



DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Pharmakologisches Screening eines neu synthetisierten Kohlensäurediester-Derivates (MAH117.HCl) an isolierten Organen von Meerschweinchen“

verfasst von / submitted by

Aida Hadzic

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2020 / Vienna, 2020

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Spasmolytika	3
1.1.1. Neurotrope Spasmolytika	3
1.1.2. Muskulotrope Spasmolytika	4
1.1.4. Tertiäre Parasympatholytika	6
1.2. Reizdarmsyndrom	6
1.2.1. Einleitung	6
1.2.2. Diagnose des Reizdarmsyndroms	7
1.2.3. Reizdarmsyndrom vom Diarrhoetyp	7
1.2.4. Die konventionelle Therapie des Reizdarmsyndroms vom Diarrhoetyp	7
1.2.5. Konventionelle Therapie von Unterleibsbeschwerden bei Reizdarmsyndrom-Diarrhoetyp	8
1.2.6. Neue Medikamente bei Reizdarmsyndrom-Diarrhoetyp	8
2. ZIELSETZUNG	10
3. MATERIAL UND METHODIK	11
3.1 Versuchstiere	11
3.2. Präparation der isolierten Organe	13
3.2.1. Atrium cordis dextrum	14
3.2.2. Musculus papillaris	15
3.2.3. Arteria pulmonalis	17
3.2.4. Aorta descendens	18
3.2.5. Ileum terminale	20
3.3. Physiologische Nährlösung (Tyrode)	22
3.4. Vorbereitung der Kaliumchloridlösung	24
3.5. Testsubstanz	24

3.5.1 MAH117.HCl	24
3.6. Versuchsanordnungen	25
3.6.1. Versuchsapparaturen	27
3.6.2. Die Gaszufuhr	32
3.6.3. Kraftwandler, Verstärker und Schreiber	33
3.7. Versuchsablauf	33
3.7.1. Versuchsablauf auf das Atrium cordis dextrum	35
3.7.2. Versuchsablauf am Papillarmuskel	37
3.7.3. Versuchsablauf an der Arteria pulmonalis	38
3.7.4. Versuchsablauf an der Aorta descendens	39
3.7.5. Versuchsablauf am Ileum terminalis	41
3.8. Untersuchung des Wirkmechanismus	42
3.8.1. Nitro-L-Arginin	43
3.9. Auswertung der Ergebnisse	43
3.9.1. Auswertung am Atrium dextrum	43
3.9.2. Auswertung am Musculus papillaris	44
3.9.3. Auswertung an der Aorta, Arteria pulmonalis und Ileum terminalis	45
3.10. Statistik	46
4. ERGEBNISSE	47
4.1. Wirkung von MAH117 auf das Atrium Cordis dextrum	47
4.2. Wirkung von MAH117 auf den Musculus papillaris	50
4.3. Wirkung von MAH117 auf Aorta descendens	52
4.4. Wirkung von MAH117 auf Arteria pulmonalis	54
4.5. Wirkung von MAH117 am Ileum terminales	56
5. DISKUSSION	60
5.1. Wirkung von MAH117.HCl auf die quergestreifte Muskulatur	60

5.2. Wirkung von MAH117.HCl auf die glatte Muskulatur	61
5.3. Wirkmechanismus von MAH117.HCl am terminalen Ileum	63
6. ZUSAMMENFASSUNG	64
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	65

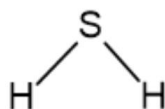
1. EINLEITUNG

Das Ziel meiner Diplomarbeit war die pharmakologische Wirkung einer schwefelhaltigen Testsubstanz MAH117. HCl auf die isolierten Meerschweinchenorgane zu untersuchen. Die Wirkung der Substanz konnte eventuell auf einer Freisetzung von Schwefelwasserstoff beruhen, wodurch die ATP-Kaliumkanäle oder die NO-Synthase beeinflusst werden könnten, was zu einer Vasodilatation und relaxierenden Wirkung führt.

„Schwefelwasserstoff ist ein toxisches Gas, ohne Farbe und übel riechend. In der Natur ist es in Fäulnisprozessen von organischen Stoffen und auch in Mineralquellen vorhanden“ (Ammon 2004):

Laut vielen Studien hat Schwefelwasserstoff ähnliche Eigenschaften wie Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenmonoxid (CO) (Wang et al. 2014). Es hat ein Molekulargewicht von 34,08 g/mol und der Summenformel H_2S .

Abbildung: Struktur von Schwefelwasserstoff



H_2S ist ein gefäßprotektiver Faktor.

Es wurde gezeigt, dass Schwefelwasserstoff positive Auswirkungen auf kardiovaskuläre Erkrankungen, Hypertonie und Arteriosklerose hat (Streeter et al. 2013).

Im Falle einer Vergiftung mit Schwefelwasserstoff können die Enzyme nicht ihre Aktivitäten ausüben und werden durch Bildung von Sulfid oder Disulfid inhibiert. Im Prozess des Stoffwechsels wird ein Hydrogensulfidion als Folge der Deprotonierung von Schwefelwasserstoff gebildet. Hydrogensulfidion blockiert dreiwertiges Eisen der Cytochromoxidase und die Enzyme der oxidativen Phosphorylierung (Estler et al. 2007).

Hydrosulfid löst Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, Schleimhautreizungen und Diarrhö. Wenn es höher dosiert ist kann es zum sofortigen Tod durch Atemlähmung führen (Ammon 2004).

Laut einer Studie wird H_2S in den glatten Muskelzellen von Ileum, Pfortader und thorakaler Aorta gebildet. Schwefelwasserstoff führt zu einer Relaxierung der glatten Muskelzellen dieser Organe (Hosoki et al. 1997).

Die Warnwirkung durch die olfaktorische Wahrnehmung erfolgt nur bei relativ geringen Konzentrationen, weil es rasch zu einer Gewöhnung kommt. Höhere Konzentrationen, über 200 ppm, blockieren die Geruchsrezeptoren, wodurch zu leichten bis schweren Vergiftungen kommen kann. Die wichtigsten betroffenen Organe sind bei einer akuten Vergiftung der Atemtrakt, als auch das zentrale Nervensystem. Als unerwünschte Arzneimittelwirkungen zeigen sich Schwindel, Kopfschmerz, Krämpfe, Brechreiz, bis hin zur Bewusstlosigkeit und Atemlähmung (Forth et al. 2009).

Schwefelwasserstoff wird in Säugetieren endogen unter dem Einfluss zwei Pyridoxal-5'-phosphat-abhängigen Enzymen, Cystathionin- β -Synthase (CBS) und Cystathionin-Lyase (CSE) hergestellt (Stipanuk et al. 1982).

Eine weitere Studie zeigt, dass NaHS (ein H_2S -Donor) signifikant zu einer Abnahme der Kontraktion der glatten Muskulatur an Luftröhrenpräparaten von Ratten führt. (Gharib-Naseri et al. 2012).

Schwefelwasserstoff wird im Organismus zu Sulfat und Thiosulfat oxidiert (Estler et al. 2007).

1.1. Spasmolytika

Spasmolytika sind Medikamente die zur Lösung krampfartiger Schmerzen im Bereich von Magen, Darm, Gallenwegen, Harnwegen und des weiblichen Genitals eingesetzt werden.

Wichtigste Gruppe sind die Anticholinergika (Antimuskarinika, Parasympatholytika). Die bewirken eine Hemmung der Kontraktionen cholinerg innervierter glatter Muskeln über eine Blockade muskarinischer Acetylcholinrezeptoren. Hauptvertreter dieser Gruppe sind Atropin, Scopolamin-derivate und synthetische Anticholinergika. Während die natürlichen Belladonnaalkaloide Atropin und Scopolamin eine gute Bioverfügbarkeit aufweisen, ist die therapeutische Wirksamkeit vieler synthetischer Anticholinergika nur nach parenteraler Injektion, aber nicht nach oraler oder rektaler Gabe ausreichend belegt. Der Grund dafür war, dass viele pharmakologisch wirksame Substanzen aufgrund geringer Resorption oder hoher präsystemischer Elimination keine wirksamen Plasmaspiegel erreichen (Springer et al. 2001).

1.1.1. Neurotrope Spasmolytika

Cholinozeptor-Antagonisten (Parasympatholytika) blockieren kompetitiv die Acetylcholin-vermittelte Erregungsübertragung an m-Cholinozeptoren. Sie greifen am parasympathischen Nervensystem an wodurch die Erschlaffung der glatten Muskulatur ausgelöst wird und daher werden sie als neurotrope Spasmolytika gennaant. Durch die unterschiedliche Muscarinrezeptor-Blockade an verschiedenen Organen treten unterschiedliche Wirkungen auf: Zentrale Neurone werden erregt oder gehemmt, die Herzfrequenz wird beschleunigt (nach höheren Dosen), die Sekretion der Tränen, des Speichels, Schweiß-Sekretion, die Drüsensekretion des Verdauungstraktes werden reduziert, die Schleimbildung in oberen und unteren Luftwegen wird reduziert, die glatte Muskulatur der Bronchien, der Gallenwege, der Ureteren und der Harnblase erschlafft, die Pupillen werden erweitert. Parasympatholytika mit tertiärem Stickstoff (z.B. Atropin) werden bei oraler

Applikation gut und rasch resorbiert. Dadurch dass sie die Blut-Hirn-Schranke passieren, können daher zentrale Nebenwirkungen auftreten.

Scopolamin wirkt gleich wie Atropin und unterscheidet sich pharmakologisch nur dadurch dass es nicht zentral erregend, sondern zentral dämpfend wirkt. Es wird in Augentropfen und als Antiemetikum bei den Kindern eingesetzt.

Andererseits ist die Resorption bei quartären Ammoniumverbindungen (z.B. Ipratropiumbromid) gering. Daher ist für eine ausreichende systemische Wirkung eine parenterale Applikation notwendig oder eine wesentlich höhere Dosierung. Vorteil von den quartären Stoffen ist, dass die nicht zentral wirksam sind weil sie die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren können.

Indikationen: m-Cholinozeptor-Antagonisten sind indiziert bei Spasmen der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Kanals, der Gallen- und Harnwege, bei spastischer Obstipation, Gallen- und Nierensteinkoliken, hyperaktiver Harnblase, bradykarden Herzrhythmusstörungen, zur Einschränkung der durch Narkotika vermehrter Schleimproduktion, beim Parkinsonsyndrom zur Milderung der Symptome und zur Pupillenerweiterung.

Einige quartäre Substanzen können ferner auch als Bronchodilatoren eingesetzt werden. Sie können auch bei der Gabe von Morphin eingesetzt werden, um die Nebenwirkungen zu unterdrücken, bei der Therapie von Myasthenia gravis oder als Antidot bei Vergiftungen (Atropin ist wichtigste lebensrettende Antidot bei Vergiftungen mit Phosphorsäureestern) (Mutschler et al 2012).

1.1.2. Muskulotrope Spasmolytika

Muskulotrope Spasmolytika bewirken die Erschlaffung durch einen direkten Eingriff an der glatten Muskulatur. Dieser Gruppe gehört Papaverin. Die Wirkung von Papaverin, das zu etwa 1% im Opium vorkommt, beruht auf der Hemmung der Phosphodiesterase, was zu einer Steigerung der cAMP- und c-GMP Konzentration führt. Seine Wirkung ist heute obsolet.

Stoffe, die zusätzlich eine anticholinerge spasmolytische Komponente haben werden als neurotrop-muskulotrope Spasmolytika bezeichnet.

Die gleiche Wirkung wie Papaverin hat Hymecromon und wird zur Behandlung oberer Bauchschmerzen eingesetzt.

Zu den neurotrop-muskulotropen Spasmolytika gehören Denaverin, Mebeverin, Oxybutinin und Propiverin.

Als Nebenwirkungen können Mundtrockenheit, Schwindel, Kopfschmerzen, Übelkeit, Sodbrennen, Obstipation und allergische Reaktionen auftreten.

Kontraindikationen: Parasympatholytika wirken kontraindiziert bei Glaukom und benigner Prostatahyperplasie. Bei Koronarsklerose dürfen sie nur in Dosen eingesetzt werden, die die Herzfrequenz nicht relevant steigern (Mutschler et al 2012).

1.1.3. Quartäre Parasympatholytika

Wie schon erwähnt, können die quartäre Parasympatholytika nicht so gut resorbiert werden und werden daher für eine ausreichende Wirkung parenteral appliziert, oder ist im Vergleich zur i.v. Gabe eine deutlich höhere Dosis erforderlich. Sie haben Vorteil, dass sie die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren und somit zentral unwirksam sind.

Dazu gehören: Glycopyrroniumbromid, Trospiumchlorid, Butylscopolamonium, Ipratropiumbromid und Tiotropiumbromid.

Glycopyrroniumbromid: wird in der Anästhesie zur Herabsetzung des Speichelflusses und Blockade der Bradykardie während der Narkoseeinleitung eingesetzt.

Trospiumchlorid: dient zur Behandlung der Dranginkontinenz mit Hyperaktivität der Harnblase.

Butylscopolaminiumbromid: wird bei Spasmen der glatten Muskulatur, vor allem des Gastrointestinaltrakts eingesetzt und auch zur Erleichterung endoskopischer Untersuchungen des Magen-Darm-Kanals.

Ipratropiumbromid und Tiotropiumbromid: werden bei obstruktiven Lungenerkrankungen, vor allem COPD, eingesetzt.

1.1.4. Tertiäre Parasympatholytika

Zu dieser Gruppe gehören Tropicamid, Pirenzepin, Tolterodin und Darifenacin (Mutschler et al 2012).

1.2. Reizdarmsyndrom

1.2.1. Einleitung

Reizdarmsyndrom (Colon irritabile, spastische Kolon, Reizkolon) gehört zu den häufigsten Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes. Frauen sind 2-3-mal mehr betroffen als Männer. Hauptsymptome sind Stuhlnunregelmäßigkeiten (Obstipation oder Diarrhö), Völlegefühl, Blähungen und abdominelle Schmerzen. Die Patienten können auch von Schlaf- und Angststörungen leiden. Die Ursachen der Entstehung sind nicht bekannt und deshalb geht die Therapie in Richtung der Leitsymptome. Falls Obstipation vorliegt, kann es mit Ballaststoffen oder Laxantien therapiert werden. Es ist grundsätzlich abzuraten von der Verwendung der Laxantien zur „Blutreinigung“ oder zur Gewichtsreduktion weil die weder entgiftend noch dauerhaft gewichtsreduzierend wirken. Falls Diarrhö vorliegt kann es kurzfristig mit Loperamid therapiert werden. Wie die Wirksamkeit von Spasmolytika, Anticholinergika, Antidepressiva, Dopamin-Antagonisten, Karminativa, Opioiden und Tranquilizern ist, wird es kontrovers diskutiert. Veränderung der Lebens- und Essgewohnheiten sowie eine Psychotherapie spielen auch eine wichtige Rolle in der Behandlung der Erkrankung (Mutschler et al 2012).

1.2.2. Diagnose des Reizdarmsyndroms

Reizdarmsyndrom kann bei den Patienten diagnostiziert werden die 3 Kriterien bezogen auf die Symptomatik erfüllen: wiederkehrende Bauchschmerzen mindestens 3 Tage pro Monat in den letzten 3 Monaten verbunden mit Symptomen wie: Verbesserung der Beschwerden mit Defäkation, bei Beginn der Erkrankung veränderten Stuhlhäufigkeit, veränderten Form oder Aussehen des Stuhls (Brandt et al. 2009).

1.2.3. Reizdarmsyndrom vom Diarrhoetyp

Reizdarmsyndrom vom Diarrhoetyp beeinflusst die Lebensqualität der Patienten stark und führt zu einer deutlichen Verschlechterung im Vergleich zu den anderen Subtypen. (Singh et al.2015)

Die Entstehung der Krankheit ist unterschiedlich vom Mensch zu Mensch. Es kann durch eine Änderung der Pharmakokinetik oder durch Überempfindlichkeit ausgelöst werden (Crowell et al. 2005). Genetischer Faktor spielt auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung.

1.2.4. Die konventionelle Therapie des Reizdarmsyndroms vom Diarrhoetyp

Es gibt mehrere Möglichkeiten wie die Erkrankung behandelt werden kann. Loperamid: ist ein synthetischer Opioid-Rezeptor-Agonist. Es wird eingesetzt zur Herabsetzung der Kolonperistaltik. (Manabe et al 2010). Es sollte nicht für akut Fälle sondern prophylaktisch eingesetzt werden, weil es nur die Stuhlkonsistenz verbessert und nicht die Intensität der Bauchschmerzen (Lavö et al. 1987).

Eine weitere Gruppe der Medikamente sind die Gallensäure-Komplexbildner: Cholestyramin, Colestipol und Colesevelam. Die verbessern die Stuhlkonsistenz und verringern die Stuhlhäufigkeit dadurch, dass sie die Kolontransitzeit verlangsamen.

(Odunsi-Shiyanbade et al. 2010) Cholestyramin kann oft mit anderen Medikamenten in Wechselwirkung treten und die Nebenwirkungen verursachen. Deswegen kann es oft nicht verträglich sein und als Alternative wird Colesevelam angewendet. (Orekoya et al. 2015)

1.2.5. Konventionelle Therapie von Unterleibsbeschwerden bei Reizdarmsyndrom-Diarrhoetyp

Wie schon erwähnt können auch Spasmolytika eingesetzt werden, wodurch die Kontraktion der glatten Muskulatur herabgesetzt wird.

Pfefferminzöl hat auch relaxierende Wirkung auf die glatte Muskulatur und verbessert die allgemeine Symptome und Unterleibsbeschwerden bei den Patienten mit Reizdarmsyndrom (Khanna et al. 2014).

In der Behandlung können auch trizyklische Antidepressiva, z.B. Amitriptylin eingesetzt werden. Deren Wirkung beruht auf anticholinergen Effekten wodurch sie die allgemeine Symptomatik verbessern (Vahedi et al. 2008).

Außer trizyklischer Antidepressiva können auch SSRI eingesetzt werden, z.B. Tianeptin, der auch gegen Allgemeinsymptomen bekämpft und verursacht auch weniger Mundtrockenheit oder Schläfrigkeit.

1.2.6. Neue Medikamente bei Reizdarmsyndrom-Diarrhoetyp

In der Gruppe neuer Medikamente die für die Behandlung von RDS eingesetzt werden können sind: Alosetron, Eluxadolin und Rifaximin.

Alosetron ist ein 5HT₃-Antagonist und wirkt aufgrund Verlangsamung der Kolontransitzeit (Houghton et al. 2000).

Eluxadolin ist ein gemischter μ -Opioid-Agonist und δ -Opioid-Antagonist und bewirkt durch zusätzliche Hemmung der δ -Opioid-Rezeptoren auch eine Analgesie

(Ananthan 2006). Es verbessert die Stuhlkonsistenz und die Stuhlfrequenz und ist auch gegen Blähungen wirksam (Nee et al. 2015).

Rifaximin ist ein Darm-spezifisches Antibiotikum, der sowohl gegen allgemeine Symptome vom RDS vom Diarrhötyp, als auch gegen Blähungen wirksam ist. In seltenen Fällen kann als Nebenwirkung Obstipation auftreten (Nee et al. 2015).

2. ZIELSETZUNG

Das Ziel des praktischen Teils der Diplomarbeit war die Wirkung einer neu synthetisierten Testsubstanz MAH117.HCl auf die isolierten Meerschweinchenorgane und der potentielle Wirkmechanismus zu untersuchen. Die Substanz wurde am Department für Pharmazeutische Chemie synthetisiert.

Dafür wurden 5 Organe isoliert: Atrium cordis dexter, Musculus papillaris, Arteria pulmonalis, Aorta descendens und Ileum terminalis.

An der quergestreiften Muskulatur vom rechten Vorhof und Papillarmuskel wurde geprüft ob zu einer Änderung der Inotropie beim Papillarmuskel oder Chronotropie beim rechten Vorhof gekommen ist. An der glatten Muskulatur wurde die vasodilatierende Wirkung bei der Aorta und der Arteria pulmonalis, und die spasmolytische Wirkung am Darm untersucht.

Bei jedem Organ wurden mindestens 4 Versuche durchgeführt damit die Ergebnisse verglichen werden können.

Um die Ergebnisse ersichtlicher darzustellen, wurde auch eine graphische Darstellung in Form einer Konzentration-Wirkungskurve dokumentiert und der EC_{50} -Wert konnte ermittelt werden. EC_{50} -Wert ist die halbmaximale effektive Konzentration. Je niedriger der EC_{50} desto besser weil das heißt dass für einen Effekt weniger Substanz notwendig ist.

Der Wirkmechanismus konnte an dem Organ untersucht werden, bei dem die Testsubstanz die stärkste Aktivität gezeigt hat. Nach der Durchführung der Versuchen und graphischer Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve wurde festgestellt dass es sich um das terminale Ileum handelte. Um den Wirkmechanismus zu prüfen wurde Nitro-L-Arginin als Inhibitor der NO-Synthase vor Substanzzugabe eingesetzt.

3. MATERIAL UND METHODIK

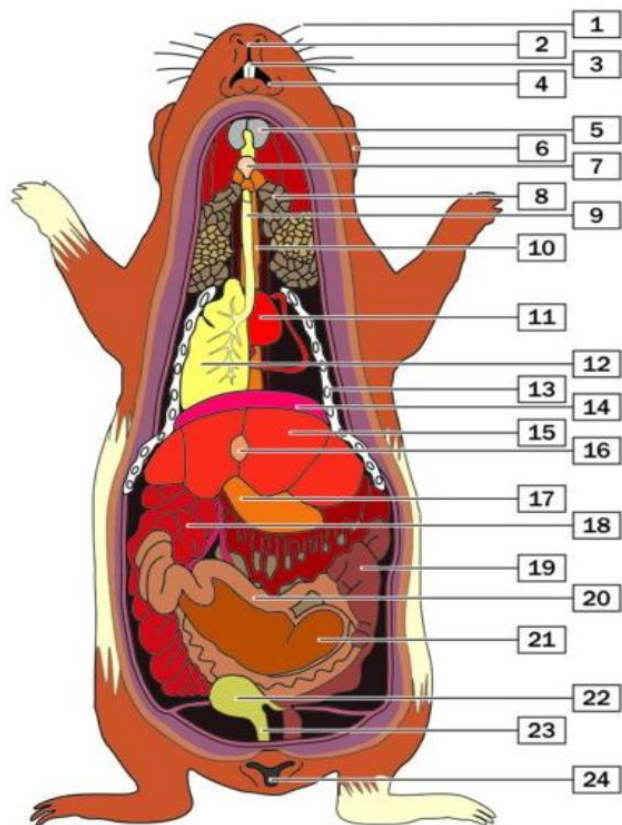
3.1 Versuchstiere

Zur Untersuchung der pharmakologischen Wirkung der Substanz MAH117 HCl wurden für diese Studie Meerschweinchen verwendet, siehe Abb.1. Für die Untersuchung wurden fünf Organe männlicher und weiblicher Meerschweinchen des Stammes "TRIK" isoliert. Wichtig war, dass junge Tiere verwendet werden, ca.4-8 Wochen alt. Sie hatten ein Körpergewicht zwischen 250g und 600g. Gattung "TRIK" ist speziell für Laborversuche geeignet. Es wurden Meerschweinchen zur Testung verwendet weil sich deren Ionenkanäle von den menschlichen am wenigsten unterscheiden und noch ein Grund ist deren für die Laborversuche optimale Größe. Es handelt sich hier um ex-vivo Experimente weil die nicht an lebenden Tieren, sondern an isolierten Organen durchgeführt wurden. Die Anatomie des Tieres ist am besten in der Abb.2 ersichtlich.

Am Anfang jeden Labortags, vor der Entnahme der Organe, wurde ein Tier durch einen gezielten Genickschlag getötet. Nach dem Eintreten des Todes wurde der Thorax und das Abdomen der Tiere mit einer Schere geöffnet.



Abb.1 : Versuchstiere



- | | |
|--------------------------------|---------------------|
| 1: Schnurr-/Tasthaare | 17: Magen |
| 2: Nase | 18: Zwölffingerdarm |
| 3: Zähne (obere Schneidezähne) | 19: Dickdarm |
| 4: Mundhöhle | 20: Dünndarm |
| 5: Lymphdrüsen | 21: Blindarm |
| 6: Ohren | 22: Blase |
| 7: Kehlkopf | 23: Harnleiter |
| 8: Speicheldrüsen | 24: Anus |
| 9: Luftröhre | |
| 10: Speiseröhre | |
| 11: Herz | |
| 12: Lungenflügel | |
| 13: Rippen/Brustkorb | |
| 14: Zwerchfell | |
| 15: Leber (4-teilig) | |
| 16: Gallenblase | |

Abb.2 Anatomie eines Meerschweinchens

3.2. Präparation der isolierten Organe

Nach der Isolierung wurde das Herz in ein Becherglass mit frisch vorbereiteter Nährlösung gelegt. Die Aorta descendens und ca. 25 cm lange Ileum terminale werden getrennt in der Nährlösung aufbewahrt. Der Dünndarm wurde zusätzlich an einem Ende mit einem Bindefaden gebunden, um beide Enden während weiterer Arbeit unterscheiden zu können. Die in der Nährlösung entnommene Organe wurden direkt mit einer Gasmischung aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid versorgt damit ein Absterben von Organen verhindert wird.

Danach erfolgte die Preparation der isolierten Organe. Aufgrund deren geringer Größe wurde die Präparation der Organe mit Hilfe eines Lichtmikroskopes in einer Petrischale durchgeführt. Die Petrischale war auch mit Nährlösung befüllt, um Weiterleben der Organe zu sichern und am Boden mit einer Schicht Kork ausgelegt. Dadurch wurde Organ befestigt während der Präparation mit Präpariernadel. Um ein Aufschwimmen der Korkes zu vermeiden wurde die Korkplatte mit einem Gummiring ausgekleidet.

Für die weitere Aufarbeitung des Organs unter dem Lichtmikroskop wurden Präparierbesteck wie Pinzetten, Spitzscheren und Federscheren verwendet, damit überschüssige Fett- und Muskelgewebe entfernt werden kann. Mit Hilfe der Saugpipetten konnten die unerwünschten Flüssigkeitsbestandteilen entfernt werden. Es war einerseits wichtig so schnell wie möglich zu arbeiten, aber andererseits auch, die Organe während der Präparation nicht verletzt werden.



Abbildung3: Preparationsplatz und Präparierbesteck

3.2.1. Atrium cordis dextrum

Das menschliche Herz ist das zentrale Organ des Blutkreislaufs. Es handelt sich um ein muskuläres Hohlorgan und funktioniert als Druck- und Saugpumpe, die pro Minute etwa 5 bis 6 Liter Blut durch den menschlichen Körper pumpt.

Mit Hilfe des rechten Vorhofs wurde die Auswirkung der Testsubstanz auf die Herzfrequenz (Chronotropie) geprüft. Es war unmöglich den eigentlichen Schrittmacher des Herzens, die Sinusknoten, wegen seiner anatomischen Lage zu isolieren und deshalb verwendet man ganze Vorhof .

Nachdem das Herz aus dem Thorax isoliert war, wurde es zuerst vom überschüssigen Blut gereinigt und dann in die tyrodehaltige Petrischale überführt und an der Herzspitze und Herzbasis mit zwei Präpariernadeln am Korkring fixiert. Danach wurden Perikard, Fettgewebe und Lungengewebe entfernt. Durch einen Schnitt entlang der rechten Koronararterien, Sulcus coronarius, wurde rechter Vorhof von der rechten Kammer getrennt. Es war sehr wichtig dass dieser Schritt vorsichtig durchgeführt wird, damit die Funktion der Sinusknoten, die für die Herzfrequenz die wichtigste Rolle spielt, nicht gestört wird. Um das Präparat in der Apparatur optimal zu befestigen, wurde mit einem Bindefaden ein Silberdrahthäkchen an beiden

Enden des abgetrennten Vorhofs befestigt. Nachdem es präpariert worden ist, wurde das Präparat zur Organbad eingebracht und am Versuchsapparat eingespannt.



Abbildung 4: Vorhof präpariert

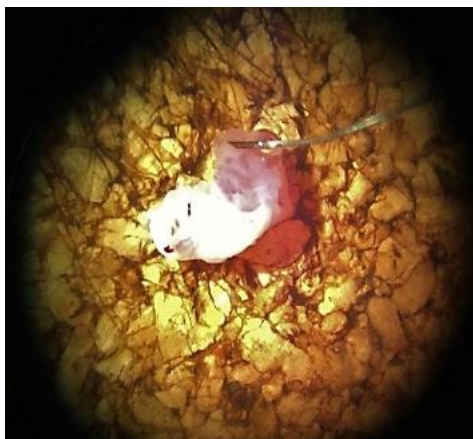


Abbildung 5: Mikroskopischer Blick auf Vorhof

3.2.2. Musculus papillaris

Der Papillarmuskel sind konische Vorstülpungen der Herzmuskulatur in die Herzventrikel, die über Sehnenfäden (Chordae tendineae) mit den Segelklappen

verbunden sind. Im rechten Ventrikel kommen drei, im linken zwei Papillarmuskel vor. Die Kontraktion der Papillarmuskel. (DocCheck)

Nach der Entfernung des rechten Vorhofs und Lungenarterie wurde das Herz weiterpräpariert um die Papilarmuskel zu isolieren. Dafür wurde das rechte Ventrikel entlang des Septums bis hin zur Herzbasis aufgeschnitten, aufgeklappt, in die Tyrodehaltige Petrischale aufgelegt und mit Nadel befestigt. Falls ein Überschuss an Blut vorhanden war, wurde es durch mehrmaliges Austauschen der Nährlösung entfernt. Am Anfang war wichtiger Punkt Purkinje-Fasern zu entfernen weil sie die Freisetzung der Katecholamine (Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin) auslösen könnten, was sich auf die Systole der Papilarmuskel äußern kann und somit die Versuche verfälschen könnte. Dann wurde die Papilarmuskel am oberen Ende mit Silberhäkchen befestigt und der Muskel wird herausgeschnitten, wobei man aufpassen sollte damit es nicht zu einer Überdehnung kommt. Pro Meerschweinchen konnten 3-4 Muskeln verwendet werden (3 von der Trikuspidalklappe, 2 von der Mitralklappe).

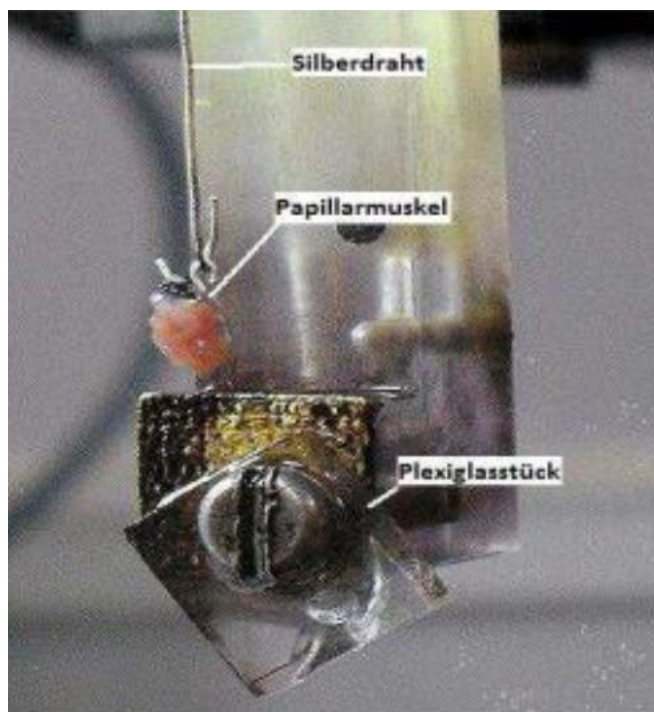


Abbildung 6: Präparierter Papillarmuskel mit Haken

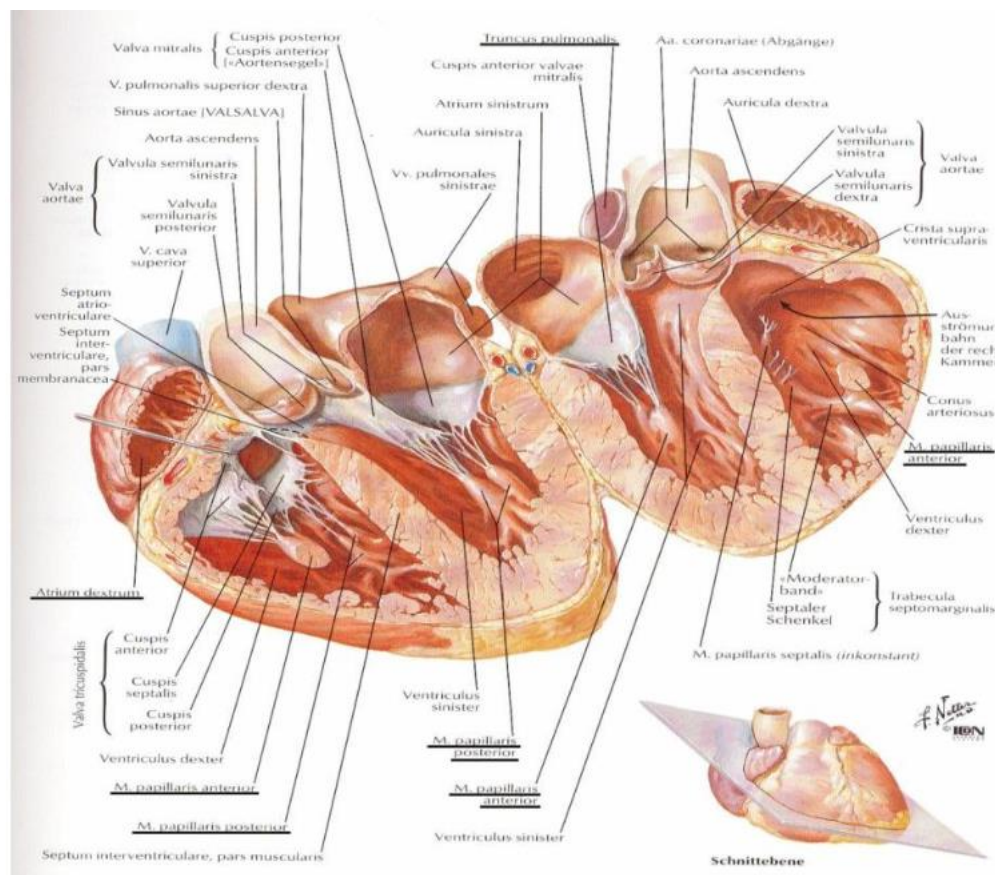


Abbildung 7: Anatomie des Herzens (Netter 2003)

3.2.3. Arteria pulmonalis

Außer für die Isolierung der Papillarmuskel wurde das Herz auch für die Trennung von Arteria pulmonalis verwendet. Der Einschnitt wurde in unmittelbarer Herznähe durchgeführt weil nur ein kleiner Teil, der proximale Teil, der vor der Verzweigung liegt (Truncus pulmonalis), verwendet wurde. Truncus pulmonalis geht vom rechten Ventrikel bis zur Aufteilung zwischen rechter und linker Lungenarterie und führt sauerstoffarmes Blut vom rechten Herzkammer über die Lungenarterie zur Lunge. Lungenstamm war der Teil der Lunge, der verwendet wurde. Nach der Isolierung wurde das kleine Stück in der Petrischale fixiert, damit Fett- und Muskelgewebe und die noch vorhandene Blutzellen entfernt werden können. Die Arteria pulmonalis

wurde dann in ca. 2-4mm breite Ringstücke geschnitten, die dann bis zum Anfang des Versuches in ein Becherglass reingegeben und mit Oxymix versorgt wurden. Die konnten dann ohne Hilfsmittel (ohne Silberdrahthäkchen) direkt als Ring in der Versuchsanordnung fixiert werden.

3.2.4. Aorta descendens

Die Aorta ist Hauptschlagader und nimmt das vom linken Ventrikel ausgeworfenes Blut und transportiert es weiter in den Körperkreislauf. (Mutschler et al.1999)

Es wurde der absteigende Teil der Aorta, Aorta descendens verwendet, der entlang der Wirbelsäule des Tiers läuft. Nachdem das Herz entnommen worden ist, konnte der absteigende Teil der Aorta, eingebettet in Bindegewebe und Fettgewebe, abgetrennt werden. Es befindet sich in paralleler Lage zur Ösophagus. Zur Isolierung wurde die Aorta mit einer Pinzette und Schere entlang der Wirbelsäule herausgeschnitten werden. Es war wichtig, diesen Schritt sehr vorsichtig durchzuführen damit die Aorta nicht zu viel gedehnt wurde. Das hätte sonst die vasokonstriktorische und vasodilatierende Eigenschaften beeinflusst, würde Entstehung zu viel Löcher auslösen und das hätte einen negativen Effekt auf die Versuche gehabt. Die herausgeschnittene Aorta wurde dann in die begaste Tyrode eingelegt und danach wurde das isolierte Präparat in einer Petrischale mit Nadeln an beiden Enden fixiert und mit einer Pinzette und Schere von Fett- und Bindegewebsresten befreit. Dieser Schritt musste sehr vorsichtig durchgeführt werden, um die Verletzung der Aorta zu vermeiden. Die gereinigte Aorta wurde dann in 2-3mm breite Ringe geschnitten, die bis zur Anwendung unter Begasung in physiologischer Lösung eingelegt werden. Die wurden dann später, genau wie Arteria pulmonalis, ohne Silberhäkchen, direkt in der Versuchsanordnung eingespannt.



Abbildung 8: unpräparierte Aorta vor Entfernung von Fett- und Bindegewebe

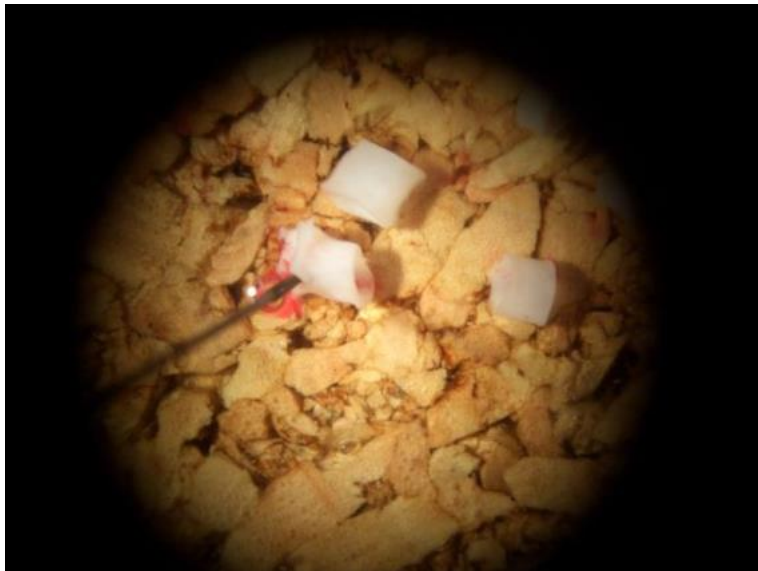


Abbildung 9: Präparierte Aorta descendens unter dem Mikroskop nach der Entfernung von Fett- und Bindegewebe

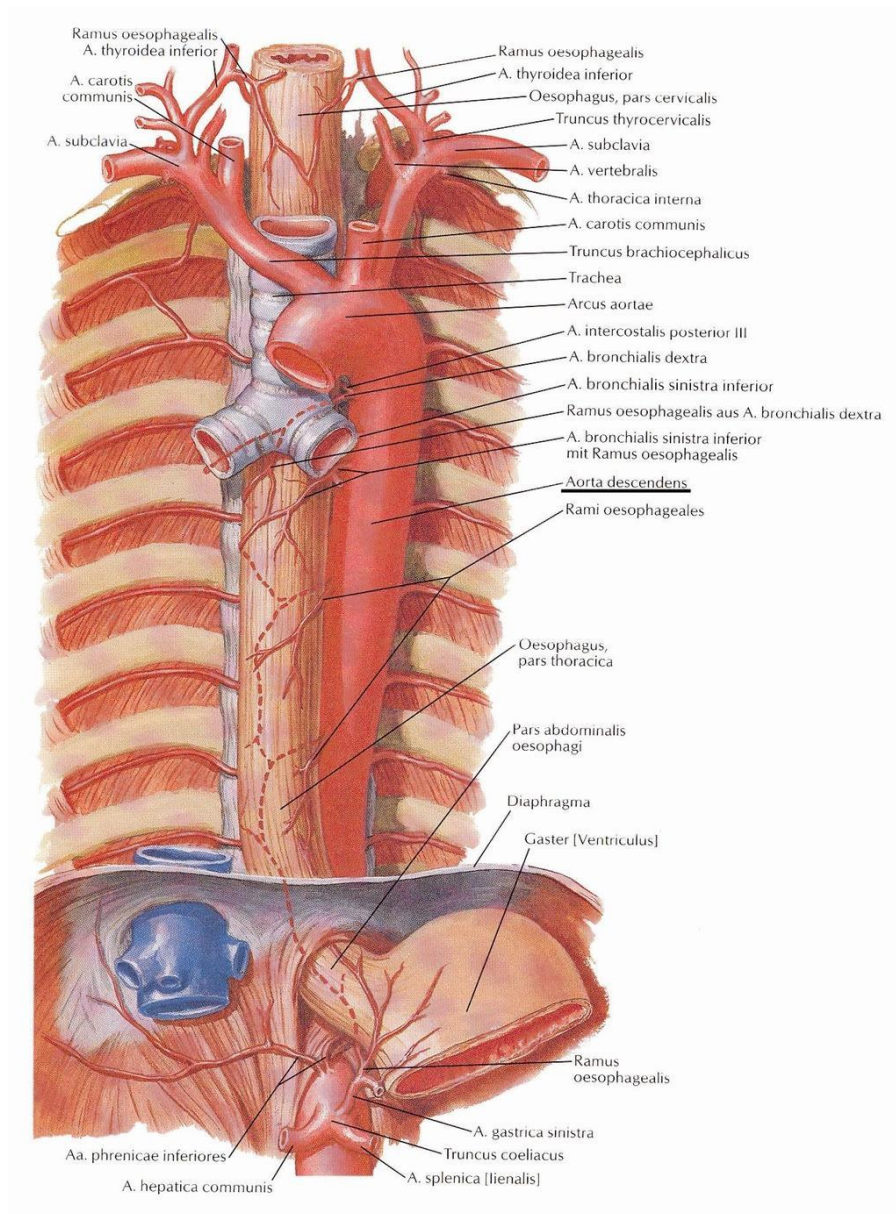


Abbildung 10: Anatomie der Aorta descendens

3.2.5. Ileum terminale

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

Für die Versuche wurde etwa 25cm langes Teil des Ileum terminale aus dem Bauch entnommen. Es wurde am oberen Teil des Darms mit einem Bindefaden gebunden

wegen der Markierung und leichter Entnahme, so dass man beide Teile voneinander unterscheiden kann. Es musste mit Vorsicht gearbeitet werden, um den Darm nicht zu überdehnen, oder die Darmöffnung zu verschließen, was den Durchfluss des Wirkstoffes verhindern würde. Das entnommene Darmstück wurde sofort in die Nährlösung eingelegt. Für die Durchführung der Versuche brauchte man etwa 0,5-1cm langes Darmstück, das in eine Petrischale überführt wurde. Der Darmstück wurde möglichst schräg geschnitten, damit die beiden Enden später leichter mit Präpariernadeln am Korkring befestigt werden können. Nach der Fixierung in der Petrischale wurde der Darm mit einer Pasteurpipette durchgespült, um die verbliebenen Chymusreste zu entfernen. Danach wurde das Ileum, im Gegensatz zu Aorta und Arteria pulmonalis, an beiden Seiten mit Silberdrahtnägeln befestigt, damit es in der Apparatur eingespannt werden kann. Vorbereitete Darmstücke wurden in der Versuchsanordnung bis zum Anfang des Versuches in die Nährlösung eingelegt.



Abbildung 11: Präparierter Ileum terminale

3.3. Physiologische Nährlösung (Tyrode)

Am Anfang jedes Tages wurde eine frische physiologische Nährlösung hergestellt. Diese Lösung geht auf den amerikanischen Pharmakologen Maurice Vejux Tyrode (6.November 1878 in Besancon -1930) zurück.

Es handelt sich um eine blutisotonische Elektrolytlösung auf Wasserbasis, die in Zell- und Gewebekulturen als Verdünnungsmittel verwendet wird und früher als Blutersatz diente. Diese physiologische Lösung war wichtig für die Erhaltung eines körperähnlichen Elektrolytverhältnisses und hatte die Aufgabe die isolierten Organe während der Präparierung und Versuchsdurchführung aufzubewahren und am Leben zu halten. Für die Herstellung wurden bidestilliertes Wasser und schon vorbereitete Stammlösungen eingesetzt.

Tyrode hat folgende Zusammensetzung:

Substanz	Molare Masse (g/mol)	Stocklösung	ml/Stocklösung/l Tyrode	mmol/l
NaCl	58,442	1000,25g/5l	33,60	115,01
KCl	74,550	50,33 g/5l	35,00	4,73
NaHCO ₃	84,010	125,00 g/5l	83,70	24,91
MgSO ₄	120,370	147,02 g/5l	1,18	0,29
KH ₂ PO ₄	136,090	62,00 g/250 ml	1,18	2,15
CaCl ₂	110,980	34,00 g/250 ml	3,20	3,92
Glucose	180,160	Reinsubstanz	1,98	-

Tabelle 1: Zusammensetzung der Nährlösung

Besonders wichtig war die Tyrode täglich frisch vorzubereiten. Für die Versuche wurden gleich 2l hergestellt, weil die Tyrode von 2-3 Studenten gleichzeitig verwendet wurde.

Einwiegen hat mit Glucose angefangen, die dann in ein Messkolbe überführt wurde. Danach wurden weitere Inhaltstoffe, NaCl, KCl und NaHCO₃ mit Hilfe der Bürette,

MgSO₄ und KH₂PO₄ mit Kolbenhubpipetten in 2 l Messkolbe zugegeben. Nach Zugabe aller Bestandteile, außer CaCl₂, wurde Messkolbe mit etwa 80% (bis unter dem Kolbenhals) Aqua bidestillata aufgefüllt und gut geschüttelt, damit es sich gut miteinander vermischt.

Es wurde ein pH- Wert zwischen 7,2 -7,5 eingestellt. Dann wurde die Lösung nächsten 20 min. mit Oxymix begast und gleich nach der Begasung wurde tropfenweise CaCl₂ hinzugefügt, um das Ausfallen der Calciumsalze zu vermeiden. Wäre dazu gekommen, würde eine trübe Lösung entstehen, die für die weitere Durchführung der Versuche nicht anwendbar wäre. CaCl₂ wurde im Kühlschrank gelagert. Oxymix ist eine Mischung aus 95% O₂ und 5% CO₂ und ermöglicht die Aufbewahrung der isolierten Organe und Aufrechterhaltung des pH-Wertes.

Zum Schluss wurde die Nährlösung mit bidestilliertem Wasser bis zum Meniskus aufgefüllt und gründlich geschüttelt, um eine möglichst homogene Mischung zu erzielen.

Substanz	Volumen bzw. Menge
NaCl	67,20 ml
KCl	70,00 ml
NaHCO ₃	167,40 ml
MgSO ₄	2,36 ml
KH ₂ PO ₄	2,36 ml
CaCl ₂	6,40 ml
Glucose	3,96 g

Tabelle 2: Zusammensetzung für 2l Nährlösung

3.4. Vorbereitung der Kaliumchloridlösung

Arteria pulmonalis, Aorta descendens und terminale Ileum könnten eine potentielle vasodilatierende Wirkung zeigen. Um das zu prüfen müssten die vorher maximal kontrahiert werden und das wird durch Zugabe KCl-Lösung erzielt.

Die Vorkontraktionen konnten mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen ausgelöst werden: einer 90 mmolaren KCl für Aorta descendens und Arteria pulmonalis und einer 60 mmolaren KCl für terminale Ileum. Um eine 90 mmolare KCl zu bekommen brauchte man 0,67g KCl und für eine 60 mmolare 0,45g KCl. Beide wurden in einen 100ml Messkolbe mit Tyrodelösung auf 100ml aufgefüllt.

Danach wurden die gut geschüttelt, damit man eine möglichst homogene Lösung bekommt.

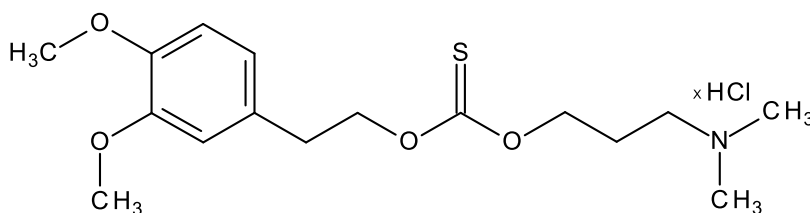
3.5. Testsubstanz

3.5.1 MAH117.HCl

Als Testsubstanz wurde MAH117.HCl verwendet, die am Department für pharmazeutische Chemie synthetisiert worden ist. Die Substanz wurde jeden Tag frisch vorbereitet um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

O-2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethyl O-[3-(dimethylamino)propyl]-thionocarbonat - Hydrochlorid (39)

Strukturformel:



Molekulargewicht: 363,90 g/mol

Farbe: weiß

Summenformel: C₁₆H₂₆ClNO₄S

Die Substanz ist wasserslöslich. Als Lösungsmittel wurde Aqua bidestillata verwendet. Dadurch dass die Substanz hydrophil war, wurde es schnell und vollständig aufgelöst und daher sollte keine weitere Nachbehandlung durchgeführt werden.

Die notwendige Substanzmenge, die eingewogen werden sollte, wurde so berechnet, dass nach Zugabe der Substanz die Konzentration im Organbad 100 $\mu\text{mol/l}$ war.

Die Substanz wurde in unterschiedlichen Konzentrationen im Abstand von 45 min. Hinzugefügt, bis die Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ im Organbad erreicht wurde.

3.6. Versuchsanordnungen

Um die Versuche durchzuführen hatten wir 3 Apparaturen zur Verfügung.

Eine ermöglichte die Überprüfung der Kontraktionskraft von Papillarmuskulatur und die anderen dienten für die Untersuchung von Arteria pulmonalis, Aorta descendens, rechten Vorhofs und terminalen Ileum. Alle drei funktionierten auf dem gleichen Prinzip und unterscheiden sich nur im Aufbau und in der Art der Fixierung.

Voraussetzung für die Durchführung der Versuche waren aufrechterhaltende physiologische Bedingungen. Dazu gehören eine konstante Erhaltung der Temperatur von 37°C (+/-1°C), des physiologischen pH-Wertes, einer konstanten Sauerstoff- und Elektrolytversorgung. Bei Papillarmuskel und dem rechten Vorhof wurde eine konstante Temperatur von 35°C (+/-1°C) aufrechterhalten. Wichtige Punkte für die Ergebnisse der Versuche waren die Sauberkeit der Geräte, tägliche Herstellung frischer Nährlösungen, richtige Einspannen der Organe und kontinuierliche Begassung, um durch Diffusion der Sauerstoffes aus der Nährlösung die Organe am Leben zu erhalten.

Für die mögliche Durchführung der Versuche musste Weiterleben der Organe außerhalb den Organismus gesichert werden. Ex-vivo Versuche wurden über Organbäder durchgeführt. Die hatten ein Volumen von 25ml oder 8ml.

Vor Einspannen sollte Organbad zweimal mit Tyrodelösung gespült werden. Die Organe wurden am Organbad eingespannt, der mit einem Kraftwandler verbunden war. Kraftwandler ermöglicht dass die mechanischen Kontraktionen der Organe (Kontraktionen oder Spasmolyse) in ein elektrisches Signal umgewandelt werden. Elektrisches Signal konnte durch einen Amplifier verstärkt werden und dann über einen Schreiber auf dem Millimeterpapier registriert werden.

Versuchsanordnung

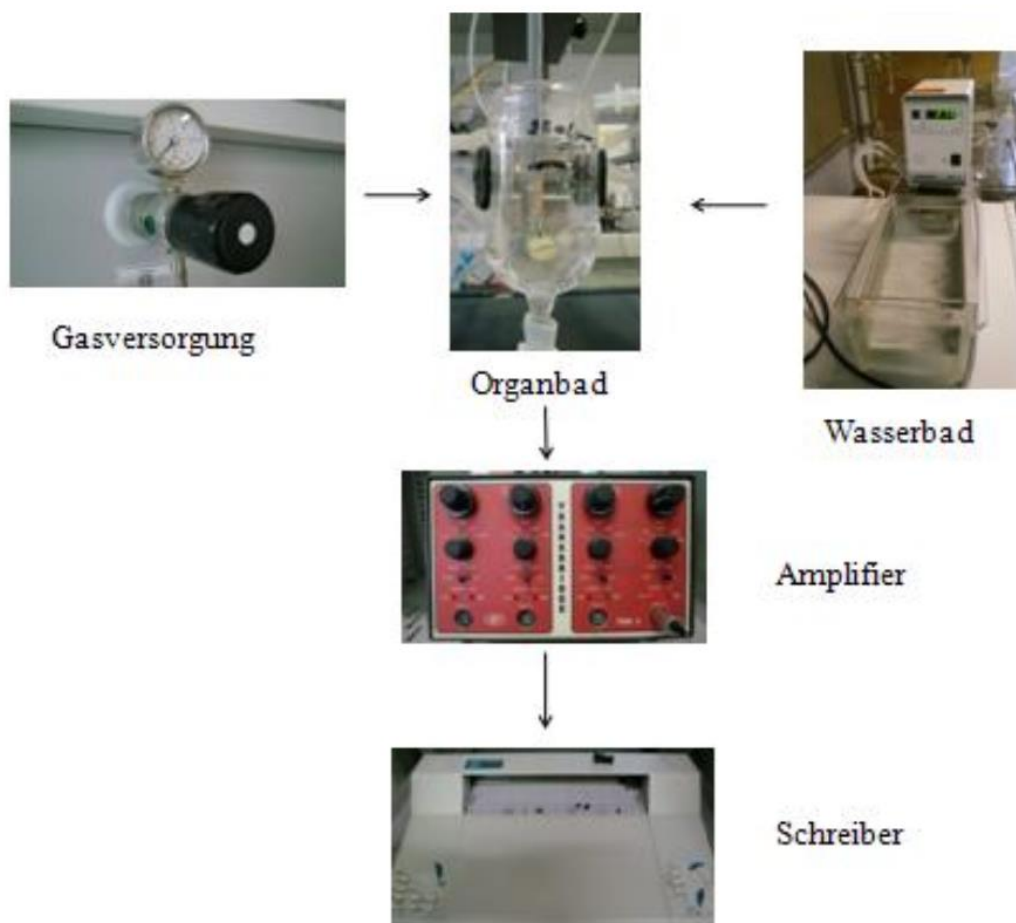


Abbildung 12: Versuchsanordnung

3.6.1. Versuchsaapparaturen

3.6.1.1. Apparatur 1

Beim Apparatur 1 wurde die Inotropie von Papillarmuskel untersucht. Um die Kontraktion der Papillarmuskel auszulösen war eine Reizung notwendig da Papillarmuskel nicht selber spontan aktiviert werden kann. Aus diesem Grund wurde für die Untersuchung von Papillarmuskel diese Apparatur verwendet weil die keine Spontanaktivität besitzt sondern musste über eine Elektrode gereizt werden. Im Herzen erfolgt die Reizung durch den Sinusknoten und im Organbad müssten Stromschläge zugeführt werden. Das erfolgte durch einen Accupulser A310 Stimulator solange bis eine Muskelerregung ausgelöst worden war.

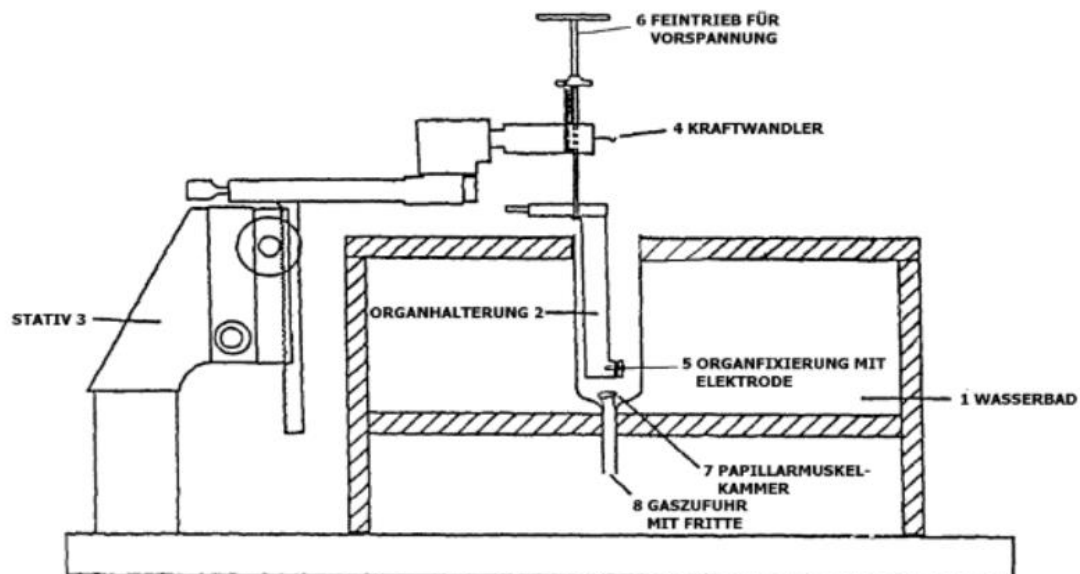


Abbildung 13 : Schematische Darstellung der Apparatur 1

Vor Beginn wurde die Apparatur mit HCl und bidestilliertem Wasser gespült und mit Tyrodelösung aufgefüllt.

Die Apparatur enthält ein Organbad aus Glass oder Kunststoff mit einer Muskelkammer, wo der Papillarmuskel angehängt wurde. Organbad mit einem Fassungsvermögen von 25ml wurde direkt im Wasserbad im erwärmten Wasser eingetaucht. Boden ist mit einer Fritte ausgekleidet wodurch es über einen dünnen Schlauch kontinuierlich mit Oxymix versorgt wurde. Konstanterhaltung der Temperatur wurde über einen Thermostat ermöglicht, der auch im Wasserbad eingetaucht wurde. Diese Apparatur enthält keinen Abfluss und daher musste die Tyrode mit einem Gummischlauch oder einer Plastikspritze abgesaugt werden.

Die Papillarmuskel wurde an einem Ende am Silberdraht angehängt und andere wurde zwischen Platinelektrode und Plexiglasscheibe befestigt. Es sollte mit Vorsicht festgezogen werden damit es nicht zur Verletzung des Muskels kommt. Die Spannung erfolgte solange bis der Muskel parallel zur Organhalterung liegt.

Falls zu einer Kontraktion kommt wurde der Reiz vom Kraftwandler registriert. Registrierter Signal wurde weiter vom Verstärker weitergeleitet und konnte dann über einen Schreiber auf Millimeterpapier übertragen werden.



Abbildung 15: Apparatur 1 Aufbau

3.6.1.2. Apparatur 2

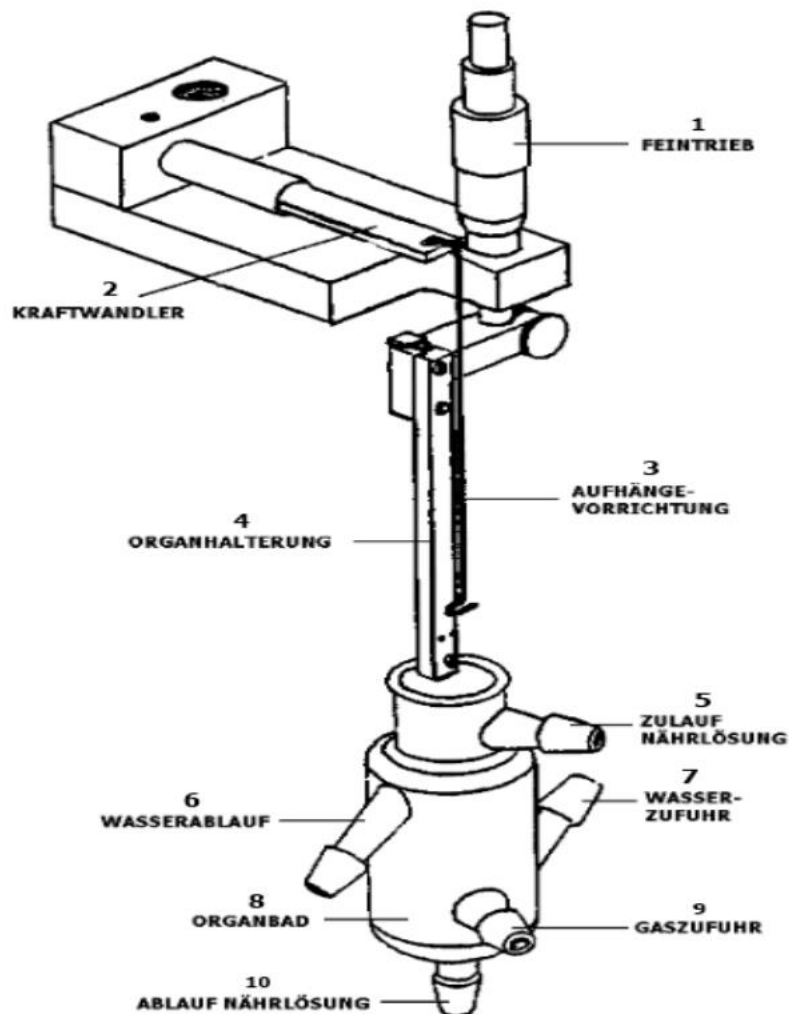


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Apparatur 2

Mit Hilfe der Apparatur 2 wurden die restlichen Organe untersucht. Zuerst wurde das Organbad mit verdünnter HCl und dann Aqua bidestillata gereinigt. Nach der gründlichen Reinigung wurde Präparatkammer mit 25 ml Tyrode aufgefüllt. Um eine ausgeglichene Temperatur der Elektrolytlösung und des Wasserbads zu erzielen musste man ca. 10 Minuten abwarten bevor man die Organe eingespannt hat.

Die zwei Apparaturen funktionieren auf dieselbe Weise vom Kraftwandler bis zum Schreiber. Die unterscheiden sich in Temperatur des aufgewärmten Wasserbads, Aufbau des Wasserbads (hier doppelschichtig im Gegensatz zur einschichtigen beim

Apparatur 1) und dadurch, dass die Organe ohne Stimulator gereizt werden. Organbad besteht aus doppelschichtigem Glasgefäß. Auf diese Weise musste das Organbad nicht im Wasserbad eingetaucht werden weil das erwärmte Wasser über ein Schlauchsystem zwischen den Wänden fließen konnte. Es gab eine Vorrichtung für Wasserzufuhr und Wasserablauf und eine Öffnung, um eine kontinuierliche Gaszufuhr am Organbad zu gewährleisten. Über Wasserablauf am Boden wurde Inhalt aus dem Organbad entfernt.

Die isolierten Präparate wurden an der unteren Seite an der aus Silberdraht Organhalterung befestigt und an der oberen Seite wurden die an eine Aufhängevorrichtung aufgehängt, die mit Kraftwandler verbunden war. Im Gegensatz zu Darm und Vorhof, die mit Häkchen befestigt wurden, konnten Aorta und Arteria pulmonalis aufgrund ihrer ringförmiger Struktur ohne Hilfsmittel direkt an die Aufhängevorrichtung eingebracht werden.

Mit Hilfe des Feintriebs konnte eine maximale Vorspannung eingestellt werden. Das sollte möglichst schnell erfolgen, ohne die Präparate zu verletzen.

In den ersten 20 min. als Adaptionphase wurden 25 ml Tyrode aufgefüllt und die isolierten Organe wurden in das Organbad abgesenkt. Nach 20 min. wurde die Tyrode über einen Ablauf abgelassen. Um eine mechanische Kontraktion des Organs auszulösen hat man 25ml vorbereiteter KCl-Lösung ins Organbad hinzugefügt. Besteht eine Kontraktion, wurde es über Amplifier in ein elektrisches Signal überführt werden und über einen Schreiber wurde dieses Signal auf ein Millimeterpapier übertragen werden.

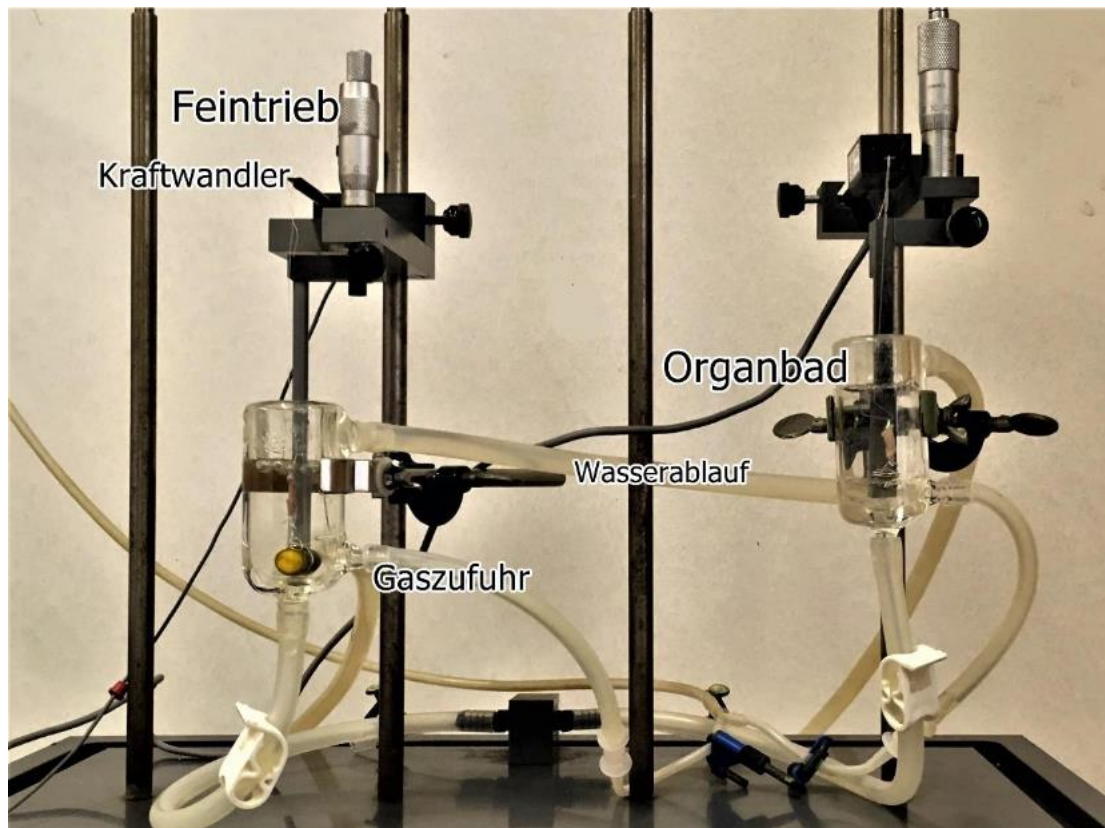


Abbildung 17: Apparatur 2

3.6.1.3. Apparatur 3

Bei der Apparatur 3 wurde die Kurve anders gezeichnet, sonst funktionieren die Apparatur 2 und 3 auf demselben Prinzip. Bei der zweiten Apparatur wurde elektrisches Signal über Verstärker und Schreiber auf einem Millimeterpapier registriert. Bei der dritten wurde Signal über ein Computerprogramm - LabScribe2 dargestellt. Diese Apparatur diente der Untersuchung von Aorta, Arteria pulmonalis und Darm.

Während der Versuche konnten die Aktivitäten der Organe nicht gleich registriert werden weil die nur schwach waren und mussten deshalb mit mehreren Geräten gespeichert werden und als verstärktes elektrisches Signal in Form einer Kurve aufgezeichnet werden.



Abbildung 18: Apparatur 3

3.6.2. Die Gaszufuhr

Damit die isolierte Organe überleben konnten, mussten die kontinuierlich mit Sauerstoff versorgt werden. Das erfolgte durch eine Mischung aus 95% O₂ und 5% CO₂, genannt als Oxymix oder Carbogen. Gas wurde über eine zentrale Glasflasche über Schläuche in das Organbad eingeführt. Der Schlauch ist am Ende von einer Glasfritte besetzt, über die eine homogene Gasstromverteilung ermöglicht wurde, damit die Nährlösung nicht zu stark begast wird. Die Stärke der Begasung wurde durch am Schlauch vorhandene Klemmen reguliert werden

.6.3.Kraftwandler, Verstärker und Schreiber

Kraftwandler wurde benötigt, um die mechanischen Signale, die bei der Untersuchung der isolierten Organe erhalten wurden, in das elektrische Impuls zu umwandeln weil die mechanische Signale nicht dargestellt werden konnten.

Verstärker ermöglichte eine Verstärkung der Intensität des elektrischen Impulses und mittels Schreiber wurden die Impulse auf dem Millimeterpapier aufgezeichnet.

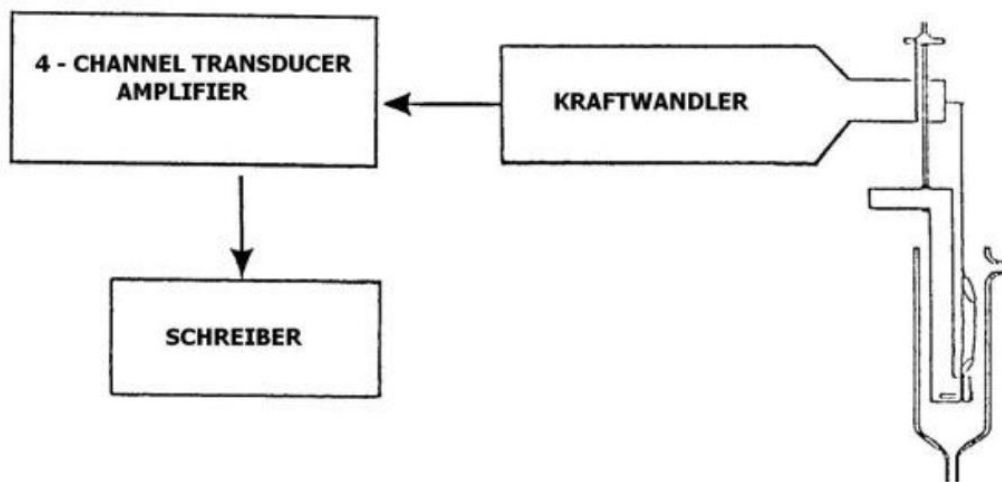


Abbildung 14 : Schematische Darstellung der Signalübertragung

3.7. Versuchsablauf

Pro Organpräparat wurden 5 Versuche durchgeführt, um eine möglichst genaue Auswertung der Ergebnisse zu bekommen. Um die mögliche Kontaminationen zu vermeiden wurden die Organbäder am Ende jeden Tages mit 2% iger HCl und dann mit bidestilliertem Wasser gründlich gespült, damit die Ergebnisse durch andere Substanzen nicht verfälscht werden. Bevor mit dem neuen Versuch angefangen wurde, musste eine konstante Temperatur von 37°C erreicht werden. Nur bei Papillarmuskel sollte eine Temperatur von 35°C erzielt werden.

Die Organbäder wurden danach zuerst einmal mit Tyrode gespült und dann mit 25ml Nährlösung aufgefüllt.

Die Testsubstanz konnte erst nach einer Kontrollphase von ca. 45 min. eingespritzt werden, bzw. solange hat gedauert bis ein Fließgleichgewicht (steady State) erreicht wurde. Wichtig war mit Vorsicht zu arbeiten und die Kraftwandler oder isolierten Organ während des Einspritzens nicht zu berühren weil dadurch Versuch nicht erfolgreich wäre und die Ergebnisse wären verfälscht.

Nachdem das Präparat für 20 min. in der Nährlösung gehalten worden ist, wurde die Triode abgelassen und konnte dann die frisch vorbereitete Kcal-Lösung dazugegeben werden. Kcal ermöglichte die Vorkontraktion der isolierten Organe wodurch die mögliche Vaso dilatierende und spasmolytische Wirkungen erkennbar wären. Bei der Untersuchung von Vorhof und Papillarmuskel wurde keine Kcal-Lösung hinzugefügt. Vorhof ist in der Lage auch spontan zu schlagen ohne zusätzliche chemische Reizung. Bei Papillarmuskel konnte die Reizung durch Elektroden gewährleistet werden.

Als Lösungsmittel wurden Aqua bidestillata und DMSO (Dimethylsulfoxid) verwendet. Die Substanz wurde gewogen und dann abhängig von ihrer Löslichkeit in einer von diesen 2 Lösungsmitteln aufgelöst.

Erst wenn steady state erreicht wurde konnte die Substanz ins Organbad in einem Abstand von 45 min. eingespritzt werden. Falls steady state nach 45 min. nicht eintritt dann musste man abwarten bis es erreicht wurde und das konnte bis maximal 2 Stunden dauern. Der Wert wurde am Millimeterpapier beschriftet und dann wurde 3 µl der Testsubstanz pipettiert, um eine Konzentration von 3 µmol/l im Organbad zu erreichen.

Nach 45 Minuten werden 7 µl der Substanz pipettiert, wodurch eine Konzentration von 10 µmol/l erreicht wurde. Das wurde noch mit 2 Konzentrationen durchgeführt, 20 µl und 7 µl. Die entsprechenden Konzentrationen waren 30 und 100 µmol/l.

Die durch Testsubstanz ausgelösten Veränderungen wurden dann gemessen und am Papier aufgezeichnet.

Zugegebene Menge	Endkonzentration
3 μ l	3 μ mol/l
7 μ l	10 μ mol/l
20 μ l	30 μ mol/l
70 μ l	100 μ mol/l

Abbildung 19 : Pipettierschema

Die notwendige Substanzmenge die eingewogen sein sollte, wurde aus dem Molekulargewicht von MAH 117 ausgerechnet. Das wurde durch 400 dividiert, weil das Fassungsvermögen des Organbads als Anteil von 100 ml darstellt.

Für jedes Organ wurden mindestens 5 Versuche durchgeführt, um die unterschiedlichen Effekte der Testsubstanz auf den 5 isolierten Organen zu überprüfen.

Untersuchte Effekte von MAH 117. HCl auf die isolierte Organe:

- Vorhof : Chronotropie
- Arteria pulmonallis : Vasodilatation
- Aorta descendens : Vasodilatation
- Papillarmuskel: Inotropie
- Terminales Ileum : Spasmolyse

3.7.1. Versuchsablauf auf das Atrium cordis dextrum

Am Vorhof wurde die Herzfrequenz untersucht. Nach der Präparierung wurde der Vorhof vorsichtig mittels Silberdrahtklammer mit Fettgewebe nach oben an der Apparatur eingespannt und in das mit Nährlösung gefüllte Organbad eingelegt und mit Oxymix begast. Die Intensität der Begasung sollte nicht zu stark sein damit Organ nicht geschädigt wird.

Das sollte möglichst schnell gemacht werden damit die Spontanaktivität vom Vorhof und Überlebenszeit nicht beeinträchtigt werden. Aufgrund seiner Spontanaktivität musste Vorhof nicht wie Papillarmuskel elektrisch gereizt werden. Es wurde vorgespannt damit die maximale Kontraktion ausgelöst werden konnte.

Der Schreiber wurde auf 5mV Sensitivität und die Geschwindigkeit der Aufzeichnung von 5 mm/sec eingeschaltet und auf Null eingestellt. Danach wurde Amplifier eingeschaltet wodurch Schreiber nochmal auf Null eingestellt werden musste. Es wurde mittels Feintrieb eine Vorspannung von 10,4 mN angelegt. Nach der Einstellung erfolgte in ersten 45 min. die Kontrollphase. Während der Kontrollphase sollte sich der Vorhof auf die Umgebung der Nährlösung anpassen und eine Konstante Anzahl der Schläge zeigen. Um das zu prüfen wurde alle 5 min. auf ca. 6 cm. des Millimeterpapiers aufgezeichnet. Wenn nach 3-4 Schläge die Frequenz konstant war(die Schläge dürften sich um ± 1 voneinander unterscheiden), war die Kontrollphase abgeschlossen und erst dann konnten die eigentlichen Versuche durchgeführt werden. Die Testsubstanz wurde alle 45 Minuten hinzugefügt und alle 5 Minuten erfolgte eine Kontrollaufzeichnung bis eine Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ im Organbad erreicht worden ist. Um die Herzfrequenz pro Minute zu berechnen wurden die Schläge innerhalb von 6 Kästchen aufgezählt und mit 5 multipliziert.



Abbildung 20 : Im Organbad eingespannter Vorhof

3.7.2. Versuchsablauf am Papillarmuskel

Am Papillarmuskel wurde die Kontraktionskraft untersucht. Der Papillarmuskel hat im Gegensatz zu dem Vorhof keine spontane Aktivität und muss deshalb elektrisch durch ein Reizgerät gereizt werden (Accupulser A310 der Firma WPI, USA). Dadurch wurde ermöglicht, dass dem Muskel alle 15 sec. ein Stromschlag verabreicht wird. Die Stromstärke konnte um max. 10% erhöht werden.

Wichtig war, die Stromstärke nicht zu hoch zu wählen, da dies zu einer Überreizung des Papillarmuskels führen würde. In diesem Fall würden sich der Katecholaminspeicher entleeren (Run down-Effekt) und der Papillarmuskel aufhören zu schlagen. (Furchgott et al. 1959).

Das würde zur Verfälschung des Ergebnisses führen.

Andererseits, falls die Stromstärke zu schwach war, konnten die Kontraktionen nicht gemessen werden.

Papillarmuskel wurde in der Versuchsanordnung 1 eingespannt und dann in das mit Tyrode gefüllte auf 35°C erwärmte Organbad abgesenkt. Der Schreiber wurde auf 5mV eingestellt. Falls die Schlagamplitude zu gering war, konnte die Stromspannung auf 2mV oder 1mV eingestellt werden. Der Muskel wurde mit Hilfe des Feintriebs auf 3,92 mN vorgespannt, was ca. 4 cm auf Millimeterpapier betrug. Nachdem die Vorspannung eingestellt worden ist, musste der Schreiber wieder auf Null gesetzt werden.

Bei der Untersuchung des Papillarmuskels war besonders wichtig zu kontrollieren, dass es im Laufe des Experiments ein Spannungsverlust ausgelöst werden konnte. Das war dadurch sichtbar, dass sich Schreibkopf in den negativen Bereich verschoben hat. Um dadurch eine Verringerung der Kontraktionskraft zu vermeiden, musste die Vorspannung des Organs immer wieder nachjustiert werden. (Reiter 1967)

Für mindestens 45 Minuten wurde die Kontrollphase durchgeführt. Während der Kontrollphase wurden alle 5 Minuten mindesten 5 Kontraktionsamplituden auf dem

Millimeterpapier aufgezeichnet und linear gemessen. Die Länge der Amplituden sollte ≥ 2 cm betragen. Wenn die Länge bei 3 aufeinander folgenden Messungen konstant blieb, konnte die erste Konzentration der Testsubstanz eingespritzt werden, die dann alle 45 Minuten erhöht wurde.

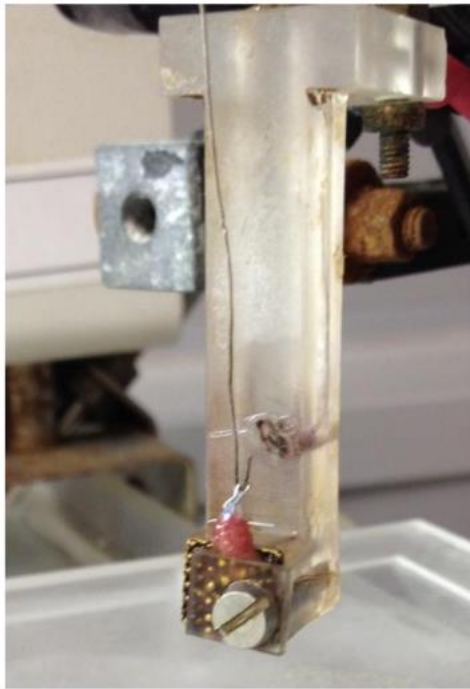


Abbildung 21: eingespannter Papillarmuskel

3.7.3. Versuchsablauf an der Arteria pulmonalis

Bei Arteria pulmonalis wurde die vasodilatierende Wirkung untersucht. Isolierte pulmonale Arterie konnte bei beiden Apparaturen, 1 und 2, eingespannt werden. Die freigelegte Ringe von Arteria pulmonalis wurden in der Apparatur eingespannt, an der unteren Seite an der Organhalterung befestigt und an der oberen Seite an eine Aufhängevorrichtung aufgehängt, mittels Feintrieb vorgespannt und in das mit Tyrode befüllte Organbad abgesenkt.

Amplifier und Schreiber wurden auf Null gestellt und der Schreiber wurde auf eine Stromstärke von 10mV gesetzt. Auf dem Millimeterpapier wurde es auf 10 cm vorgespannt.

In den ersten 20 min. wurde die pulmonale Arteria auf die Tyrode angepasst. Nach der Anpassungsphase wurde die Sensitivität des Schreibers auf 5mV runtergesetzt, auf Null gestellt und die Tyrode abgelassen. Nach der Entfernung der Tyrode wurde das Organbad mit 25ml einer 90 mmolaren KCl-Lösung gefüllt. Dadurch startete die Kontrollphase, die solange dauerte bis die Kontraktionskurve einen konstanten Wert hatte. Mindestens 45 Minuten musste die Kontraktionskurve eine Länge über 5cm haben, bzw. aufsteigen im Computer und über 10 Minuten konstant bleiben.

Erst dann konnte die Testsubstanz in das Organbad alle 45 Minuten eingespritzt werden.

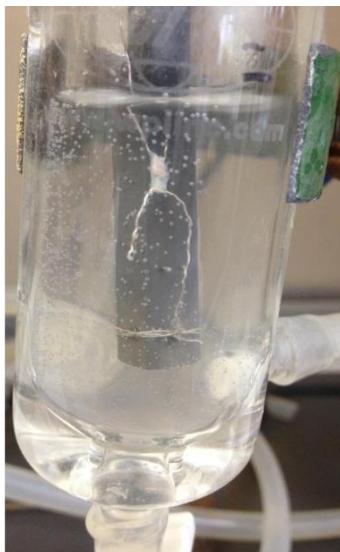


Abbildung 22 : eingespannter Arteria pulmonalis

3.7.4. Versuchsbelauf an der Aorta descendens

Auf Aorta wurden ebenso vasodilatierende Wirkung auf die glatte Muskulatur untersucht. Der Schreiber und Verstärker wurden eingeschaltet und auf Null eingestellt.

Die Versuche sind gleich wie die bei Arteria pulmonalis. Einziger Unterschied bestand in der verschiedenen Vorspannung. Bei der Aortauntersuchung wurde der Schreiber vom Anfang auf 5mV gestellt und blieb auch nach der Anpassungsphase gleich. Sonst wurde Kurvenablauf und Zugabe der Testsubstanz gleich wie bei Arteria pulmonalis durchgeführt.

Die Zugabe der Testsubstanz erfolgte auch erst nach der Kontrollwert nach mind. 45 Minuten einen konstanten Wert aufgenommen hat (steady state). Der Kontrollwert wurde erreicht wenn die graphische Zeichnung des Schreibers über 10 min. eine fast waagrechte Linie zeigte. Um einen Versuch überhaupt zu starten musste die Amplitude des Kontrollwertes auf Millimeterpapier mind. 5cm betragen. Lag sie nach 2 Stunden Kontrolle unter 5cm, bzw. hat sich die steady state nach 2 Stunden nicht eingestellt, dann ist das Versuch zu unterbrechen.

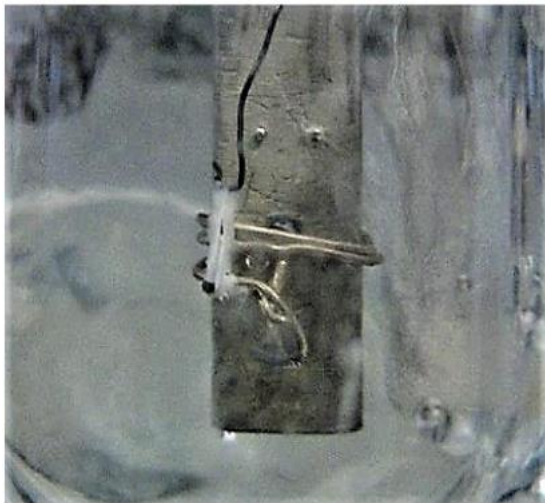


Abbildung 23 : eingespannte Aorta im Organbad

3.7.5. Versuchsablauf am Ileum terminalis

Am Ileum terminalis wurde die spasmolytische Wirkung der Testsubstanz geprüft. Dünndarm wurde mit dem jejunalen Ende in die Apparatur 2 oder 3 eingespannt und in das Organbad abgesenkt und mit Oxymix begast. Danach wurden Schreiber und Amplifier eingeschaltet und mittels Feintrieb auf 5cm vorgespannt und auf Null gestellt. Der Schreiber wurde auf Stromstärke von 5mV und Aufzeichnungsgeschwindigkeit von 1mm /min gesetzt. Danach erfolgte in den ersten 20 min. die Anpassungsphase in der Nährlösung. Nach der Anpassungsphase wurde die Tyrode über eine Ablassvorrichtung abgelassen, der Schreiber wieder auf Null gestellt und 25ml einer 60 mmolaren KCl-Lösung hinzugefügt. Durch die Zugabe von KCl-Lösung konnte Darm maximal kontrahieren. Dadurch hat die Kontrollphase angefangen, die mindestens 45 Minuten dauerte. Das Ileum konnte aufgrund kompletter Kontraktion im Gegensatz zu den anderen Präparaten ein starker Kurvenausschlag zeigen. Bei Darmpräparaten hat die Kurve schnell Maximalkontraktion erreicht, nach ungefähr einer Stunde. Kurve musste mindestens 5cm betragen und über 10 min. konstant bleiben und erst dann konnte die Testsubstanz laut dem erwähnten Schema eingespritzt werden.



Abbildung 24 : isolierter Darm

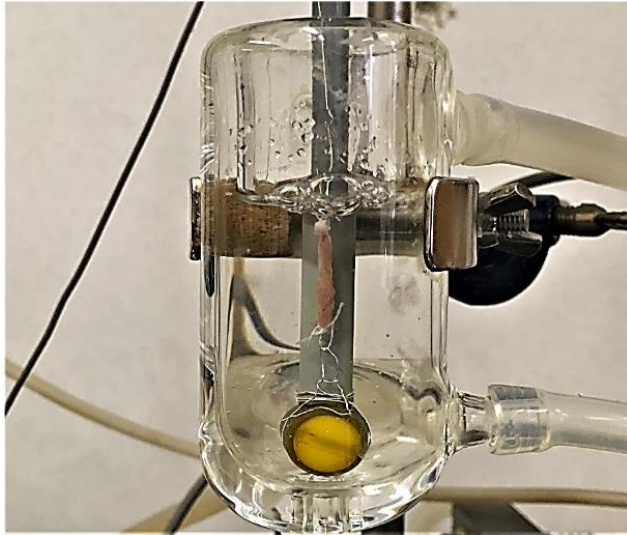


Abbildung 25: eingespannter Darm im Organbad

3.8. Untersuchung des Wirkmechanismus

Durchführung der Versuche hat gezeigt dass die Testsubstanz MAH117 die stärkste Aktivität am terminalen Ileum ausübt. Es konnten eine deutliche muskelrelaxierende Wirkung und EC-50 Wert (jeder Wert mit 50%-iger Wirkung; je niedriger desto besser) festgestellt werden weshalb terminale Ileum zur weiteren Untersuchung des Wirkmechanismus verwendet wurde. Große Rolle spielt hier die NO-Synthase. Es wurde die Stimulierung der NO-Synthase beobachtet und ob dadurch die Wirkung der Testsubstanz ausgelöst wurde. Für diese Überprüfung wurde NO-Antagonist Nitro-L-Arginin eingespritzt. Seine Wirkung besteht darin, dass es die Wirkung von Testsubstanz inhibieren sollte.

Die Untersuchung des Wirkmechanismus war gleich wie bei dem Versuchsablauf am Ileum terminale, bis inklusive KCl-Zugabe. Nach der Zugabe einer 60 mmolaren KCl-Lösung und Erreichen der Plateau Phase im Organbad wurde statt Testsubstanz eine 100 μ M Lösung von NO-Synthase Antagonisten Nitro-L-Arginin.

Nach der Zugabe vom Antagonist wurde für nächsten 45 min. gewartet, bis eine 50 μ M Lösung von Testsubstanz eingespritzt werden kann. Der Versuch wurde dann nach 45 min. beendet.

3.8.1. Nitro-L-Arginin

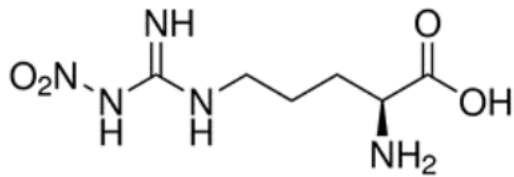


Abbildung: Strukturformel von Nitro-L-Arginin

Um die NO-Synthase des glattemuskulären Dünndarms von Meerschweinchen zu hemmen konnte Nitro-L-Arginin eingesetzt werden. Diese Hemmung ist aber viel signifikanter bei jungen Tieren in Vergleich zu Erwachsenen. (Patel et al. 2010).

Dadurch dass wir für Versuche junge Meerschweinchen verwendet haben, war Nitro-L-Arginin als Inhibitor der NO-Synthase das beste Auswahl.

Stickstoffmonoxid hat eine zentrale Rolle auf die Relaxation des koronaren Durchflusses. Im Rahmen einer Nitro-L-Arginin-Infusion (NLA) wurde nicht nur die Dilatation des koronaren Systems völlig gehemmt, sondern kam es auch zur Kontraktion der Gefäße. Das hat angedeutet, dass Nitro-L-Arginin eine erfolgreiche Hemmung der NO-Synthase verursachte, welche als Mediator der vasodilatierenden Wirkung von Acetylcholin fungiert. Diese Hemmung bezieht sich nicht nur auf die Hemmung der Koronargefäße, sondern auch auf die Hemmung anderer vaskulären Systeme (Brown et al. 1992).

3.9. Auswertung der Ergebnisse

3.9.1. Auswertung am Atrium dextrum

Am rechten Vorhof wurde die Chronotropie (Schlagfrequenz) ausgewertet. Die Schlagfrequenz wurde alle 5 Minuten über 12 Sekunden aufgezeichnet. Das war eine

Strecke von 6cm auf dem Millimeterpapier bei einer Geschwindigkeit von 5 mm/s. Die aufgenommenen Ausschläge innerhalb 6 cm wurden gezählt und mit 5 multipliziert, um die Schlagfrequenz pro Minute zu bekommen.

Der steady-state Kontrollwert erreicht vor der Zugabe der Testsubstanz wurde als Kontrollwert und als 100% genommen. Die Chronotropiewerte die während der Versuche dokumentiert wurden, wurden als prozentueller Anteil des Kontrollwertes berechnet. Abhängig davon ob die Ausschläge pro Minute abnehmen oder zunehmen konnte festgestellt werden ob die Substanz eine positive oder negative chronotrope Wirkung zeigt.

3.9.2. Auswertung am Musculus papillaris

Beim Papillarmuskel wurde die Länge der Amplitude linear gemessen. Abhängig von der Spannung sollte dann die gemessene Länge in cm mit einem Eichfaktor multipliziert werden, damit sie in Kraft (mN) umgewandelt werden kann und damit wir eine Information über die Kontraktionskraft des Organs bekommen. Der konstante Wert wurde vor Zugabe der Testsubstanz wurde als 100% genommen und die darauf folgende Messungen wurden als prozentuelle Anteile des Kontrollwertes aufgenommen. Auf diese Weise konnte festgestellt werden, ob die Testsubstanz einen positiven oder negativen Inotropen Effekt hatte.

Bei einer Länge unter 2cm konnte der Ausschlag durch den Verstärker vergrößert werden. Am Computer wurde die Kurve in Abhängigkeit vom Kraft gezeichnet. Um die bekommene Messungen in cm (1cm = 0,98 mN) umzuwandeln mussten die Messungen mit 1,02 multipliziert werden.

Spannung (mV)	Eichfaktor
2	0,39
5	0,98
10	1,96

Abbildung 26 : Eichfaktoren

3.9.3. Auswertung an der Aorta, Arteria pulmonalis und Ileum terminalis

Welche Auswirkungen hatte die Testsubstanz auf die glatte Muskulatur konnte mit diesen 3 Organen untersucht werden. Es wurde die potentielle vasodilatierende bzw. vasokonstriktorisches Wirkung auf die Gefäße untersucht. Mit Hilfe des terminalen Ileums wurde die spasmolytische Wirkung auf den gastrointestinalen Trakt überprüft.

Bei allen 3 Präparaten wurde KCl-Lösung dazugegeben, um eine maximale Kontraktion auszulösen. Auf dem Millimeterpapier wurde die Gabe von Testsubstanz mit einem Bleistift beschriftet und wenn der Versuch beendet war, wurde die Entfernung der Kontraktionskurve bis zum Nullpunkt linear gemessen. Dieser Wert wurde als 100% aufgenommen und diente somit als Referenzwert. Um die Werte in mN umzuwandeln wurde der Kontrollwert mit dem Eichfaktor 0,98 multipliziert weil 1 cm auf dem Papier 0,98 entspricht.

Bei weiteren Messungen wurden die Abstände von jeder Markierung bis zum Nullpunkt gemessen und mit dem Referenzwert verglichen werden. Durch den Vergleich dieser Werte mit dem Referenzwert konnte die positive oder negative Wirkung der Testsubstanz auf die Kontraktionskraft überprüft werden.

3.10. Statistik

Um die gemessene Ergebnisse statistisch auszuwerten wurde das Programm Sigma-Plot 9.0 verwendet. Hierbei wurden die 5 zu einander passenden Versuche für die statistische Auswertung genommen. Dadurch wurden Mittelwert sowie der Standardfehler und Standardabweichung bei allen Werten berechnet. Es wurde eine graphische Darstellung in Form einer Konzentrations-Wirkungskurve dargestellt. Auf x-Achse wurde die Schlagfrequenz oder die Kontraktionskraft aufgetragen und auf die y-Achse die Konzentration der Testsubstanz in mol/l. Bei einer starken Wirkung konnten über diese graphischen Darstellungen die EC_{50} -Werte berechnet werden. Die EC_{50} entspricht der effektiven Konzentration bei der es zu einer 50%igen Veränderung kommt (Larsen, 2011).

Es wurde ein Signifikanztest (Student-t-Test) durchgeführt um die Werte adäquat beurteilen zu können. Dieser Test definierte, dass die Werte von unter 5% ($P < 0,05$) als signifikant bezeichnet wurden, während die Werte $< 1\%$ ($P < 0,01$) und $< 0,1\%$ ($P < 0,001$) als hochsignifikant bezeichnet wurden.

4. ERGEBNISSE

Hier wurde die Wirkung von der Testsubstanz auf jedes einzelnes Organ näher überprüft, wobei mindestens 5 Versuche pro Organ gemacht wurden. Dann wurde in Abhängigkeit von Resultaten eine Tabelle mit Ergebnissen, eine Konzentrations-Wirkungskurve und eine Originalaufzeichnung aufgezeichnet. Danach wurden die Ergebnisse des Wirkmechanismus an das Ileum terminale dargestellt.

4.1. Wirkung von MAH117 auf das Atrium Cordis dextrum

Am rechten Vorhof wurden 5 Versuche durchgeführt, um eine mögliche Chronotropieveränderung (Schlagfrequenz) zu überprüfen.

MAH117 zeigte am Vorhof eine negative Wirkung auf die Schlagfrequenz, wobei der EC_{50} -Wert nicht erreicht werden konnte. Nach Zugabe jeder Konzentration kam es zu einer Abnahme der Schlagfrequenz, außer im Versuch 3, wo es bei Konzentrationen von 3 $\mu\text{mol/l}$ und 10 $\mu\text{mol/l}$ zu einer leichten Steigerung der Schlagfrequenz kam, danach aber bei 30 $\mu\text{mol/l}$ wieder zur Abnahme.

Die prozentuelle Zunahme oder Abnahme der Schlagfrequenz wurde immer in Bezug auf den Kontrollwert (0%) betrachtet.

MAH117 ($\mu\text{mol/l}$)	f $\pm$ SEM (Schläge/min)	f $\pm$ SEM (%)	Versuche (n)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	225 $\pm$ 11,51	0 $\pm$ 0	5	---
3	219 $\pm$ 8,86	-2,21 $\pm$ 3,30	5	n.s.
10	203 $\pm$ 15,86	-9,24 $\pm$ 6,89	5	n.s.
30	178 $\pm$ 24,05	-20,40 $\pm$ 9,27	5	0,01
100	0 $\pm$ 0	-100 $\pm$ 0	5	0,001

Tabelle 3: Ergebnisse von MAH117. HCl auf den rechten Vorhof

Abkürzungen :

- fc = arithmetische Mittelwerte der Schlagfrequenz in mN und %
- SEM = Standardfehler des Mittelwertes in mN und %

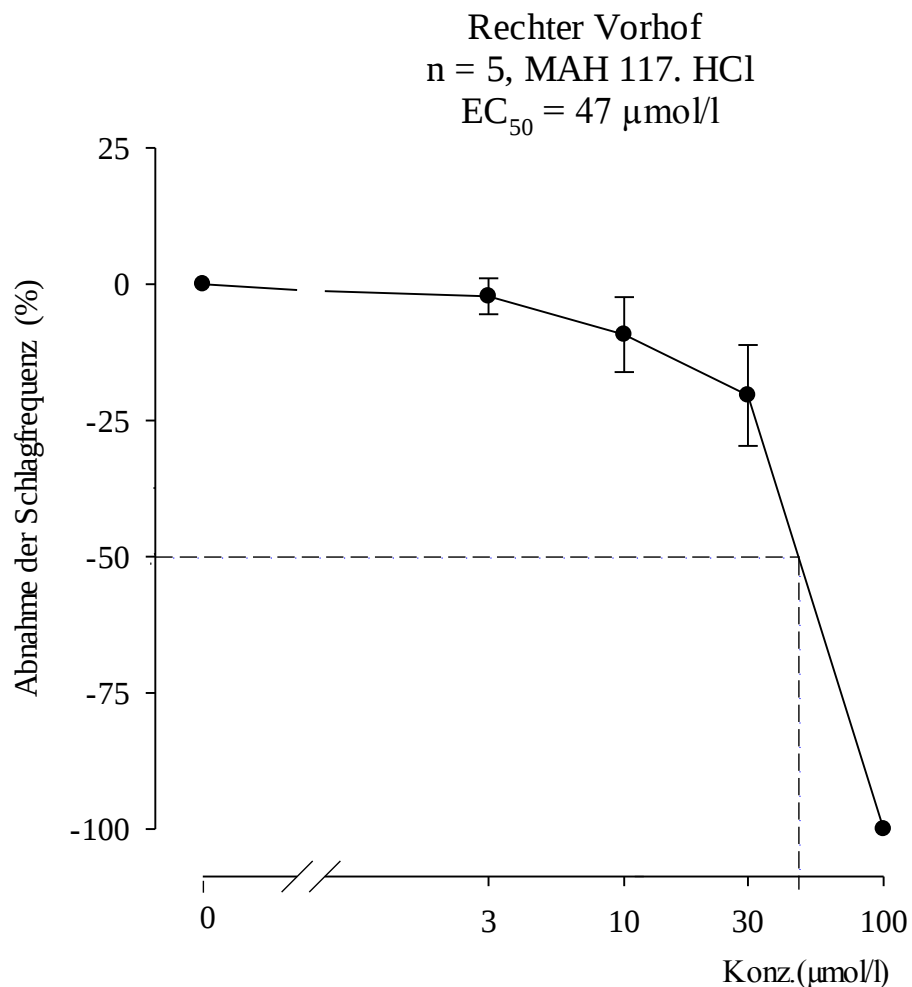


Abbildung 27: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH117 am rechten Vorhof

Das Diagramm zeigt die Wirkung von Testsubstanz MAH117 auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs beim Einspritzen verschiedener Konzentrationen. Auf der x-Achse wurde die eingespritzte Konzentration und auf der y-Achse die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs aufgetragen. Die Punkte entlang der Konzentrations-Wirkungskurve repräsentieren die Mittelwerte der durchgeführten Versuche und die durch diese Punkte laufenden senkrechten Balken, stellen deren Standardfehler dar.

Am Diagramm wurde die Abnahme der Schlagfrequenz noch ersichtlicher dargestellt, wo es schon nach der dritten Konzentration zu einer starken Abnahme und daher zu einer stark negativen chronotropen Wirkung kam. Aus der Konzentrations-Wirkungskurve konnte auch EC₅₀-Wert abgelesen werden und der beträgt 47 µmol/l.

4.2. Wirkung von MAH117 auf den Musculus papillaris

Um die Wirkung der Testsubstanz auf die Inotropie zu untersuchen wurden 4 Versuche mit Papillarmuskel durchgeführt. Aus diesen Versuchen wurden die Mittelwerte der Inotropie (in mN und Prozent) und deren Standardfehler ausgerechnet. Die Mittelwerte, deren Standardfehler und die Irrtumswahrscheinlichkeit wurden in der Tabelle dargestellt.

Nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen wurde eine ausgeprägte Abnahme der Kontraktionskraft dokumentiert, also eine stark negative inotrope Wirkung.

MAH117 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	1,01 $\pm$ 0,07	0 $\pm$ 0	4	---
3	0,68 $\pm$ 0,09	-33,93 $\pm$ 5,34	4	0,05
10	0,52 $\pm$ 0,09	-49,40 $\pm$ 6,15	4	0,05
30	0,23 $\pm$ 0,04	-77,39 $\pm$ 4,19	4	0,01
100	0,05 $\pm$ 0,01	-94,87 $\pm$ 1,47	4	0,001

Tabelle 4: Ergebnisse von MAH117 am Papillarmuskel

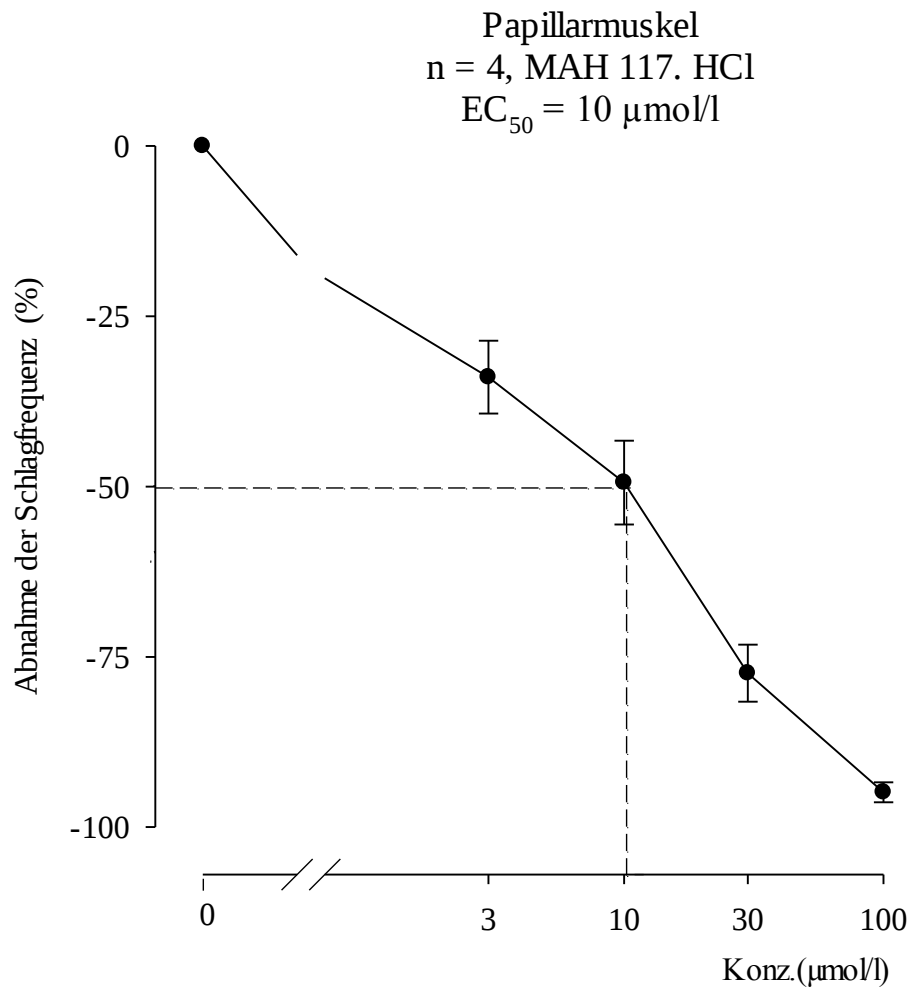


Abbildung 28 : Konzentrations-Wirkungskurve von MAH 117 auf den Papillarmuskel

In diesem Diagramm wurde die Wirkung der Testsubstanz auf die Inotropie graphisch dargestellt. Auf der x-Achse wurde die Konzentration und auf der y-Achse die prozentuelle Änderung der Kontraktionskraft aufgetragen. Die Punkte entlang der Kurve sind arithmetische Mittelwerte und die senkrechte Balken deren Standardfehler. Das Diagramm veranschaulicht eine deutliche Abnahme der Kontraktionskraft wodurch sich auch EC₅₀-Wert ablesen lässt und es lag bei 10 µmol/l.

4.3. Wirkung von MAH117 auf Aorta descendens

An der Aorta wurde eine potentielle vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz auf die glatte Muskulatur überprüft. Es wurden 6 Versuche durchgeführt woraus die Mittelwerte und deren Standardfehler in mN und Prozent angegeben wurden. Angegeben wurde in der Tabelle auch die Irrtumswahrscheinlichkeit. Die Auswirkung der Testsubstanz ist unter 50% gelegen weshalb das Ablesen des EC₅₀-Wertes nicht möglich war.

MAH117 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	12,35 $\pm$ 1,74	0 $\pm$ 0	8	---
3	12,15 $\pm$ 2,02	-4,60 $\pm$ 6,01	8	n.s.
10	11,85 $\pm$ 1,81	-5,11 $\pm$ 2,30	8	n.s.
30	10,81 $\pm$ 1,67	-13,35 $\pm$ 3,10	8	0,05
100	73,83 $\pm$ 7,25	-26,17 $\pm$ 7,25	8	0,05

Tabelle 5: Ergebnisse von MAH 117 an der Aorta descendens

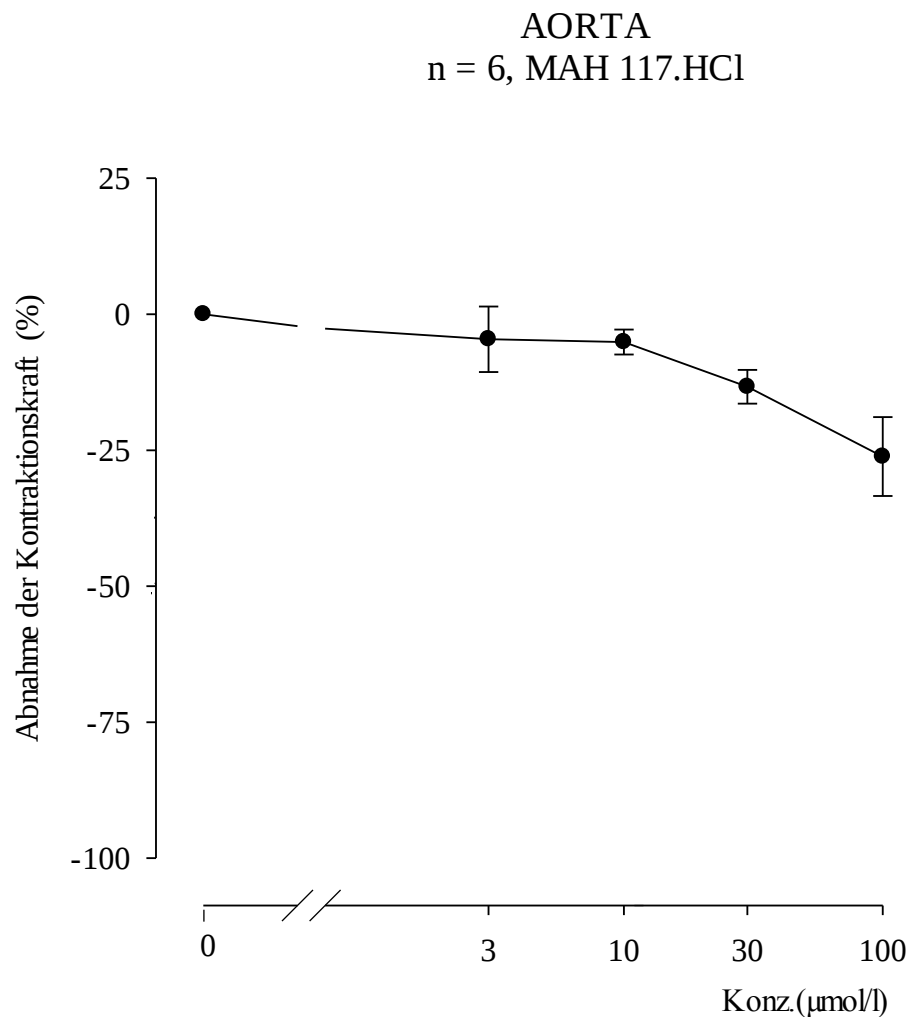


Abbildung 29: Konzentration-Wirkungskurve von MAH117 auf Aorta descendens

Auf der X-Achse wurde die steigende Substanzkonzentration und auf y-Achse die Kontraktionskraft aufgetragen. Die Punkte entlang der Kurve definieren Mittelwerte des jeweiligen Versuchs und die senkrechte Balken deren Standardfehler.

Diagramm zeigte, dass die Testsubstanz keine starke Wirkung auf Aorta ausübte und eine Konzentrationssteigerung führte zu einer leichten Abnahme der Kontraktionskraft. Aufgrund graphischer Darstellung konnte man noch besser sehen dass keine Ausrechnung des EC50-Wertes möglich war.

4.4. Wirkung von MAH117 auf Arteria pulmonalis

Auf Arteria pulmonalis wurden 5 Versuchen durchgeführt wodurch die vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz auf isolierte Lungenarterie untersucht wurde.

In der Tabelle wurden Mittelwerte der jeweiligen Versuche in mN und in Prozent, deren Standardfehler und die Irrtumswahrscheinlichkeit angegeben.

Aus der Tabelle konnte man eine leichte Abnahme der Kontraktion ablesen, die sich nach der Zugabe der dritten und vierten Konzentration erhöht hat. Es wurde knapp unter 50% gelegen weshalb EC_{50} -Wert nicht erreichbar war.

MAH117 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	9,06 $\pm$ 1,08	0 $\pm$ 0	5	---
3	9,07 $\pm$ 1,11	0,07 $\pm$ 0,48	5	n.s.
10	8,78 $\pm$ 1,26	-4,10 $\pm$ 3,99	5	n.s.
30	7,78 $\pm$ 1,57	-17,12 $\pm$ 9,64	5	0,05
100	5,41 $\pm$ 1,21	-43,09 $\pm$ 7,15	5	0,05

Tabelle 6 : Ergebnisse von MAH117 auf die pulmonale Arterie

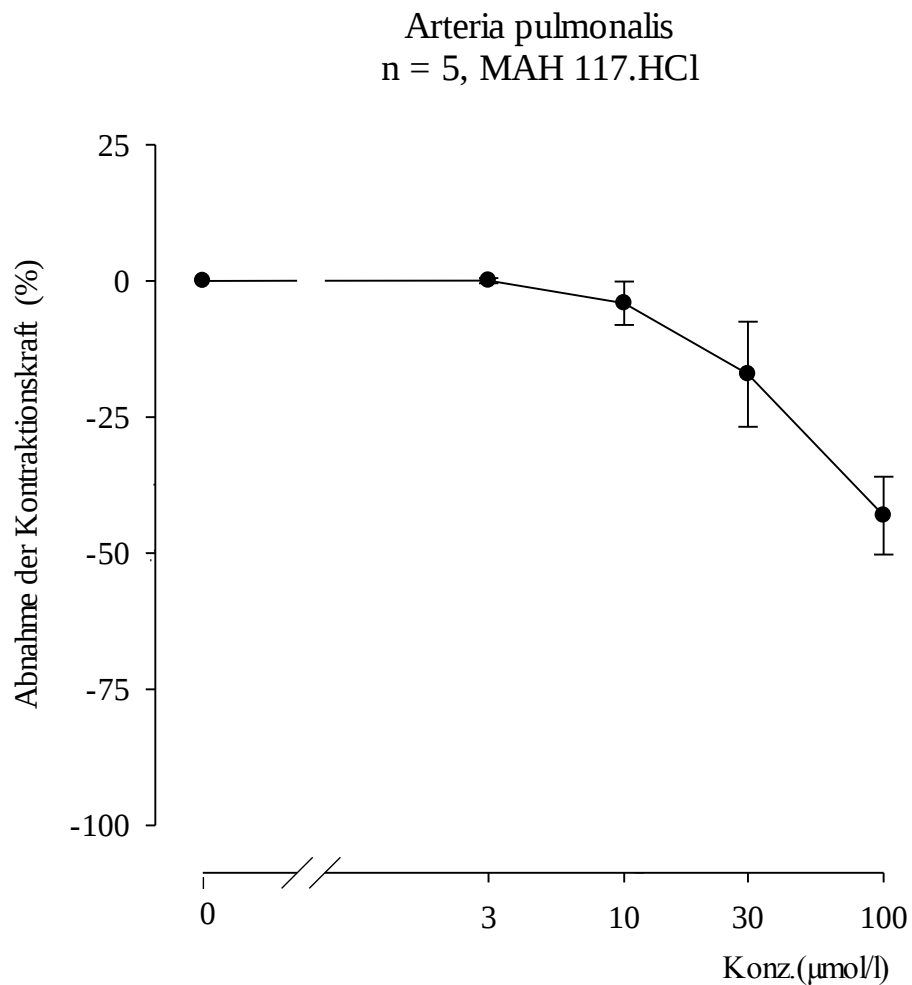


Abbildung 30: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH117 auf die Arterie pulmonales

Aus der graphischen Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve konnte eine leichte Vaso dilatierende Wirkung der Testsubstanz auf die Lungenarterie festgestellt werden. Nach der Zugabe der dritten und vierten Konzentration wurde die reklamierende Wirkung erhöht, lag aber knapp unter 50% weshalb ein EC_{50} -Wert nicht erreichbar war.

Auf der x-Achse wurde die zunehmende Konzentration in mol/l und auf der y-Achse die abnehmende Kontraktionskraft in Prozent aufgetragen. Die schwarzen Punkte bezeichneten die Mittelwerte der Kontraktionskraft und die senkrechten Balken deren Standardfehler.

4.5. Wirkung von MAH117 am Ileum terminales

An dem isolierten Ileum terminale wurden 5 Versuchen durchgeführt wodurch die spasmolytische Wirkung der Testsubstanz untersucht wird. Die Testsubstanz hat hier die stärkste Wirkung ausgelöst. Als Kontrollwert wurde die konstant gebliebene maximale Kontraktion genommen, die nach Kcal-Zugabe sichtbar war. Die zunehmende spasmolytische Wirkung der Testsubstanz wurde im Verhältnis zu dem Wert in Prozent ausgerechnet.

MAH117 ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Versuche (n)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	6,53 $\pm$ 0,47	0 $\pm$ 0	5	---
3	5,57 $\pm$ 0,64	-15,43 $\pm$ 4,83	5	0,05
10	4,35 $\pm$ 0,42	-33,57 $\pm$ 3,46	5	0,05
30	2,08 $\pm$ 0,37	-68,01 $\pm$ 5,75	5	0,01
100	0,04 $\pm$ 0,04	-99,39 $\pm$ 0,61	5	0,001

Tabelle 7: Ergebnisse von MAH117 am Ileum terminalis

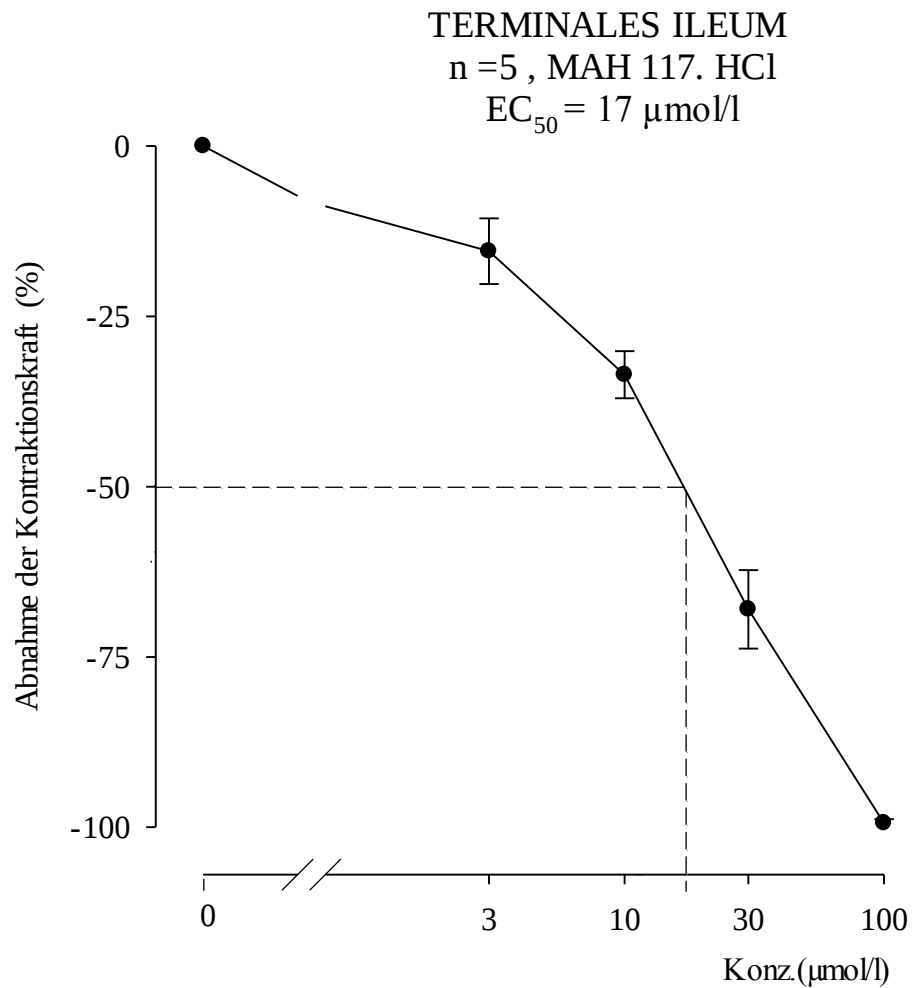


Abbildung 31: Konzentration-Wirkungskurve von MAH 117 am Ileum terminalis

Die graphische Darstellung der Konzentration-Wirkungskurve zeigte, dass die Testsubstanz am Dünndarm eine starke spasmolytische Wirkung mit zunehmender Konzentration auslöst. Auf x-Achse wurde die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ und auf y-Achse die abnehmende Kontraktionskraft in Prozent. Schwarze Punkte bezeichneten Mittelwerte der Kontraktionskraft und die laufenden senkrechten Balken deren Standardfehler. Aufgrund einer starken spasmolytischen Wirkung der Testsubstanz konnte EC_{50} -Wert mit einer senkrechten Linie abgelesen werden und beträgt $17 \mu\text{mol/l}$ (je niedriger desto besser).

4.6. Wirkung von MAH117 am Ileum terminalis in Anwesenheit des Inhibitors Nitro-L-Arginin

Nach Untersuchung der Testsubstanz auf alle 5 Organe war deutlich, dass die Testsubstanz MAH117 die stärkste Wirkung am Dünndarm ausgelöst hat. Die zunehmenden Konzentrationen führten zu einer starken Verringerung der Kontraktionskraft. Daher wurde Dünndarm für die weitere Untersuchung des Wirkmechanismus verwendet.

Es wurde untersucht ob die spasmolytische Wirkung der Testsubstanz auf NO-Freisetzung durch die NO-Synthase beruht. Aus diesem Grund wurde ins Organbad Nitro-L-Arginin hinzugefügt, bevor die Substanz eingespritzt wurde. Nitro-L-Arginin ist ein Antagonist der die NO-Synthase blockieren sollte. Auf diese Weise konnte man feststellen ob die Wirkung von der Testsubstanz im Zusammenhang mit der NO freisetzenden Wirkung stand.

Nach der Zugabe von KCl und Abwarten bis die maximale Vorkontraktion einen Konstanten Wert aufgenommen hat wurde in das Organbad Nitro-L-Arginin hinzugefügt. Nach 45 Minuten wurde die Substanz eingespritzt, damit man feststellen konnte ob die spasmolytische Wirkung der Testsubstanz weiter zugenommen hat.

Tabelle 8: Ergebnisse von MAH117 am Ileum terminalis in Anwesenheit von Nitro-L-Arginin

Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	$f \pm \text{SEM}$ (mN)	Versuche (n)	Irrtumswahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$6,88 \pm 0,60$	4	---
100 NLA	$6,84 \pm 0,67$	4	---
20 MAH117.HCl	$4,19 \pm 0,10$	4	0,05

**Darm, Nitro-L-Arginin (100µM)
MAH117.HCL, 20 µmol/l
n=4**

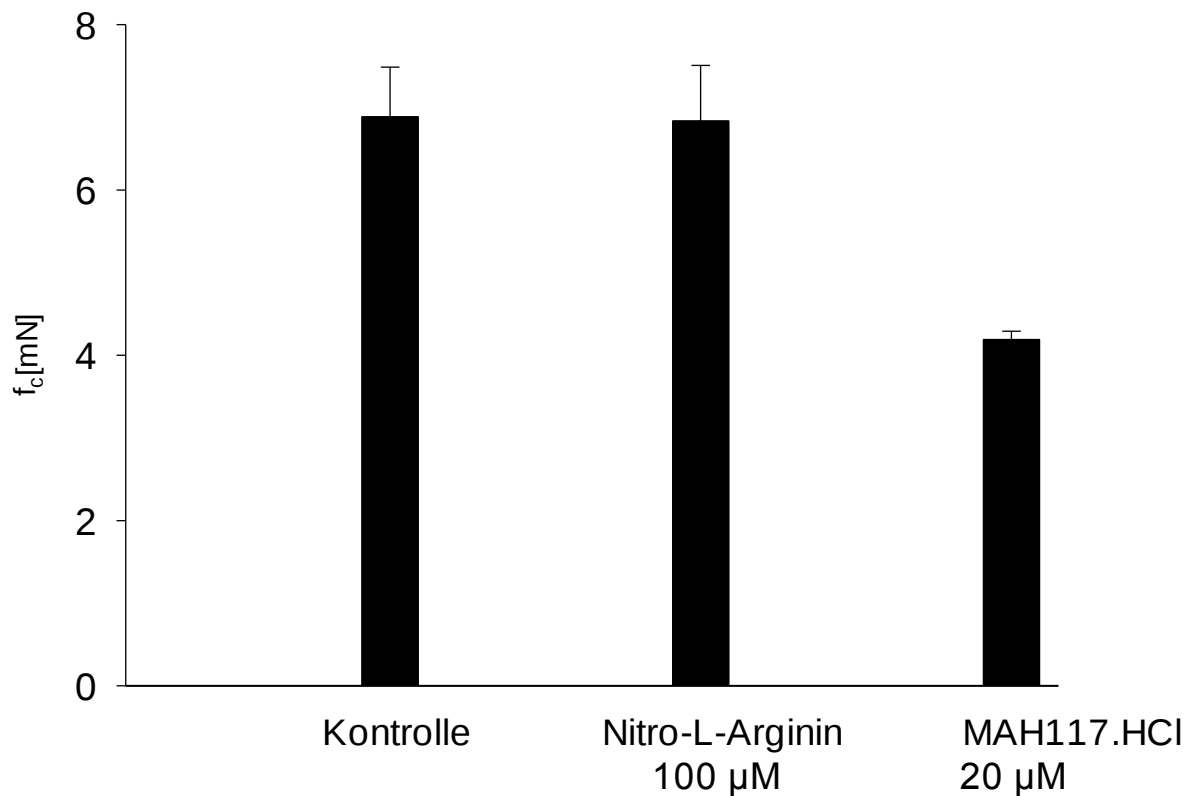


Abbildung 32: Graphische Darstellung des Wirkmechanismus von MAH117 am terminalen Ileum in Anwesenheit von Nitro-L-Arginin

In der Graphik wurden die unterschiedlichen Versuchsspalten aufgetragen: Die Kontrolle, die 100 µM Antagonist Nitro-L-Arginin und als letzte 20 µM MAH117.

Auf der Y-Achse wurde die Kontraktionskraft des Darms in mN aufgetragen. Die auf diesen 3 Spalten bestehenden senkrechten Balken sind Standardfehler.

Aus dieser Graphik konnte festgestellt werden, dass die Kontraktionskraft des Darms auch nach Zugabe des Antagonisten abnimmt. Das würde bedeuten, dass die spasmolytische Wirkung der Testsubstanz nicht auf NO-Synthese beruht weil dieses Enzym noch vor Gabe der Substanz blockiert worden ist.

5. DISKUSSION

Die Zielsetzung des praktischen Teils der Diplomarbeit war aufgrund der isolierten Meerschweinchenorgane ein pharmakologisches Profil der neusynthetisierten Testsubstanz MAH 117.HCl genauer zu betrachten. Dadurch dass man einen potentiellen Wirkstoff für menschlichen Organismus gewinnen wollte, wurden für diesen Zweck die Meerschweinchen ausgewählt wegen der größten Ähnlichkeit zwischen deren Ionenkanäle der Gefäße und den menschlichen. Sie waren auch wegen deren Größe optimal für die Arbeit und leichtere Handhabung. Die Herzmuskulatur besteht aus quergestreiftem Gewebe und ermöglicht die Untersuchung der Inotropie und Chronotropie. Das wurde an 2 Herzorganen, Atrium cordis dexter und Musculus papillaris durchgeführt. Andererseits, anhand der glatten Muskulatur können die vasodilatierende und spasmolytische Wirkungen überprüft werden. Aus der glatten Muskulatur wurden für die Untersuchungen Aorta Deszendenz, Arterie pulmonales und Ileum terminale verwendet.

In diesem Kapitel wurden die Ergebnisse der beschriebenen Versuche miteinander verglichen.

5.1.Wirkung von MAH117.HCL auf die quergestreifte Muskulatur

Um zu prüfen ob eine potentielle positive oder negative inotrope und chronotrope Wirkungen vorhanden waren, wurde die quergestreifte Muskulatur vom rechten Vorhof und Papilarmuskulatur untersucht.

Isoliertes Organpräparat	$f (f_c) \pm \text{SEM} (\%)$ bei 100 $\mu\text{mol/l}$	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
Atrium dexter	$-100,00 \pm 0,00$	47
Musculus papillaris	$-94,87 \pm 1,47$	10

Tabelle 9: Wirkung von MAH117.HCl auf die Präparate der quergestreiften Herzmuskulatur

Die Tabelle zeigt eine Abnahme der Inotropie und Chronotropie durch Zugabe der Testsubstanz in Prozent und Standardfehler. Sowohl beim rechten Vorhof als auch bei Papillarmuskel war die Wirkung stark und wurde eine Abnahme der Kontraktionskraft ausgelöst. Beim Papillarmuskel, das extern durch eine Elektrode gereizt werden musste, war die abnehmende Wirkung kontinuierlich schon nach der ersten bis zur letzten Konzentration.

Beim rechten Vorhof war das nicht der Fall. Vorhof war der einzige Organ der nicht eine externe Reizung benötigt hat, aufgrund der Spontanaktivität des Sinusknotens. Nach ersten 2 Konzentrationen kam nur zu einer leichten Senkung, nach der dritten zu etwa größeren Abnahme und erst nach der letzten Zugabe der Testsubstanz kam abrupt zu einer starken Abnahme, wodurch zum Stillstand des Herzens gekommen ist.

Somit kann man schließen, dass die Testsubstanz eine negativ chronotrope und inotrope Wirkung zeigte. Als 100%-iger Referenzwert wurde die Kontrollphase von jedem Versuch vor Zugabe der Testsubstanz bezogen.

Aufgrund signifikanter Wirkung konnte EC_{50} -Wert, also die halbmaximale effektive Konzentration berechnet werden. In Bezug auf diese Konzentration konnte die Wirkung von MAH117.HCl an den isolierten Präparaten definiert werden.

5.2. Wirkung von MAH117.HCl auf die glatte Muskulatur

Damit die Wirkung von der Testsubstanz auf die Gefäße und den GIT überprüft werden kann müssen die dafür vorher mit KCl-Lösung vorkontrahiert werden. Erst dann konnten durch zunehmende Substanzkonzentrationen die vasodilatierende Wirkung auf Arteria pulmonalis und Aorta descendens und spasmolytische Wirkung auf den terminalen Ileum getestet werden.

Isoliertes Organpräparat	$f(f_c) \pm \text{SEM} (\%)$ bei 100 $\mu\text{mol/l}$	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
Arteria pulmonalis	$-43,09 \pm 7,15$	> 100
Aorta descendens	$-26,17 \pm 7,25$	> 100
Ileum terminale	$-99,39 \pm 0,61$	17

Tabelle 10: Wirkung von MAH117.HCl auf die glatte Muskulatur

Auf die Organe der glatten Muskulatur bewirkte die Testsubstanz unterschiedliche Wirkungen.

Bei Arteria pulmonalis und Aorta descendens zeigte die Substanz nicht signifikante Wirkungen. besonders schwach war der Effekt bei Aorta mit einer Abnahme der Kontraktionskraft um nur $-26,17 \pm 7,25$.

Bei pulmonaler Arterie wurde etwa stärkere Wirkung ausgeübt, mit einer Abnahme der Kontraktionskraft um $-43,09 \pm 7,15$, was aber wieder knapp unter 50% war. Also, in beiden Fällen war die Wirkung nicht ausreichend um eine halbmaximale effektive Konzentration berechnen zu können und somit konnte der EC_{50} -Wert nicht ermittelt werden.

Beim Ileum terminale hat die Substanz eine starke Wirkung gezeigt. Bei der ersten Konzentration kam zu einer Abnahme der Kontraktionskraft um $-15,43 \pm 4,83$. Bei der zweiten hat sich das verdoppelt, auf $-33,57 \pm 3,46$ und bei der dritten Konzentrationzugabe lag die wurde die Kontraktionskraft um $-68,01 \pm 5,75$. Bei der letzten Konzentration wurde die Kontraktion um $-99,39 \pm 0,61$. Die halbmaximale Konzentration war mit 17 $\mu\text{mol/l}$ erreichbar.

5.3. Wirkmechanismus von MAH117.HCl am terminalen Ileum

Wie schon erwähnt, dadurch dass die Testsubstanz die beste Wirkung am isolierten Darm zeigte, wurde es ausführlicher untersucht, um Wirkmechanismus näher zu untersuchen.

Ein möglicher Zusammenhang war zwischen der spasmolytischen Wirkung der Testsubstanz und der NO-Synthase. Es sollte getestet werden, ob die NO-Synthase einen Einfluss auf die spasmolytische Wirkung der Testsubstanz hatte, ob es dadurch gefördert worden ist. Aus diesem Grund war nötig dieses Enzym zu inhibieren, bevor Testsubstanz eingespritzt wurde.

Als Antagonist der NO-Synthase wurde 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin hinzugefügt. Dadurch wäre dieses Enzym blockiert und könnte keine spasmolytische Wirkung ausüben.

Danach wurde 20 $\mu\text{mol/l}$ Testsubstanz eingespritzt. Es wurde festgestellt, dass die Kontraktionskraft des Organs von $6,88 \pm 0,60$ auf $4,19 \pm 0,10$ gesenkt wurde. Diese Kontraktionsabnahme hat darauf hingewiesen, dass die spasmolytische Wirkung der Testsubstanz nicht durch NO-Synthase gefördert wurde weil es schon vor Substanzzugabe blockiert war und konnte daher keine Wirkung ausüben. Somit war es nicht möglich, dass Nitro-L-Arginin relaxierende Wirkung von MAH117.HCl hemmt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Diplomarbeit wurden die Auswirkungen der Testsubstanz MAH117.HCl an 5 isolierten Meerschweinchenorganen getestet. Isoliert wurden: Papillarmuskel, Aorta, Pulmonalarterie, Vorhof und Darm. Nach der Kontrollphase und Erreichen von steady state wurde alle 45 Minuten Testsubstanz in zunehmenden Konzentrationen eingespritzt.

Mit Hilfe der Organe der quergestreiften Herzmuskulatur, des rechten Vorhofs und Papillarmuskel, konnten die Änderungen der Inotropie und Chronotropie untersucht werden. Organe der Glattmuskulatur, absteigender Teil der Aorta und Pulmonalarterie, dienten zur Testung der vasodilatierenden Wirkung. Eine mögliche spasmolytische Wirkung der Substanz auf den GIT wurde am terminalen Ileum untersucht.

Die Organe wurden jeden Tag frisch präpariert und ins Organbad, gefüllt mit physiologischer Nährlösung, eingebracht und vermessen.

Die Substanz zeigte eine signifikante Wirkung auf das Ileum terminale, den rechten Vorhof und den Papillarmuskel. Die Wirkungen beim Darm und Papillarmuskel sind ähnlich bei gleicher Substanzkonzentration. Bei allen drei kam es durch Erhöhung der Konzentration zu einer starken Abnahme der Kontraktionskraft und somit zu einer relaxierenden Wirkung. Aufgrund der starken Wirkung konnte bei allen drei Organen die halbmaximale effektive Konzentration erreicht werden und somit EC_{50} -Wert ermittelt werden. Von größter Bedeutung war die relaxierende Wirkung am Darm.

Bei Aorta und pulmonaler Arterie wirkte die Substanz nicht so stark, besonders schwach bei Aorta wodurch kein EC_{50} -Wert berechnet werden konnte.

Es wurde auch getestet und festgestellt, dass die spasmolytische Wirkung der Substanz unabhängig von der NO-Synthase stattfindet.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Ammon HPT(2004) Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch, 9. Auflage,Walter de Gruyter GmbH&Co.KG, Berlin,ISBN 3-11-017487-1

Ananthan S (2006) Opioid ligands with mixed mu/delta opioid receptor interactions: an emerging approach to novel analgesics. AAPS J 8: E118–E125

Brandt LJ, Chey WD, et al. (2009) American College of Gastroenterology Task Force on Irritable Bowel Syndrome. An evidence-based position statement on the management of irritable bowel syndrome. Am J Gastroenterol 104: 1–35

Brown IP, Thompson CI, Belloni FL (1992) Mechanisms of coronary vasodilatation produced by ATP in guinea-pig isolated perfused heart. Br J Pharmacol 105: 211–215

Crowell MD, Harris L, Jones MP, et al. (2005) New insights into the pathophysiology of irritable bowel syndrome: implications for future treatments. Curr Gastroenterol Rep 7: 272–279

Estler C. J., SchmidtH.(2007): Pharmakologie undToxikologie: Für Studium undPraxis. 6.Auflage, Schattauer Verlag 996

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

Furchgott Rf, De Gubareff T, Grossman A (1959) Release of autonomic mediators in cardiac issues by suprathreshold stimulation. *Science* 129:328-329

Gharib-Naseri MK, Saberi S, Mard SA, Latifi SM (2012) Bronchodilatory Effect of Hydrogen Sulfide in Rat. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 15: 907-915

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

Houghton LA, Foster JM, Whorwell PJ (2000) Alosetron, a 5-HT₃ receptor antagonist, delays colonic transit in patients with irritable bowel syndrome and healthy volunteers. *Aliment Pharmacol Ther* 14: 775–78

Khanna R, MacDonald JK, Levesque BG (2014) Peppermint oil for the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Gastroenterol* 48: 505–512

Larsen Reinhard (2011) *Anästhesie*. Elsevier, Urban & Fischer Verlag. 4

Lavö B, Stenstam M, Nielsen AL (1987) Loperamide in treatment of irritable bowel syndrome—a double-blind placebo controlled study. *Scand J Gastroenterol Suppl* 130: 77–80

Manabe N, Wong BS, Camilleri M, et al. (2010) Lower functional gastrointestinal disorders: evidence of abnormal colonic transit in a 287 patient cohort. *Neurogastroenterol Motil* 22: 293–e82

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Menzel S, Ruth P (2012) *Mutschler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie*. 10., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart

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

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Menzel S, Ruth P(2013)*Mutschler*

Arzneimittelwirkungen–Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie,10. Auflage,Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, ISBN 978-3-8047-2898-1

Nee J, Zakari M, Lembo AJ (2015) Novel therapies in IBS-D treatment. *Curr Treat Options Gastro* 13: 432–440

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

Odunsi-Shiyanbade ST, Camilleri M, McKinzie S, et al. (2010) Effects of chenodeoxycholate and a bile acid sequestrant, colestevlam, on intestinal transit and bowel function. Clin Gastroenterol Hepatol 8: 159–165

Orekoya O, McLaughlin J, Leitao E, et al. (2015) Quantifying bile acid malabsorption helps predict response and tailor sequestrant therapy. Clin Med 15: 252–257

Patel BA, Dai X, Burda JE, Zhao H, Swain GM, Galligan JJ, Bian X (2010) Inhibitory neuromuscular transmission to ileal longitudinal muscle predominates in neonatal guinea pigs. Neurogastroenterol Motil 22: 909–918

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

https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-56434-5_46

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

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

Talley NJ (2006) Genes and environment in irritable bowel syndrome: one step forward. Gut 55: 1694–1696

Vahedi H, Merat S, Momtahn S, et al. (2008) Clinical trial: the effect of amitriptyline in patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 27: 678–684

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