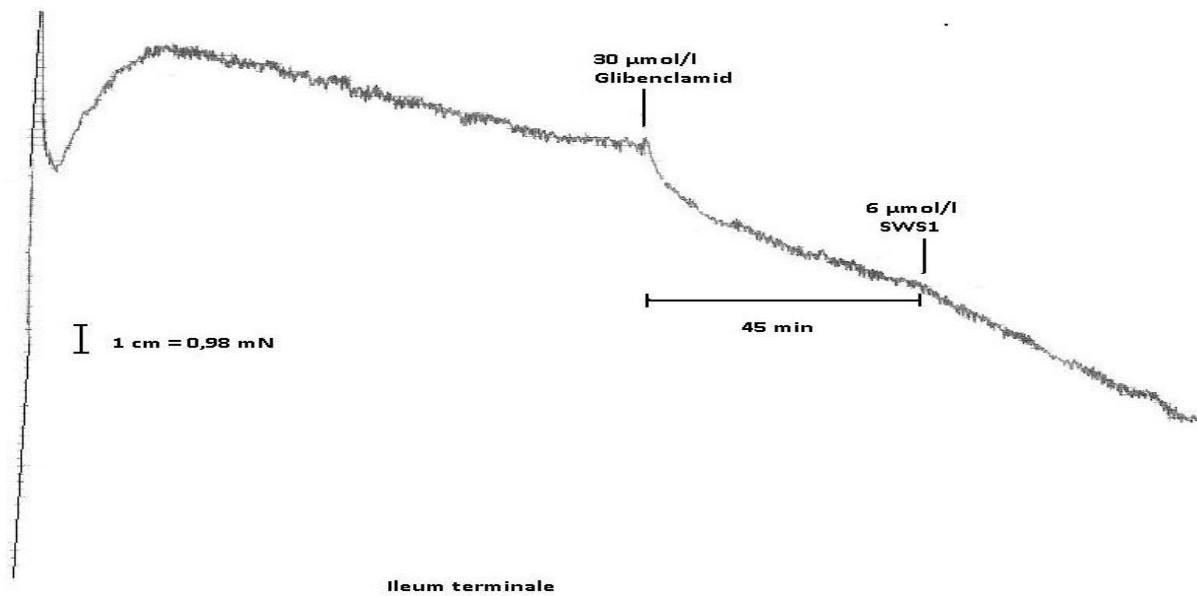
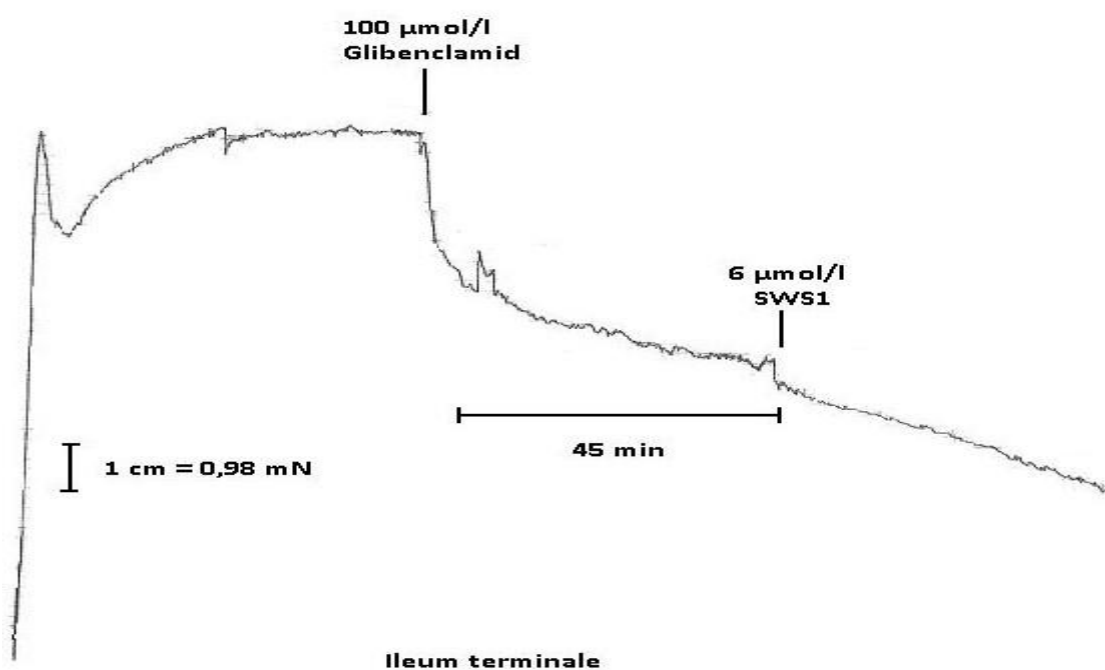


Abbildung 28: Die originale Registrierung eines Einzelversuches für die Wirkungsauflärung am Darm mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid



3.2.2 Analyse des Wirkmechanismus von SWS1 mit Glibenclamid an der Aorta

Die Aufklärung des Wirkmechanismus an der Aorta verläuft analog der Prüfung am Darm (Kap. 3.2.1). Es wurden auch 3 Versuche mit zwei verschiedenen Konzentrationen von Glibenclamid realisiert.

Tabelle 11: Tabellarische Darstellung der Einwirkung von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid mit 8 $\mu\text{mol/l}$ SWS1 auf das Kontraktionsverhalten der glatten Aortenmuskulatur.

Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	Zahl der Versuche n	Irrtumswarscheinlichkeit p
Kontrolle	$10,22 \pm 1,50$	3	-
30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid	$9,40 \pm 1,22$	3	-
+ 8 $\mu\text{mol/l}$ SWS1	$3,85 \pm 0,32$	3	0,05

Tabelle12: Tabellarische Darstellung der Einwirkung von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid mit 8 $\mu\text{mol/l}$ SWS1 auf das Kontraktionsverhalten der glatten Aortenmuskulatur.

Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	Zahl der Versuche n	Irrtumswarscheinlichkeit p
Kontrolle	$11,33 \pm 2,06$	3	-
100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid	$9,82 \pm 1,91$	3	-
+ 8 $\mu\text{mol/l}$ SWS1	$4,96 \pm 0,58$	3	0,05

Die Tabellen 11 und 12 präsentieren die arithmetischen Mittelwerte in mN und deren jeweiligen Standardfehler der drei durchgeführten Experimente.

Abbildung 29: Bildliche Schilderung der Einwirkung von Glibenclamid alleine und in Verbindung mit SWS1 auf das Kontraktionsverhalten der glatten Aortenmuskulatur.

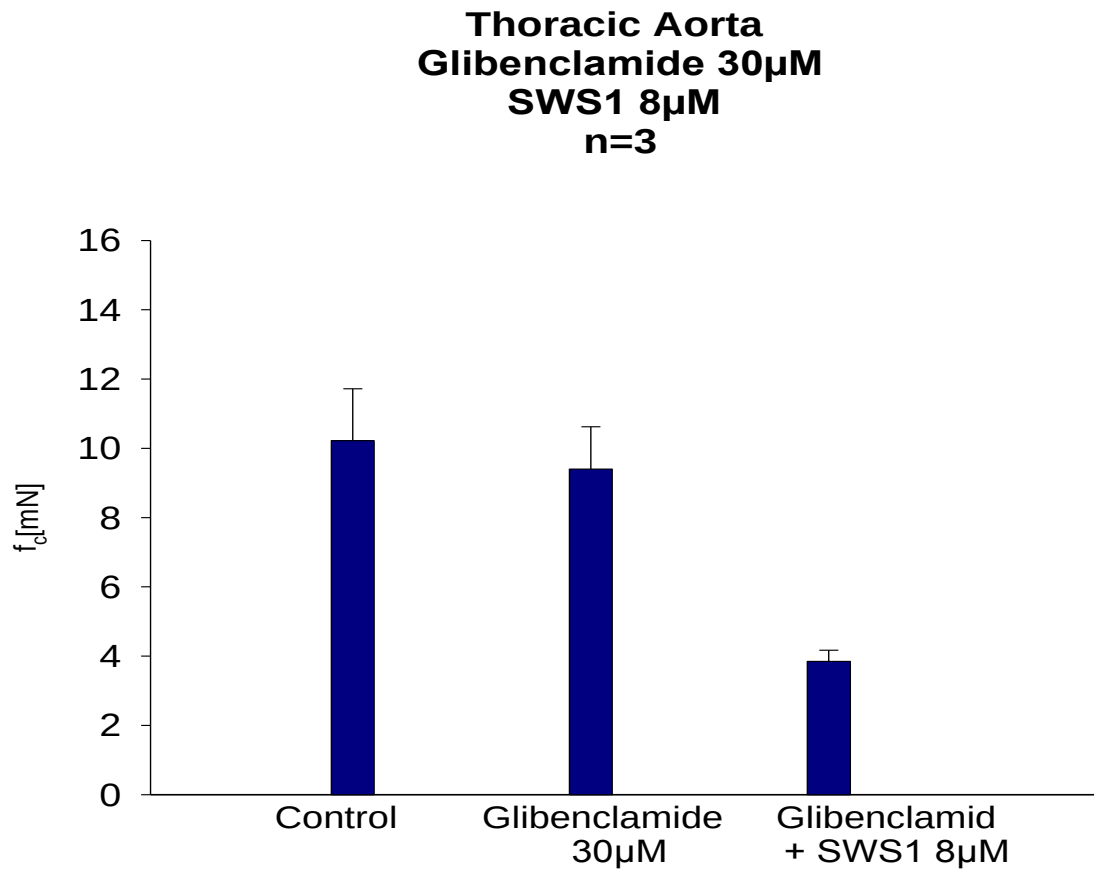
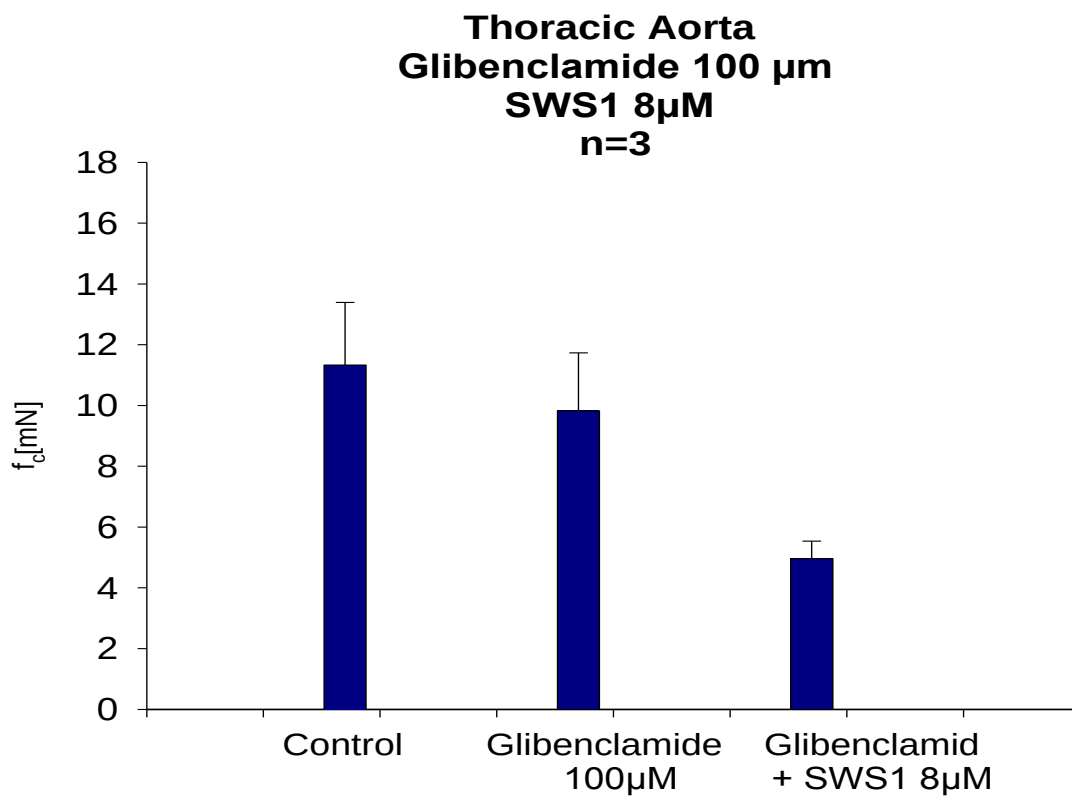


Abbildung 30: Bildliche Schilderung der Einwirkung von Glibenclamid alleine und in Verbindung mit SWS1 auf das Kontraktionsverhalten der glatten Aortenmuskulatur.



Mit dem Balkendiagramm (Abbildung 23 und 24) sollte gezeigt werden, wie sich die kontraktile Aktivität mit der Zugabe von Glibenclamid aber auch in der Gegenwart von der Mischung(Antagonist + SWS1) verändert hat.

Auf der X-Achse wurde die Konzentration (μ mol) von zugegebenen Substanzen aufgetragen. Die Y-Achse präsentiert die Kontraktionskraft (mN) des verwendeten Präparates. Die einzelnen Balken repräsentieren den Mittelwert dreier durchgeführten Experimenten. Die Standardabweichung ist sichtbar in Form von einer dünnen Linie oben auf dem Balken.

Abbildung 31: Die originale Registrierung eines Einzelversuches für die Wirkungsauflärung an der Aorta mit 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid

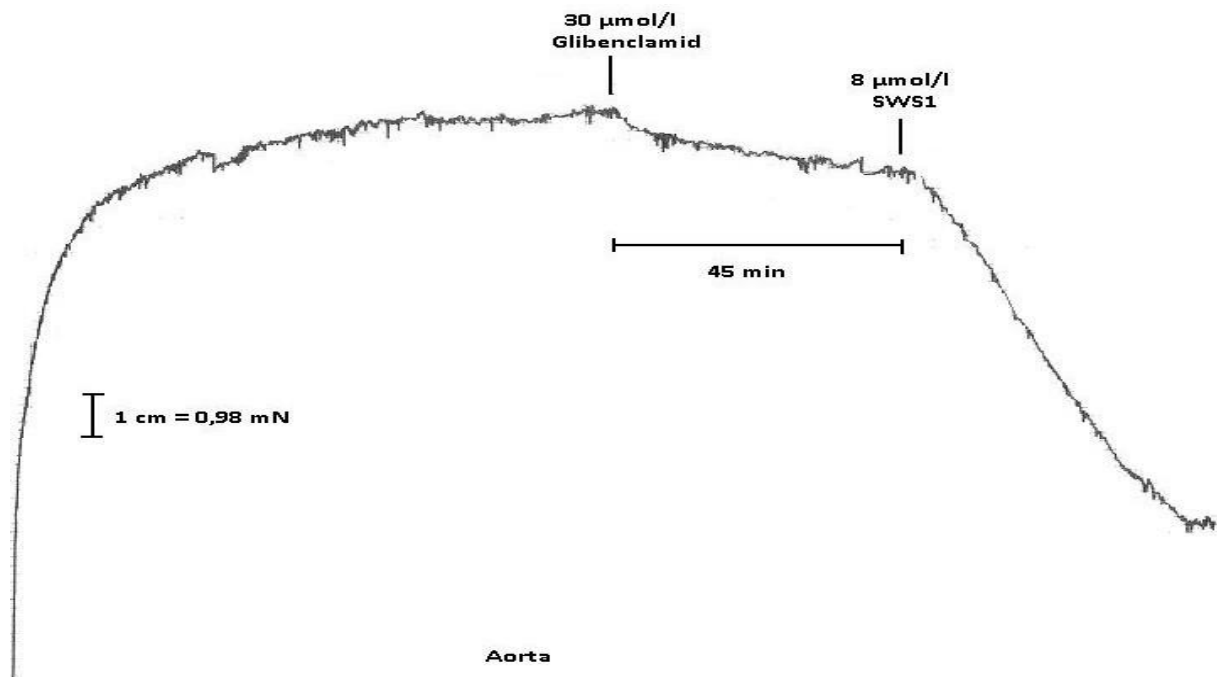
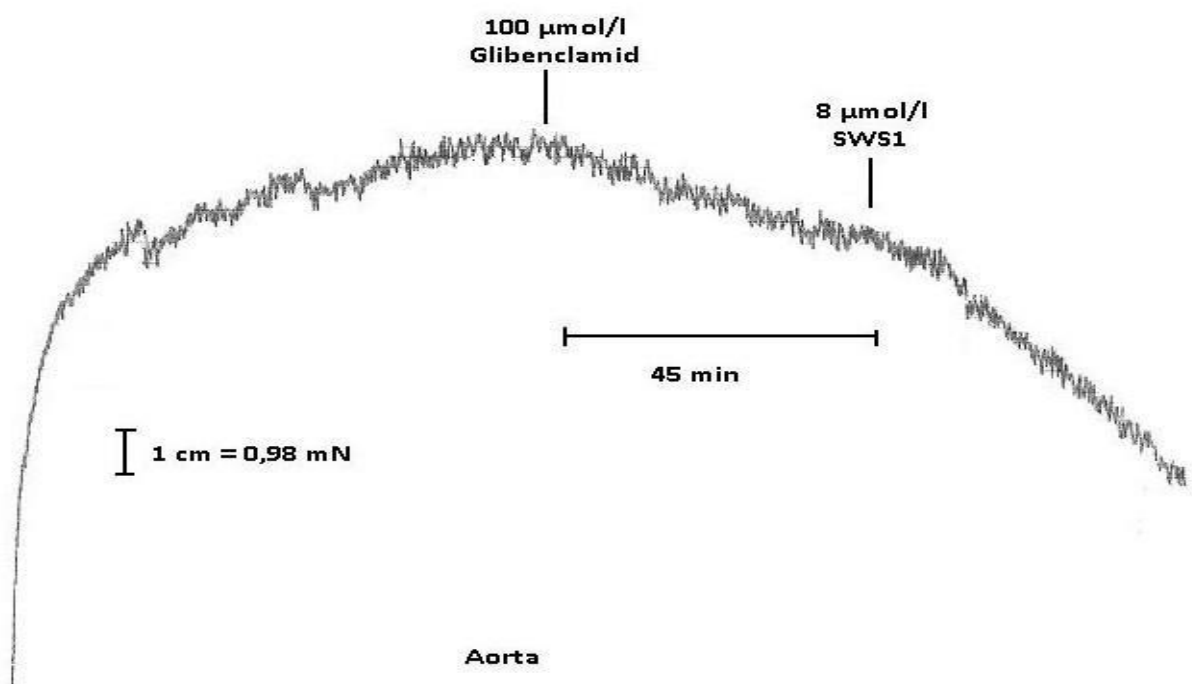


Abbildung 32: Die originale Registrierung eines Einzelversuches für die Wirkungsauflärung an der Aorta mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid



3.2.3 Analyse des Wirkmechanismus von SWS1 mit Nitro-L-Arginin am Darm

Im diesem Experiment wurde eine Überprüfung der SWS1-Wirkung im Vergleich mit Nitro-L-Arginin (siehe Kap. 2.5.2) untersucht. Der Antagonist löst eine Hemmung der NO-Synthase und dadurch die Unterbindung der endothelabhängigen Vasodilatation durch Stickstoffmonoxid-Bildung aus. Durch eine Zugabe von SWS1 wurde ermittelt, ob die Testsubstanz die Wirkung von Nitro-L-Arginin aufheben oder nicht aufheben kann.

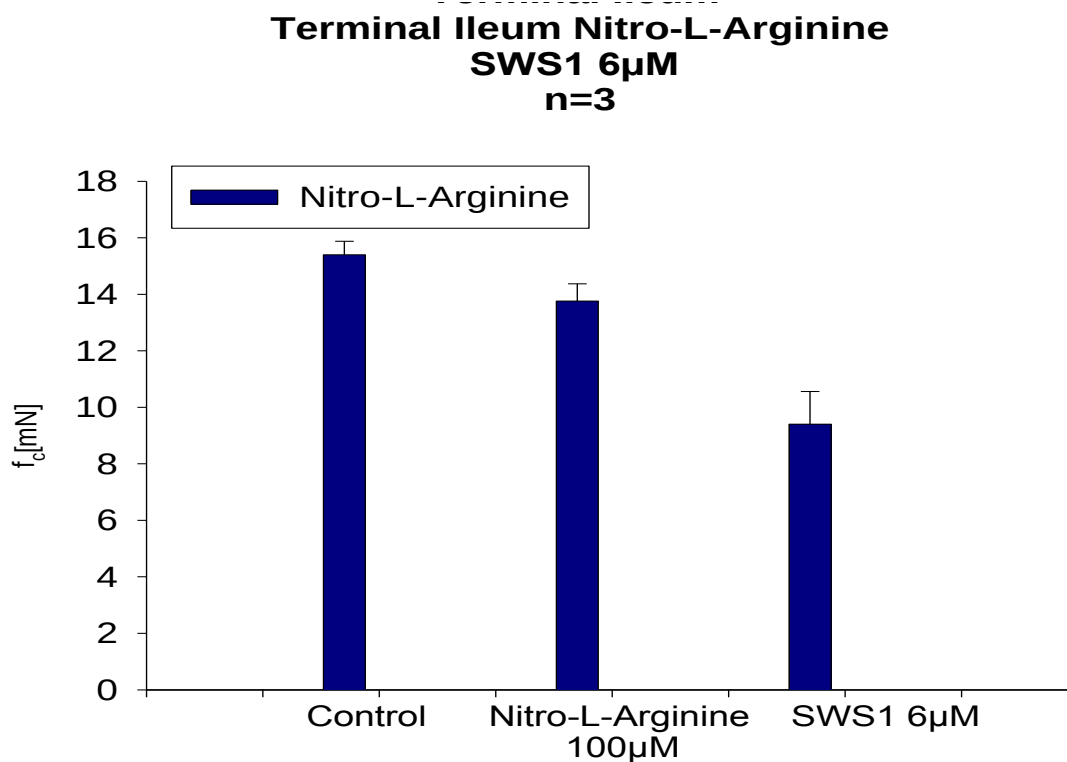
Das Experiment wurde analog zu den Versuchen am Darm (Kap. 3.2.1) durchgeführt. Es wurde nur eine Konzentration sowohl des Agonists (100 μmol) als auch SWS1 (6 μmol) eingesetzt.

Tabelle 13: Tabellarische Darstellung der Einwirkung von 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin mit 8 $\mu\text{mol/l}$ SWS1 auf das Kontraktionsverhalten der glatten Darmmuskulatur.

Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	Zahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit p
Kontrolle	$15,40 \pm 0,47$	3	-
100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin	$13,76 \pm 0,61$	3	-
+ 6 $\mu\text{mol/l}$ SWS1	$9,4 \pm 1,16$	3	0,05

Die Tabelle 13 liefert die Informationen über den arithmetischen Mittelwerten in mN und deren jeweiligen Standardfehlern der drei durchgeführten Experimente.

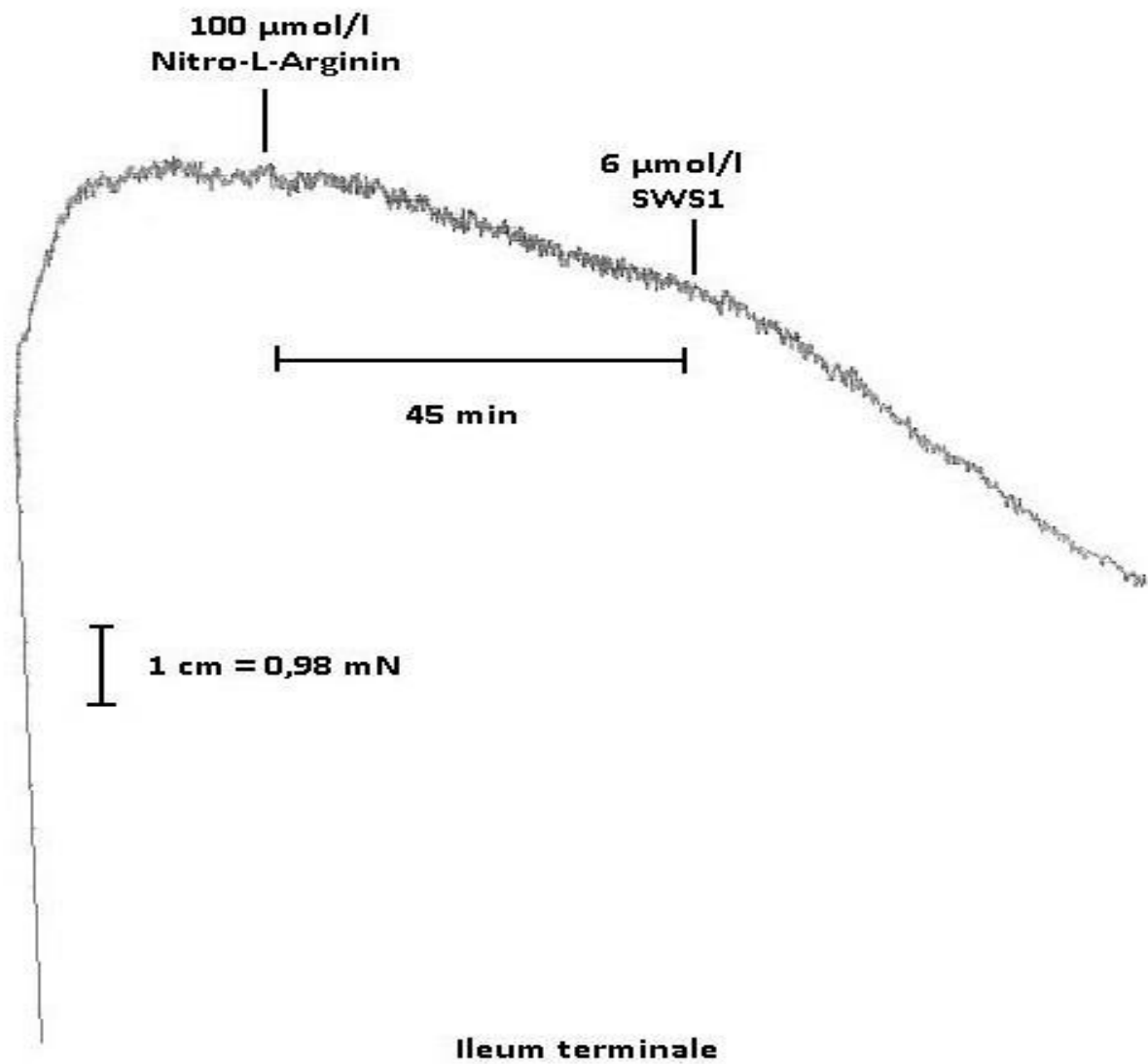
Abbildung 33: Bildliche Schilderung der Einwirkung von Nitro-L-Arginin alleine und in Verbindung mit SWS1 auf das Kontraktionsverhalten der glatten Darmmuskulatur.



Mit dem Balkendiagramm (Abbildung 33) sollte gezeigt werden, wie sich wurde die kontraktile Aktivität mit der Zugabe von Nitro-L-Arginin aber auch in der Gegenwart von der Mischung(Antagonist + SWS1) auswirkt.

Auf der X-Achse wurde die Konzentration (μ mol) der zugegebenen Substanzen aufgetragen. Die Y-Achse präsentiert die Kontraktionskraft (mN) des verwendeten Präparates. Die einzelnen Balken repräsentieren den Mittelwert dreier durchgeführten Experimenten. Die Standardabweichung ist sichtbar in Form von einer dünnen Linie oben auf dem Balken.

Abbildung 34: Die originale Registrierung eines Einzelversuches für die
Wirkungsaufklärung am Darm mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin



3.2.4 Analyse des Wirkmechanismus von SWS1 mit Nitro-L-Arginin an der Aorta

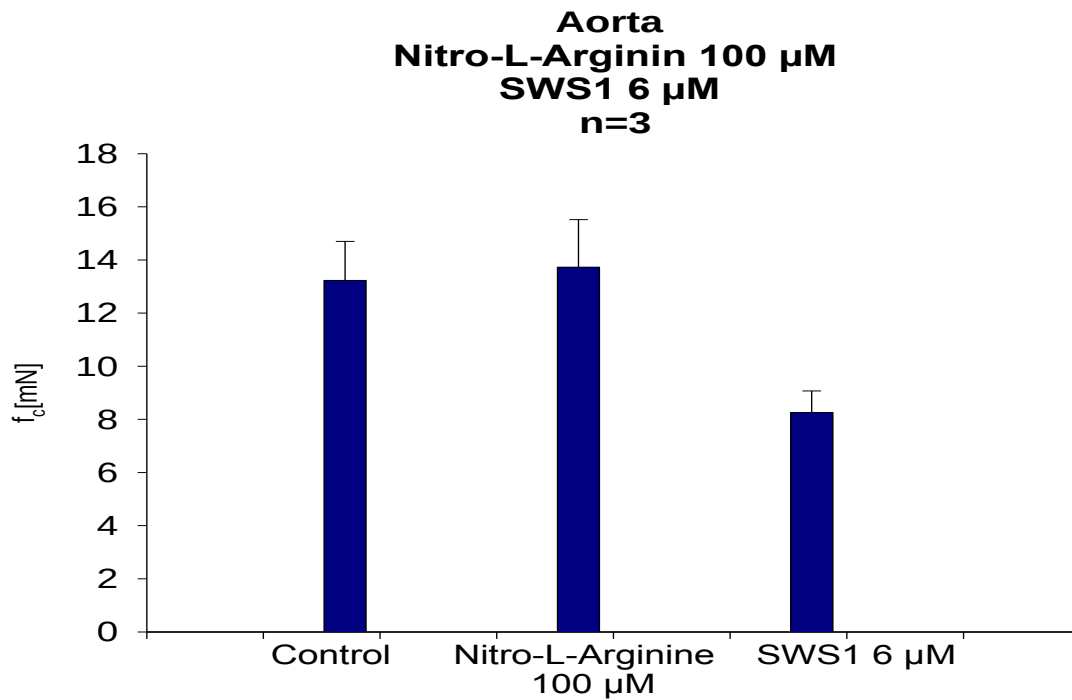
Das Experiment wurde analog zu dem Versuch am Darm (Kap. 3.2.3) organisiert. Zwischen den zwei Versuchen gab es Differenzen in der Konzentration von SWS1 (8µmol/l) und den verwendeten Präparat. Hier wurden nämlich die isolierten Aortenringe verwendet.

Tabelle 14: Tabellarische Darstellung der Einwirkung von 100 µmol/l Nitro-L-Arginin mit 8µmol/l SWS1 auf das Kontraktionsverhalten der glatten Aortenmuskulatur.

Konzentration [µmol/l]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	Zahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit p
Kontrolle	13,23 ± 1,46	3	-
100 µmol/l Nitro-L-Arginin	13,73 ± 1,79	3	-
+ 8 µmol/l SWS1	8,26 ± 0,81	3	n.s.

Die Tabelle 14 liefert die Informationen über den arithmetischen Mittelwerten in mN und deren jeweiligen Standardfehlern der drei durchgeführten Experimente.

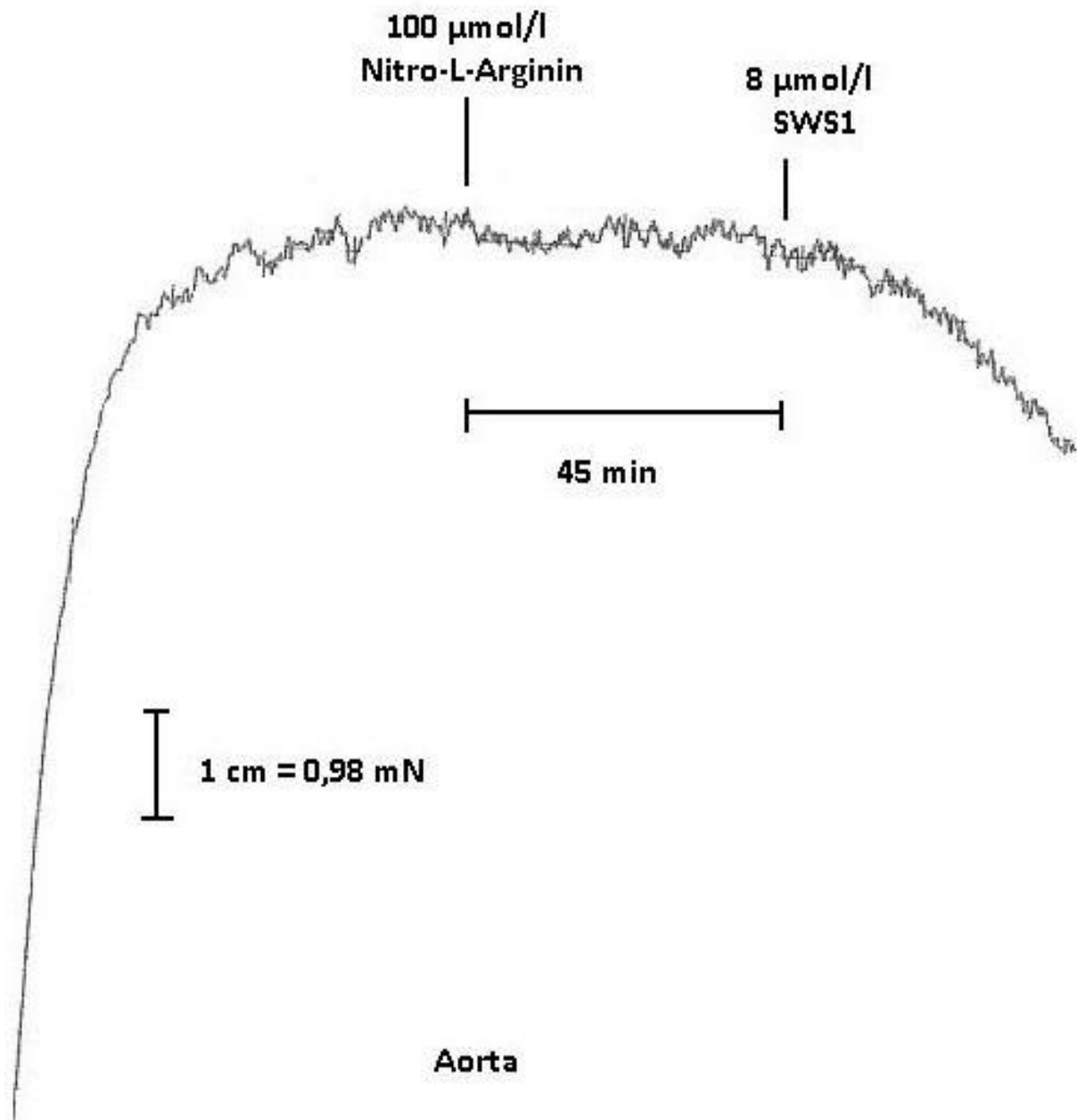
Abbildung 35: Bildliche Schilderung der Einwirkung von Nitro-L-Arginin alleine und in Verbindung mit SWS1 auf das Kontraktionsverhalten der glatten Aortenmuskulatur.



Mit dem Balkendiagramm (Abbildung 35) sollte gezeigt werden, wie sich die kontraktile Aktivität mit der Zugabe von Nitro-L-Arginin aber auch in der Gegenwart von der Mischung (Antagonist + SWS1) verändert.

Auf der X-Achse wurde die Konzentration (μ mol) von zugegebenen Substanzen aufgetragen. Die Y-Achse präsentiert die Kontraktionskraft (mN) des verwendeten Präparates. Die einzelnen Balken repräsentieren den Mittelwert dreier durchgeführten Experimenten. Die Standardabweichung ist sichtbar in Form von einer dünnen Linie oben auf den Balken.

Abbildung 36: Die originale Registrierung eines Einzelversuches für die Wirkungsauflklärung an der Aorta mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin



3.3 Aufklärung des SWS1-Wirkmechanismus mit Agonisten

Die Aufdeckung der Wirkung von SWS1 wurde nicht nur mit den Antagonisten, aber auch mit den Agonisten analysiert. Es wurden hier drei Substanzen mit verschiedenen Wirkmechanismen angewendet, um zu beobachten, ob dessen Wirkung mit SWS1 agonisiert oder antagonisiert wurde.

3.3.1 Analyse des Wirkmechanismus von SWS1 mit Phenylephrin am Darm

Der Verlauf des Experiments wurde im Kapitel 2.6.6.1 ausführlich beschrieben. Die Phenylephrin (siehe Kap. 2.5.3) gehört zu den vasokonstriktorisch wirkenden α -Sympathomimetika. Die Aufdeckung des Wirkmechanismus von SWS1 beruhte auf der Kombination mit dem Agonist, um zu nachweisen, ob die Wirkung von Phenylephrin potenziert oder aufgehoben wird.

Im diesem Fall wurde mit einer Verdünnungsreihe von Phenylephrin gearbeitet, die nach der Reihe eingespritzt wurden. Es wurde mit der niedrigsten Konzentration anfangen. Die Testsubstanz wurde in Konzentration von 6 $\mu\text{mol/l}$ angewendet.

Tabelle 15: Tabellarische Darstellung der Einwirkung von Phenylephrin auf das Kontraktionsverhalten der glatten Darmmuskulatur.

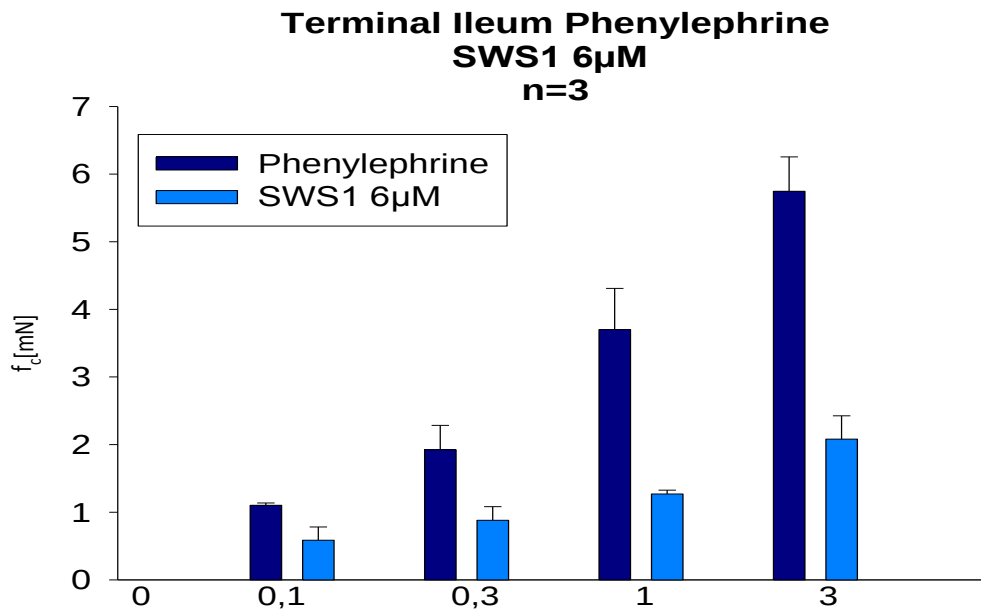
Kontrolle mit Phenylephrin [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	Zahl der Versuche n
0,1	$1,10 \pm 0,03$	3
0,3	$1,92 \pm 0,36$	3
1	$3,70 \pm 0,60$	3
3	$5,74 \pm 0,50$	3

Tabelle 16: Tabellarische Darstellung der Einwirkung von Phenylephrin mit 6 $\mu\text{mol/l}$ SWS1 auf das Kontraktionsverhalten der glatten Darmmuskulatur.

SWS1 mit Phenylephrin [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	Zahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit p
0,1	$0,58 \pm 0,19$	3	0,05
0,3	$0,88 \pm 0,20$	3	0,05
1	$1,27 \pm 0,05$	3	0,05
3	$1,27 \pm 0,34$	3	0,05

Die Tabellen 15 und 16 liefern die Informationen über den arithmetischen Mittelwerten in mN und deren jeweiligen Standardfehlern der drei durchgeführten Experimente.

Abbildung 37: Bildliche Schilderung der Einwirkung von Phenylephrin alleine und in Verbindung mit SWS1 auf das Kontraktionsverhalten der glatten Darmmuskulatur.

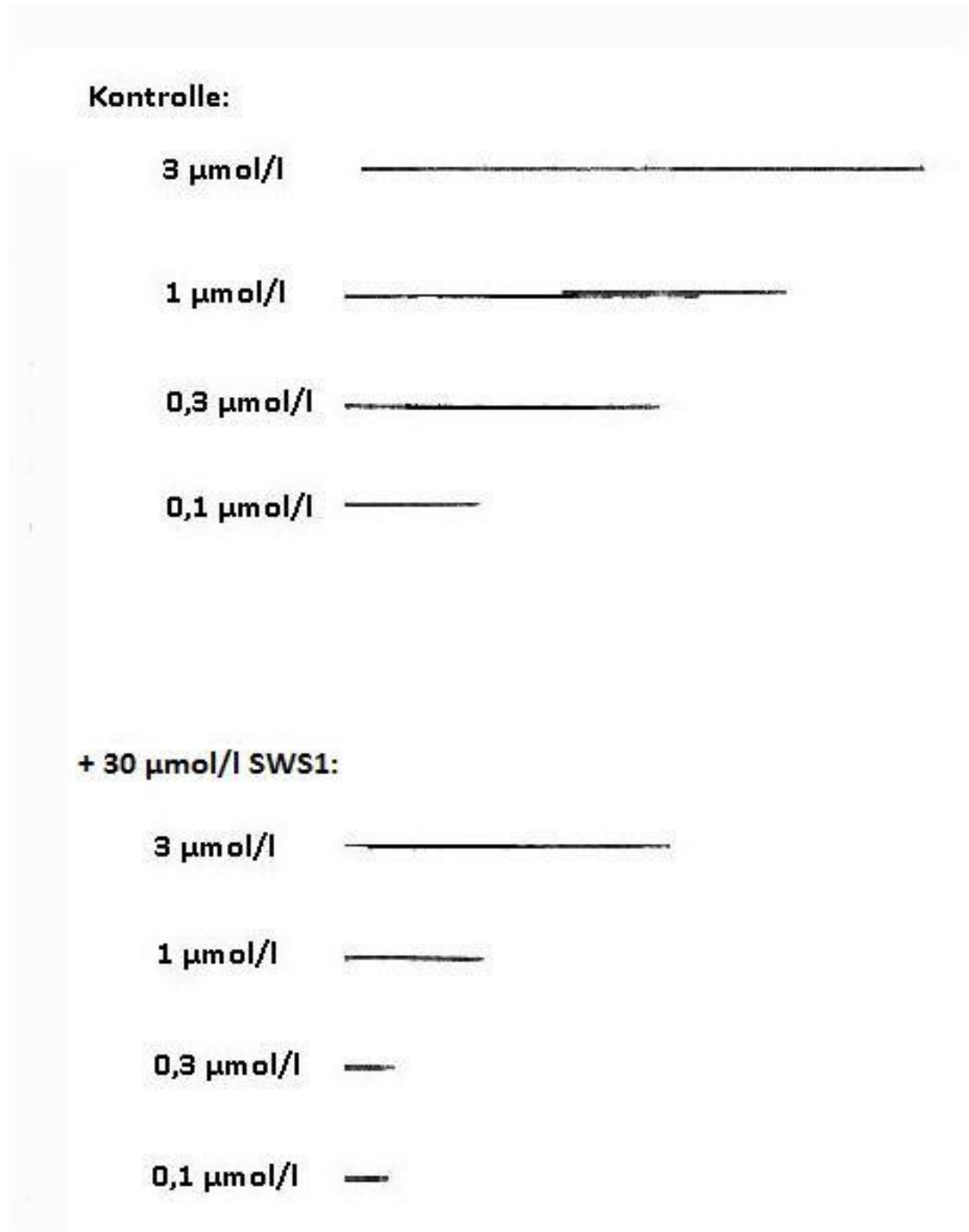


Mit dem Balkendiagramm (Abbildung 31) sollte gezeigt werden, wie sich die kontraktile Aktivität des Präparats mit der Zugabe von Phenylephrin aber auch in der Gegenwart von der Mischung(Agonist + SWS1) verändert.

Auf der X-Achse wurde die Konzentration (μ mol) von zugegebenen Substanzen aufgetragen. Die Y-Achse präsentiert die Kontraktionskraft (mN) des verwendeten Präparates. Die dunkel blaue Säulen repräsentieren den Mittelwert der Kontrolle (100%) und die hell blauen Säulen stehen für die Mischung aus Agonist und SWS1 dreier durchgeführten Experimenten.

Die Standardabweichung ist sichtbar in Form von einer dünnen Linie oben auf den Säulen.

Abbildung 38: Die originale Registrierung eines Einzelversuches für die Wirkungsauflärung am Darm mit Phenylephrin



3.3.2 Analyse des Wirkmechanismus von SWS1 mit Phenylephrin an der Aorta

Das folgende Experiment wurde analog zu vorherigem Experiment im Kapitel 3.3.1 realisiert, mit der Differenz, dass hier ein anderes Gewebe eingesetzt wurde, nämlich die Aorta. Die SWS1-Konzentration betrug 8 $\mu\text{mol/l}$.

Tabelle 17: Tabellarische Darstellung der Einwirkung von Phenylephrin auf das Kontraktionsverhalten der glatten Aortenmuskulatur.

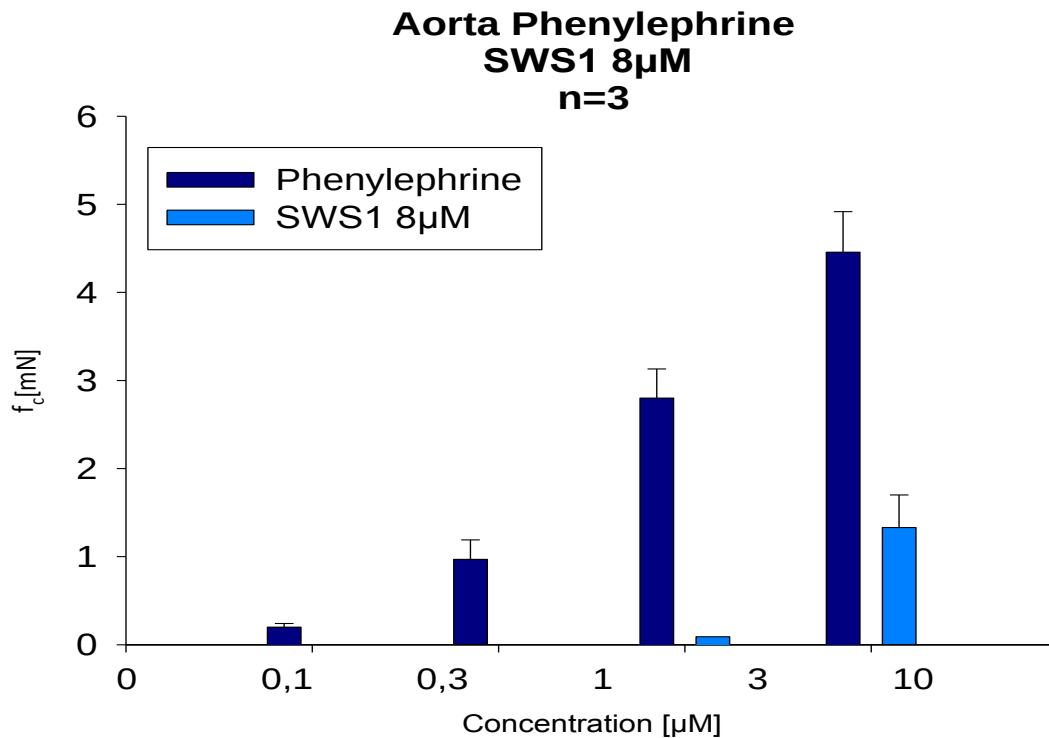
Kontrolle mit Phenylephrin [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	Zahl der Versuche n
0,1	$0,20 \pm 0,04$	3
0,3	$0,97 \pm 0,22$	3
1	$2,80 \pm 0,33$	3
3	$4,45 \pm 0,46$	3

Tabelle 18: Tabellarische Darstellung der Einwirkung von Phenylephrin mit 8 $\mu\text{mol/l}$ SWS1 auf das Kontraktionsverhalten der glatten Aortenmuskulatur.

SWS1 mit Phenylephrin [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	Zahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit p
0,1	$0,00 \pm 0,00$	3	0,05
0,3	$0,00 \pm 0,00$	3	0,05
1	$0,09 \pm 7,60$	3	0,05
3	$1,33 \pm 0,37$	3	0,05

Die Tabellen 17 und 18 liefern die Informationen über den arithmetischen Mittelwerten in mN und deren jeweiligen Standardfehlern der drei durchgeführten Experimente.

Abbildung 39: Bildliche Schilderung der Einwirkung von Phenylephrin alleine und in Verbindung mit SWS1 auf das Kontraktionsverhalten der glatten Aortenmuskulatur.



Mit dem Balkendiagramm (Abbildung 39) sollte gezeigt werden, wie sich die kontraktile Aktivität des Präparats mit der Zugabe von Phenylephrin aber auch in der Gegenwart von der Mischung(Agonist + SWS1) verändert.

Auf der X-Achse wurde die Konzentration (μ mol) von zugegebenen Substanzen aufgetragen. Die Y-Achse präsentiert die Kontraktionskraft (mN) des verwendeten Präparates. Die dunkel blaue Säulen repräsentieren den Mittelwert der Kontrolle (100%) und die hell blauen Säulen stehen für die Mischung aus Agonist und SWS1 dreier durchgeführten Experimenten.

Die Standardabweichung ist sichtbar in Form von einer dünnen Linie oben auf den Säulen.

Abbildung 40: Die originale Registrierung eines Einzelversuches für die
Wirkungsaufklärung an der Aorta mit Phenylephrin

Kontrolle:

3 $\mu\text{mol/l}$ _____

1 $\mu\text{mol/l}$ _____

0,3 $\mu\text{mol/l}$ _____

0,1 $\mu\text{mol/l}$ _____

+ 30 $\mu\text{mol/l}$ SWVS1:

3 $\mu\text{mol/l}$ _____

1 $\mu\text{mol/l}$ _____

0,3 $\mu\text{mol/l}$ _____

0,1 $\mu\text{mol/l}$ _____

3.3.3 Analyse des Wirkmechanismus von SWS1 mit Acetylcholin am Darm

Der Verlauf des Experiments wurde im Kapitel 2.6.6.1 genau erklärt. Die SWS1-Einwirkung wurde mit Acetylcholin (siehe Kap. 2.5.3) an der glatten Darmmuskulatur verglichen. Die mögliche SWS1-Wirkung wäre eine cholinerge bzw. anticholinerge.

Tabelle 19: Tabellarische Darstellung der Einwirkung von Acetylcholin auf das Kontraktionsverhalten der glatten Darmmuskulatur.

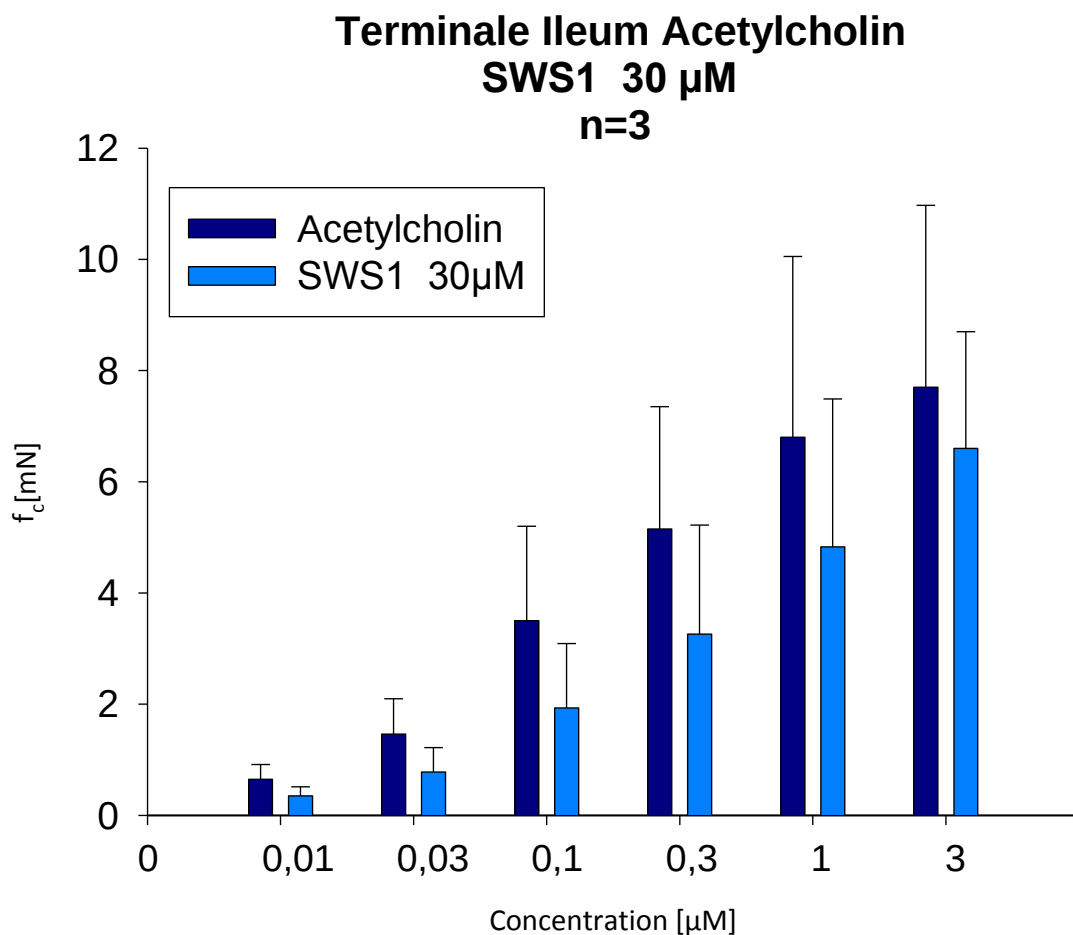
Kontrolle mit Acetylcholin [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	Zahl der Versuche n
0,01	$0,65 \pm 0,26$	3
0,03	$1,46 \pm 0,63$	3
0,1	$3,50 \pm 1,70$	3
0,3	$5,15 \pm 2,20$	3
1	$6,80 \pm 3,25$	3
3	$7,77 \pm 3,27$	3

Tabelle 20: Tabellarische Darstellung der Einwirkung von Acetylcholin mit 30 $\mu\text{mol/l}$ SWS1 auf das Kontraktionsverhalten der glatten Darmmuskulatur.

SWS1 mit Acetylcholin [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	Zahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit p
0,01	$0,35 \pm 0,16$	3	n.s.
0,03	$0,78 \pm 0,44$	3	n.s.
0,1	$1,93 \pm 1,16$	3	n.s.
0,3	$3,26 \pm 1,96$	3	n.s.
1	$4,83 \pm 2,66$	3	n.s.
3	$6,60 \pm 2,10$	3	n.s.

Die Tabellen 19 und 20 liefern die Informationen über den arithmetischen Mittelwerten in mN und deren jeweiligen Standardfehlern der drei durchgeführten Experimente.

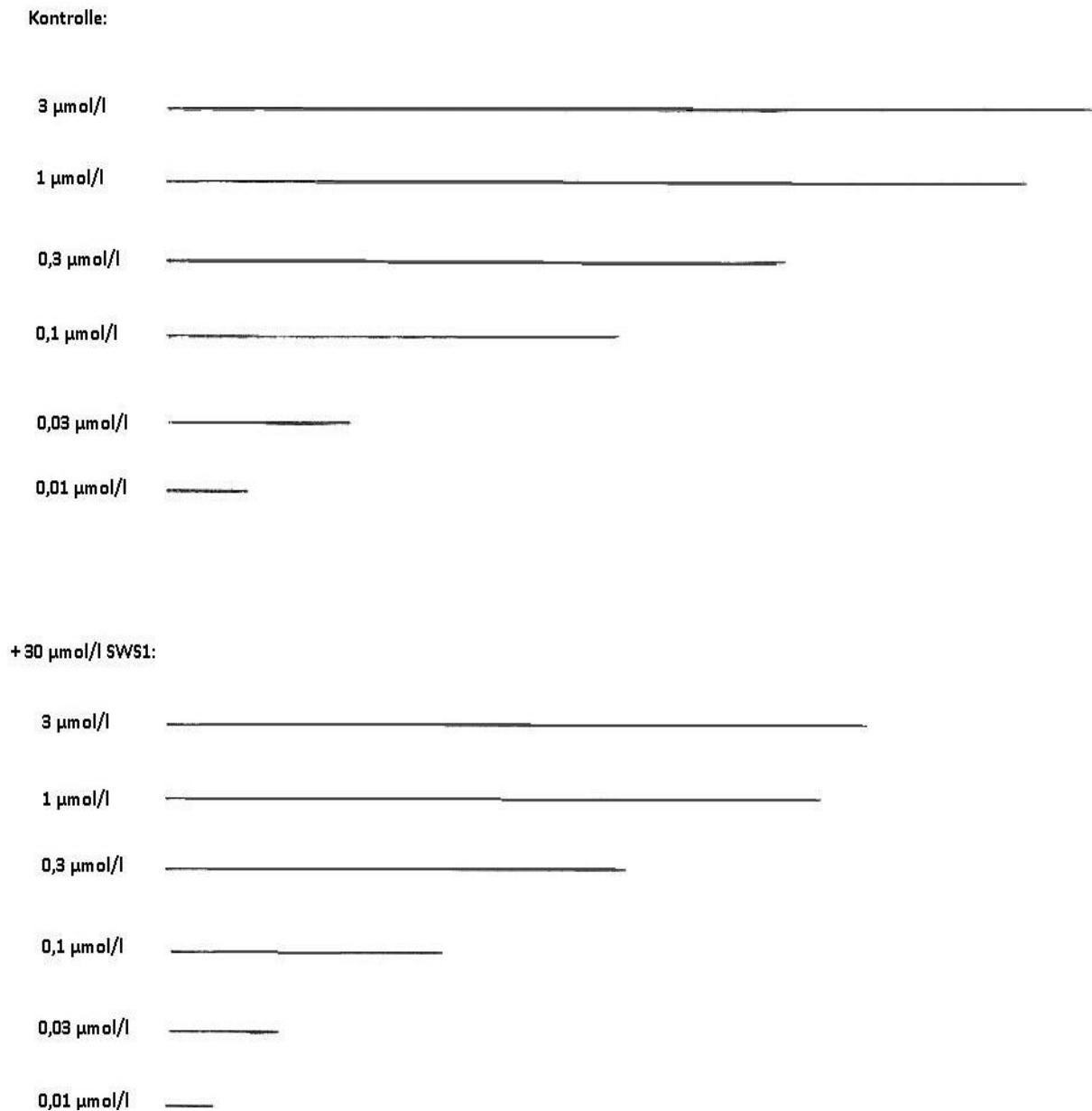
Abbildung 41: Bildliche Schilderung der Einwirkung von Acetylcholin alleine
und in Verbindung mit SWS1 auf das Kontraktionsverhalten der glatten
Darmmuskulatur.



Mit dem Balkendiagramm (Abbildung 41) sollte gezeigt werden, wie sich die kontraktile Aktivität des Präparats mit der Zugabe von Acetylcholin aber auch in der Gegenwart von der Mischung(Agonist + SWS1) verändert.

Auf der X-Achse wurde die Konzentration (μ mol) von zugegebenen Substanzen aufgetragen. Die Y-Achse präsentiert die Kontraktionskraft (mN) des verwendeten Präparates. Die dunkel blaue Säulen repräsentieren den Mittelwert der Kontrolle (100%) und die hell blauen Säulen stehen für die Mischung aus Agonist und SWS1 dreier durchgeführten Experimenten. Die Standardabweichung ist sichtbar in Form von einer dünnen Linie oben auf den Säulen.

Abbildung 42: Die originale Registrierung eines Einzelversuches für die
Wirkungsaufklärung am Darm mit Acetylcholin



3.3.4 Analyse des Wirkmechanismus von SWS1 mit Histamin an der Aorta

Die folgende Experimente führen zur Aufklärung des SWS1-Wirkmechanismus im Vergleich mit Histamin (siehe Kap.2.5.3). Es wurde im diesem Fall das Kontraktionsverhalten der glatten Aortenmuskulatur beobachtet.

Tabelle 21: Tabellarische Darstellung der Einwirkung von Histamin auf das Kontraktionsverhalten der glatten Aortenmuskulatur.

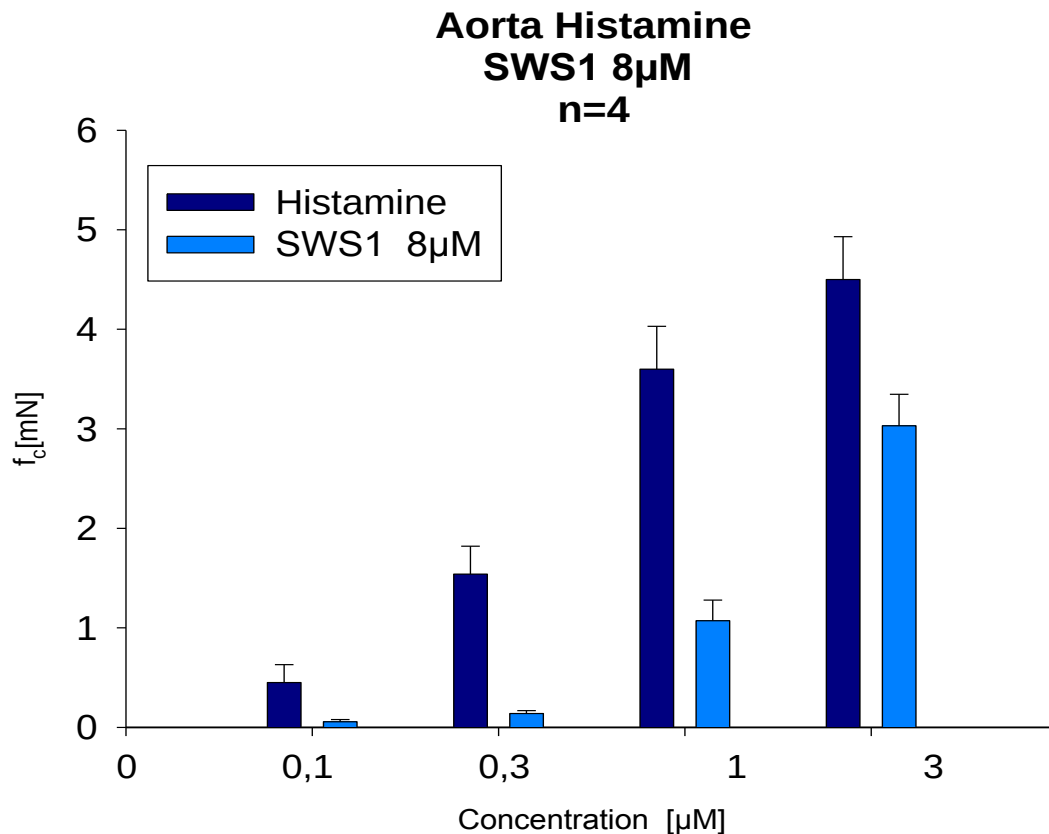
Kontrolle mit Histamin [μmol/l]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	Zahl der Versuche n
0,1	$0,45 \pm 0,18$	4
0,3	$1,54 \pm 0,28$	4
1	$3,60 \pm 0,43$	4
3	$4,50 \pm 0,43$	4

Tabelle 22: Tabellarische Darstellung der Einwirkung von Histamin mit 30 μmol/l SWS1 auf das Kontraktionsverhalten der glatten Aortenmuskulatur.

SWS1 mit Histamin [μmol/l]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	Zahl der Versuche n	Irrtumswarscheinlichkeit p
0,1	$0,05 \pm 0,02$	4	0,05
0,3	$0,14 \pm 0,02$	4	0,05
1	$1,07 \pm 0,20$	4	0,05
3	$3,03 \pm 0,31$	4	0,05

Die Tabellen 21 und 22 liefern die Informationen über den arithmetischen Mittelwerten in mN und deren jeweiligen Standardfehlern der drei durchgeführten Experimenten.

Abbildung 43: Bildliche Schilderung der Einwirkung von Histamin alleine und in Verbindung mit SWS1 auf das Kontraktionsverhalten der glatten Aortenmuskulatur.



Mit dem Balkendiagramm (Abbildung 43) sollte gezeigt werden, wie sich die kontraktile Aktivität des Präparats mit der Zugabe von Histamin aber auch in der Gegenwart von der Mischung(Agonist + SWS1) verändert.

Auf der X-Achse wurde die Konzentration (μ mol) von zugegebenen Substanzen aufgetragen. Die Y-Achse präsentiert die Kontraktionskraft (mN) des verwendeten Präparats. Die dunkel blaue Säulen repräsentieren den Mittelwert der Kontrolle (100%) und die hell blauen Säulen stehen für die Mischung aus Agonist und SWS1 dreier durchgeführten Experimenten.

Die Standardabweichung ist sichtbar in Form von einer dünnen Linie oben auf den Säulen

Abbildung 44: Die originale Registrierung eines Einzelversuches für die
Wirkungsaufklärung an der Aorta mit Histamin

Kontrolle:

3 $\mu\text{mol/l}$ _____

1 $\mu\text{mol/l}$ _____

0,3 $\mu\text{mol/l}$ _____

0,1 $\mu\text{mol/l}$ _____

+ 30 $\mu\text{mol/l}$ SWVS1:

3 $\mu\text{mol/l}$ _____

1 $\mu\text{mol/l}$ _____

0,3 $\mu\text{mol/l}$ _____

0,1 $\mu\text{mol/l}$ -

3.3.5 Analyse des Wirkmechanismus von SWS1 mit Histamin am Darm

Die folgende Experimente führen zur Aufklärung des SWS1-Wirkmechanismus im Vergleich mit Histamin (siehe Kap.2.5.3). Es wurde im diesem Fall das Kontraktionsverhalten der glatten Darmmuskulatur beobachtet.

Tabelle 23: Tabellarische Darstellung der Einwirkung von Histamin auf das Kontraktionsverhalten der glatten Darmmuskulatur.

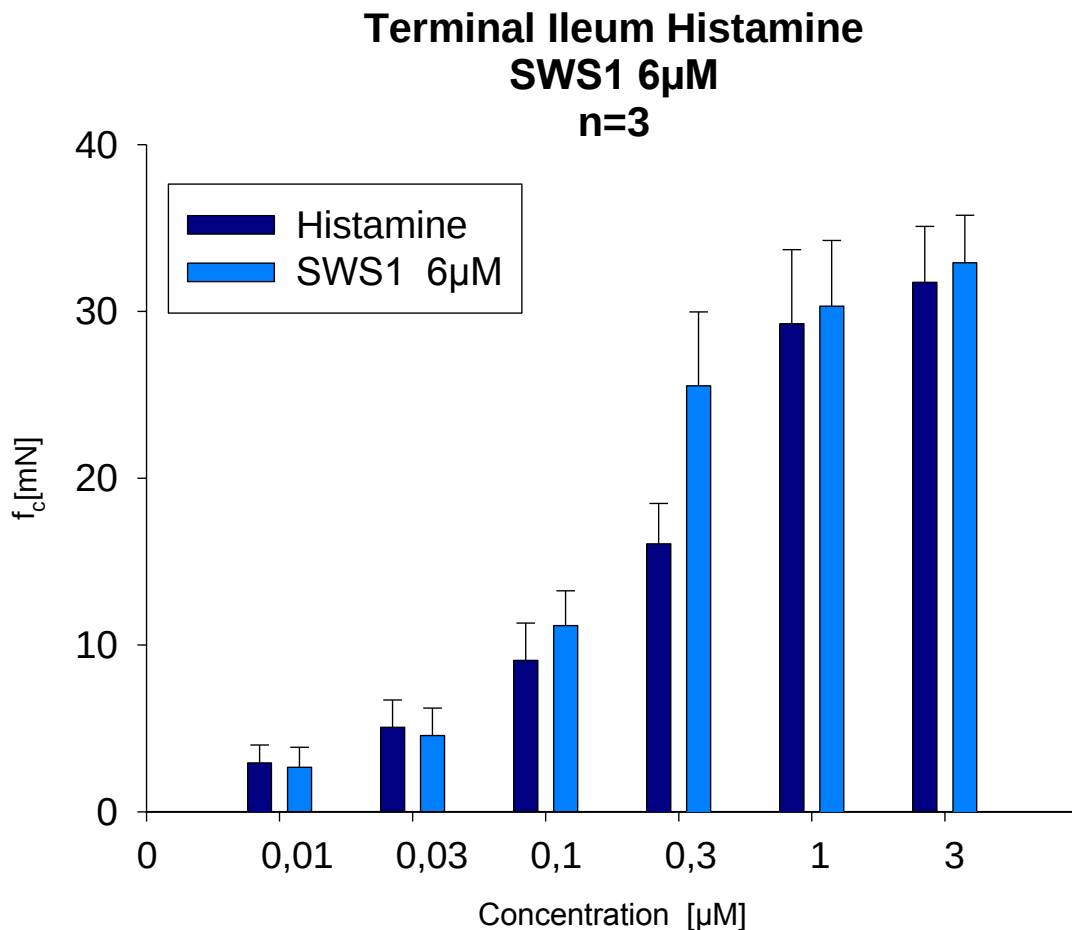
Kontrolle mit Histamin [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	Zahl der Versuche n
0,01	$2,93 \pm 1,08$	3
0,03	$5,07 \pm 1,63$	3
0,1	$9,08 \pm 2,23$	3
0,3	$16,06 \pm 2,42$	3
1	$29,26 \pm 4,44$	3
3	$31,74 \pm 3,36$	3

Tabelle 24: Tabellarische Darstellung der Einwirkung von Histamin mit 30 $\mu\text{mol/l}$ SWS1 auf das Kontraktionsverhalten der glatten Darmmuskulatur.

SWS1 mit Histamin [$\mu\text{mol/l}$]	$f_c \pm \text{SEM}$ [mN]	Zahl der Versuche n	Irrtumswarscheinlichkeit p
0,01	$2,67 \pm 1,20$	3	n.s.
0,03	$4,57 \pm 1,65$	3	n.s.
0,1	$11,16 \pm 2,09$	3	n.s.
0,3	$25,54 \pm 4,42$	3	n.s.
1	$30,31 \pm 3,97$	3	n.s.
3	$32,92 \pm 2,84$	3	n.s.

Die Tabellen 23 und 24 liefern die Informationen über den arithmetischen Mittelwerten in mN und deren jeweiligen Standardfehlern der drei durchgeführten Experimente.

Abbildung 45: Bildliche Schilderung der Einwirkung von Histamin alleine und in Verbindung mit SWS1 auf das Kontraktionsverhalten der glatten Darmmuskulatur.



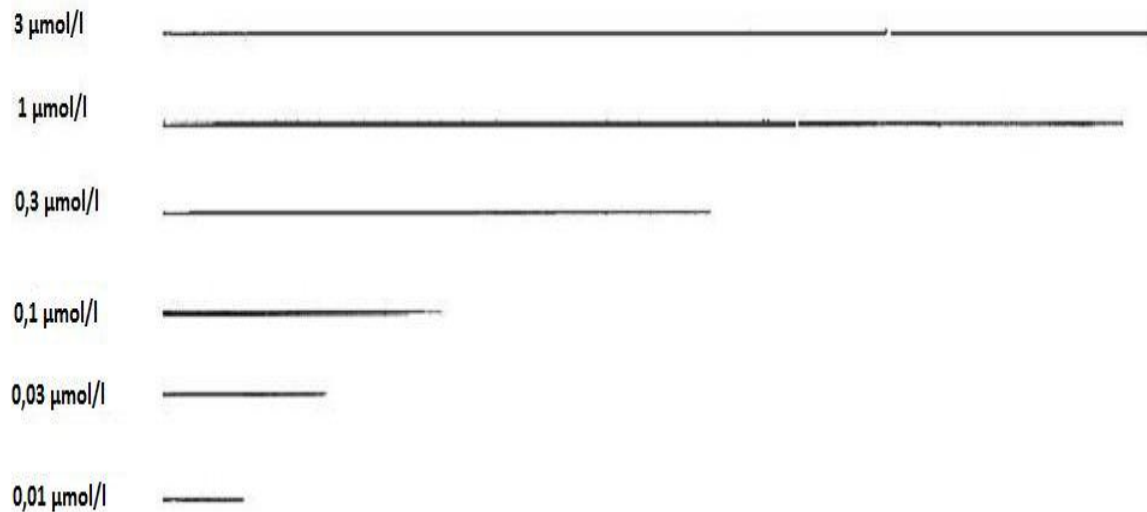
Mit dem Balkendiagramm (Abbildung 45) sollte gezeigt werden, wie sich die kontraktile Aktivität des Präparats mit der Zugabe von Histamin aber auch in der Gegenwart von der Mischung (Agonist + SWS1) verändert.

Auf der X-Achse wurde die Konzentration (μ mol) von zugegebenen Substanzen aufgetragen. Die Y-Achse präsentiert die Kontraktionskraft (mN) des verwendeten Präparates. Die dunkelblauen Säulen repräsentieren den Mittelwert der Kontrolle (100%) und die hellblauen Säulen stehen für die Mischung aus Agonist und SWS1 dreier durchgeführten Experimenten.

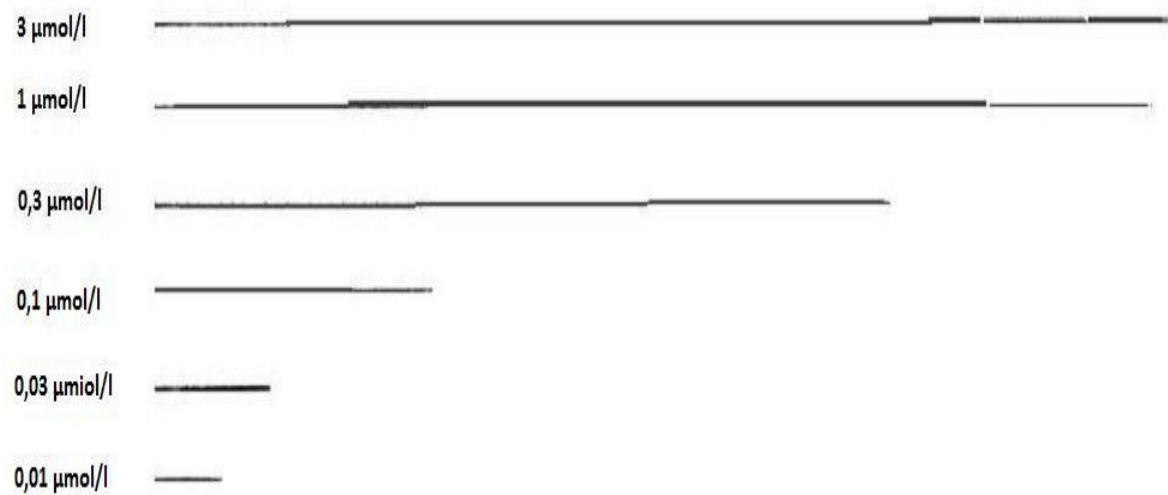
Die Standardabweichung ist sichtbar in Form von einer dünnen Linie oben auf den Säulen

Abbildung 46: Die originale Registrierung eines Einzelversuches für die
Wirkungsaufklärung am Darm mit Histamin

Kontrolle:



+ 30 $\mu\text{mol/l}$ SWS1:



4. DISKUSSION

Das Ziel meiner Diplomarbeit war, die möglichen Wirkungen von SWS1 zu identifizieren, die auf unterschiedlichen Meerschweinchenorganen getestet wurden. Die neu synthetisierte Testsubstanz sollte Hydrogensulfid abspalten und somit auch die entsprechende Wirkung ausüben (siehe Kap. 1.2). Erwartet war eine tonisierende und spasmolytische Aktivität auf die glatte Muskulatur der Pulmonalarterie, Aorta und des Darms. Am Papillarmuskel und den rechten Vorhof wurde eine Abnahme der Kontraktionskraft vermutet.

Die Grundlage für die weiteren Untersuchungen waren die vasorelaxierenden Effekte auf den einigen Präparaten, deswegen habe ich in den weiteren Kapiteln versucht, den Wirkmechanismus von SWS1 herauszufinden.

Im folgenden Teil wurden die Ergebnisse, die in den Experimenten erzeugen wurden, analysiert.

4.1 Versuche an isolierten Herzmuskelpräparaten

Es wurde in Studien eine protektive Wirkung von H₂S auf das Rattenherz nachgewiesen (Hu et al., 2007), da SWS1 das Gas freisetzen sollte, wurde eine ähnliche Wirkung von der Testsubstanz erwartet.

In den Versuchsablauf auf den rechten Vorhof wurde eine leichte der Einwirkung von SWS1 auf die Frequenz des Herzschlages beobachtet. Die zwei ersten SWS1-Konzentrationen bewirkten eine leichte Erhöhung der Frequenz auf $4,93 \pm 2,13 \%$ ($217,00 \pm 9,30 \text{ mN}$), nun dann wurde eine nicht signifikante negativ chronotrope Wirkung festgestellt. Während des gesamten Experiments wurde die EC₅₀ nicht erreicht, im Vergleich zu dem Versuch mit dem Papillarmuskel, wo der EC₅₀ -Wert den $78 \mu\text{mol/l}$ entsprach. Hier wurden ziemlich unregelmäßige Auswirkung registriert, die sich zuerst als eine signifikante starke negative Inotropie bis auf $-34,14 \pm 10,39 \%$ ($2,23 \pm 0,8$) zeigten. Nach der Einspritzung von $2 \mu\text{mol/l}$ SWS1 wurde ein signifikanter plötzlicher Anstieg der Kurve notiert, der dann bei $30 \mu\text{mol/l}$ wiederum deutlich bis auf $-58,97 \pm 13,21 \%$ ($1,47 \pm 0,75 \text{ mN}$) absank.

Die Testsubstanz zeigte beim Musculus papillaris sowohl eine positive, als auch am Ende eine sichtbare negative Inotropie.

4.2 Versuche an der glatten Muskulatur

Die im Laufe der Diplomarbeit realisierten Experimente wiesen eine Tonusabnahme der Kalium-vokontrahierten glatten Muskulatur der Aorta, der Pulmonalarterie und des Darm auf. Die relaxierende Einwirkung von SWS1 wurde schon bei der ersten Dosierung beobachtet. Mit jeder weiterer Konzentrationserhöhung wurde eine signifikante Potenzierung der SWS1-Wirkung durch den Schreiber registriert. Die folgende Tabelle demonstriert die Ergebnisse.

Tabelle 25 : Zusammenstellung der Ergebnisse

Organpräparat	Kontrolle	Endeffekt	EC ₅₀ -Wert
Pulmonalarterie	14,3 ± 0,30	0,37 ± 0,34	6,90 µmol/l
Aorta	16,04 ± 3,8 mN	-0,44 ± 0,65 mN	7,8 µmol/l
Darm	12,53 ± 1,71	-0,52 ± 0,54	5,7 µmol/l

Die Tabelle liefert Informationen über eine signifikante, deutlich relaxierende, dilatierende Auswirkung der Testsubstanz auf die verwendete Organpräparate. Die Resultate konnten mit entsprechenden Studien verglichen werden.

Die Forscher konnten zeigen, dass der Schwefelwasserstoff in vivo und in vitro (Rochette et al. 2008) wahrscheinlich durch Öffnung von ATP-abhängigen K⁺-Kanälen des Gefäßendothels zu einer Vasodilatation und dadurch zu einer Hypotension bei Ratten führt (Bełtowski und Łowicka, 2004).

Auf der Universität in Saskatchewan in Kanada erkannten die Wissenschaftler, dass das H₂S wurde im kardiovaskulären System aus der schwefelhaltigen Aminosäure L-Cystein mittels Cystathionin-γ-Lyase (CSE) synthetisiert. Durch eine Deletion des Gens, das das Enzym codiert, wurde eine deutliche Reduktion des H₂S-Synthese nachgewiesen und dadurch eine Erzeugung der Hypertension und eine Verminderung der Endothelium-abhängige

Vasorelaxation. Die Untersuchungen nachweisen, dass Hydrogensulfid ein physiologischer Regulator der Vasodilatation und des Blutdruckes ist. (Yang et al., 2008)

4.3 Analyse des Wirkmechanismus mit den Antagonisten

4.3.1 Analyse des Wirkmechanismus mit Glibenclamid

Der Wirkmechanismus von Glibenclamid wurde im Kapitel 2.5.2 erklärt. Die wissenschaftlichen Studien im Kapitel 1.2 hinweisen, dass die H₂S-Wirkung hauptsächlich auf der Öffnung von ATP-abhängigen K⁺-Kanälen beruht. Das konnte auch in dem durchgeführten Experiment ermittelt werden.

Die Analyse des Wirkmechanismus wurde an der Kalium-vorkontrahierte Aortenringe und am Darmstücke realisiert. Das jeweilige Präparat wurde zuerst mit 30 bzw. 100 µmol/l Glibenclamid (K⁺-Kanalblocker) 45 Minuten behandelt und dann wurde 8 bzw. 6 µmol/l SWS1 dazu pipettiert. Die SWS1-Wirkung wurde kurz danach deutlich sichtbar. Damit konnte gezeigt werden, dass SWS1 die Wirkung von Glibenclamid antagonisiert hat. Die erwartete Öffnung von ATP-abhängigen K⁺-Kanälen mit einer Signifikanz von 0,05 wurde ziemlich stark an der Aorta beobachtet. Die signifikante Einwirkung von 0,05 wurde am Darm bei der Konzentration von 100 µmol/l Glibenclamid registriert.

4.3.2 Analyse des Wirkmechanismus mit Nitro-L-Arginin

Um den vasodilatatorischen Wirkmechanismus herauszufinden, wurde ein Versuch im Vergleich mit der Nitro-L-Arginin (NO-Synthase-Inhibitor)realisiert. Hier wurden die Kalium-vorkontrahierte Aortenringe und der Darmstücke untersucht. Mit der entsprechenden Konzentration des Antagonists wurde das jeweilige Präparat 45 Minuten behandelt. Anschließend wurde SWS1 dazu gegeben. Es erfolgte eine antagonistische SWS1-Wirkung, wodurch die Aussage getroffen werden konnte, dass SWS1 möglicherweise eine NO-Synthase induzierende Einwirkung besitzt. Dadurch kommt zu Freisetzung von NO, der eine gefäßerweiternde Wirkung ausübt.

An der Aorta wurden keine Signifikante Veränderungen erkannt. Die signifikante Resultate wurden am Ileum erzeugt.

4.4 Analyse des Wirkmechanismus mit den Agonisten

4.4.1 Analyse des Wirkmechanismus mit Phenylephrin

Des Weiteren wurden die Experimente mit den α_1 -Sympathomimetikum Phenylephrin realisiert. Es wurden die entsprechende Verdünnungsreihen hergestellt. Zuerst wurde die Kontrollmessung mit den Agonist gemacht, um die Referenzwerte zu erhalten. Hierbei wurden auch die Aortenringe und die Darmstücke verwendet. Das Balkendiagramm (Abbildung 45) liefert die Information, dass die Erhöhung der Agonist-Konzentration eine Erhöhung der Kontraktion des Organpräparats auslöst.

Die signifikante Resultate demonstrieren, dass SWS1 die Wirkung von Phenylephrin sowohl an der Aorta, als auch am Darm antagonisiert. Möglicherweise wirkt die zu testende Substanz vasodilatierend. Die nächste Teilwirkung meiner Testsubstanz könnte die sympatholytische Aktivität sein.

4.4.2 Analyse des Wirkmechanismus mit Acetylcholin

Die Reihe von Experimenten wurde nur an der terminalen Ileummuskulatur durchgeführt. Die Gabe der Acetylcholin führt zu Tonuserhöhung und zu einer Verstärkung der kontraktilen Aktivität der glatten Darmmuskulatur. Zuerst wurde die Kontrollmessung mit den Agonist gemacht, um die Referenzwerte zu erhalten. Nach der Zugabe von SWS1 wurden nicht signifikante Resultate der Testsubstanz registriert, obwohl es möglich war, eine Tonusverringerung zu beobachten.

4.4.3 Analyse des Wirkmechanismus mit Histamin

Die wahrscheinliche histaminerge bzw. antihistaminerge Wirkung wurde an den Aortenringen und den Darmstücken geprüft. Zuerst wurde die Kontrollmessung mit Histamin gemacht, um die Referenzwerte zu erhalten. Eine signifikante antihistaminerge Wirkung von SWS1 wurde an den Aortenringen festgestellt. Im Gegensatz zu Aorta wurde an den isolierten Darmpräparaten eine agonistische Wirkung von SWS1 registriert. Jedoch bei den ersten zwei Konzentrationen von SWS1 konnte eine sehr leichte antihistaminerge Einwirkung betrachtet werden. Die höchste SWS1-histaminerge Auswirkung wurde bei 0,3 $\mu\text{mol/l}$ beobachtet. SWS1 potenziert die Histaminwirkung, also führt zu einer nicht signifikanter Erhöhung der kontraktile Aktivität der Darmmuskulatur.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde die Wirkung von SWS1 auf die kontraktile Aktivität der glatten Muskulatur und des Herzens getestet. Die Eignung der glatten Muskulatur zu spontanen Aktivität war die Voraussetzung für die Experimente. In den Einzelversuchen wurden folgende isolierte Meerschweinchen-Organpräparate verwendet:

→ glatte Muskulatur-Präparate: Aorta, Pulmonalarterie, Darm

→ Herzpräparate: rechter Vorhof, Papillarmuskel

In der Zusammenschau aller Resultate ergibt sich ein unterschiedlich ausgeprägter relaxierender Effekt auf bestimmte Meerschweinchen-Organpräparate. Die Ergebnisse deuten auf eine konzentrationsabhängige Verminderung der kontraktiler Aktivität und somit eine dilatierende Einwirkung von SWS1 auf die alle glatte Muskulatur-Präparate. Die Wirkung erfolgt schon bei der ersten Konzentration von SWS1 und die weitere kumulative Testsubstanzgabe potenziert die Einwirkung.

SWS1 sollte das Hydrogensulfid freisetzen, das dann eine protektive Einwirkung auf das Herz ausüben sollte. Die Resultate zeigen eine nicht signifikante negativ chronotrope Wirkung auf den rechten Vorhof im Gegensatz zum Papillarmuskel. Hier konnte die unregelmäßige Auswirkung registriert werden, die sich zuerst als eine starke negative, dann in positive und im Endeffekt als negative Inotropie zeigte.

Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit veranschaulichen die relaxierenden, vasodilatierenden Effekte von SWS1 und waren auch die Grundlage für die weiteren Untersuchungen der Testsubstanz, die den Wirkmechanismus aufklären können. Dafür wurden die Antagonisten wie Glibenclamid, Nitro-L-Arginin und Agonisten wie Phenylephrin, Histamin und Acetylcholin verwendet.

Die Daten der Experimente weisen auf mögliche Wirkmechanismen von SWS1 auf, wie:

→ Öffnung der ATP-abhängigen K^+ -Kanälen

→ NO-Synthase-Aktivator

→ α_1 -sympatholytische Wirkung

→ anticholinerge Wirkung

→ histaminerge Wirkung.

Die bereits erwähnten Auswirkungen wurden schon bei der ersten SWS1-Dosis-Gabe registriert. Neben der bisher diskutierten Resultate konnte festgestellt, dass SWS1 eine deutliche Einwirkung auf die glatte Muskel der Aorta, Pulmonalis und des Darms erzeugt werden konnte. Die Herzpräparate besonders der Vorhof wurden nicht signifikant beeinflusst.

6. LITERATUR

Abraham M.R, Jahagir A, Alekseev A.E, Terzic A (1999) Channelopathies of inwardly rectifying potassium channels, *FASEB J.* 13:1901-1910

Belkowski J, Łowicka E (2007) Hydrogen sulfide (H₂S)-the third gas of interest for pharmacologists, *Pharmacol Rep.* 59(1):4-24

Burger A, Wachter H (1998, 8. Auflage) Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch, Walter de Gruyter, Berlin, New York 1998

Estler C-J, Erlangen (2000, 5.Auflage) Pharmakologie und Toxikologie, Schattauer Stuttgart, New York 2:98-99/13:332-333

Hamill O.P, Marty A, Neher E, Sakman B, Sigworth F.J.(1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Eur.J.Physiol.* 391:85-100

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

Malhi H, Irani AN, Rajvanshi P, Suadcani SO, Spray DC, Gupta S (2000) K_{ATP} channels regulate mitogenically induced proliferation in primary rat hepatocytes and human liver cell lines, *Biol. Chem.* 275:26050-26057

Mutschler E, Geisslinger G, Heyo K, Kroemer K, Ruth P, Schärfer-Korting M (2008, 9.Auflage) Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart B2:417; B4:553/593

Müller-Esterl W (2004, 1.Auflage) Biochemie, Elsevier GmbH, München 26.5:369-372

Noma A.(1983) ATP regulated K-channels in cardiac muscle, *Nature* 305:147-148

Reiter M (1997) Die Wertbestimmung inotrop wirkender Arzneimittel am isolierten Papillarmuskel, *Arzneimittel Forschung* 17:1249-1253

Rochette L, Vergely C (2008) Hydrogen sulfide (H₂S), an endogenous gas with odor of rotten eggs might be a cardiovascular function regulator, *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*, 57(3):136-138

Seino S, Miki T (2003) Physiological und pathophysiological roles of ATP-sensitive K^{*} channels, Progress in Biophysics and molecular Biology, 81:133-176

Sun YG, Cao YX, Wang WW, Ma SF, Yao T, Zhu YC (2008) Hydrogen sulphide is an inhibitor of L-type calcium channels and mechanical contraction in rat cardiomyocytes, Cardiovascular Research, 79(4):632-641

Thews G, Mutschler E, Vaupel P (1999,5. erweiterte Auflage) Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 8:177-179

Trube G (1983) Potassium channels in isolated patches of cardiac cell membrane, Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol 322:R64

Urban , Schwarzenberger (1993, 3.Auflage) Roche Lexikon Medizin

Wang R (2004) Signal Transduction and the Gasotransmitters NO, CO, and H₂S in Biology and Medizine, Humana Press, 4:276-301

Wang YF, Mainali P, Tang CS, Shi L, Zhang CY, Yah H, Liu XQ, Du JB (2008) Effects of nitric oxide and hydrogen sulfide on the relaxation of pulmonary arteries in rats, Chinese Medical Journal, Vol. 121, No. 5:420-423

Xu M, Wu YM, Li Q, Wang X, He RR (2008) Electrophysiological effects of hydrogen sulfide on pacemaker cells in sinoatrial nodes of rabbits, Acta physiologica Sinica 60(2):175-180

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(5901):587-90

7. CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten:

Name:	Anna Krakus
Geburtsdatum:	17.02.1980
Geburtsort:	Rybnik
Staatsangehörigkeit:	Polen
Eltern:	Malgorzata Krakus, geb. 22.07.1955 Marian Krakus, geb. 17.02.1941

Ausbildung:

1988-1995	Stanislaw Staszyc Grundschule in Jankowice (Polen)
1995-1999	Powstancy Slascy 1. Allgemeinbildendes Lyzeum in Rybnik (Polen)
1999-2001	Medizinische Berufsstudium Nr.1 in Gliwicz (Polen)
WS 2003	Immatrikulation an der Universität Wien und Inskription der Studienrichtung Pharmazie
3.3.2005	1. Diplomprüfung

Besondere Kenntnisse:

Sprachen	Polnisch, Deutsch
----------	-------------------