



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Kardiovaskuläre und spasmolytische Aktivität von zwei
neuen Wirkstoffen (SWS 25a und WHG 58T)
auf isolierte Organe von *Cavia porcellus*

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasser:	Hintersteiningger Michael
Matrikel-Nummer:	0405761
Studienrichtung:	Pharmazie
Betreuerin / Betreuer:	Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik

Wien, im Februar 2010

***„DIE ANGST ZU VERSAGEN IST DER ERSTE SCHRITT
AM WEG DES SCHEITERNS“***

WIDMUNG und DANKSAGUNG

Diese Diplomarbeit ist meiner Familie gewidmet.

Ihre stets selbstlose moralische und finanzielle Unterstützung während meines gesamten Studiums waren die Grundpfeiler für meinen Studienerfolg- und Abschluss. Dafür danke ich aus ganzem Herzen!

Mein spezieller Dank gilt auch all jenen Menschen die ich während meiner Zeit an der Universität kennen gelernt habe und die mich durch die Höhen und Tiefen des Studiums begleitet haben. Viele davon darf ich heute nicht nur als Kollegen sondern als Freunde bezeichnen.

In dieser Hinsicht sei besonders Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik genannt, bei dem ich jahrelang als Tutor in der Lehre mitwirken durfte und der auch mein Betreuer bei dieser Diplomarbeit war. Seine stets professionelle und doch menschliche Betreuung waren eine große Unterstützung während der Diplomarbeit sowie des Studiums.

Abschließend danke ich der Arbeitsgruppe des Departments für Medizinische Chemie und Pharmazeutische Chemie, stellvertretend sei Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker genannt, für die Bereitstellung der Testsubstanzen samt fachlicher Betreuung.

1. EINLEITUNG	1
2. ZIELSETZUNG	6
3. MATERIAL UND METHODIK.....	7
3.1 Testsubstanzen.....	7
3.1.1 SWS 25a.....	7
3.1.2 WHG 58T.....	7
3.1.3 Lösungsmittel	8
3.2 Versuchstiere.....	9
3.3 Physiologische Elektrolytlösung	10
3.4 Verwendete Organe	11
3.4.1 Die Präparation	11
3.4.1.1 Verwendete Materialien	11
3.4.1.2 Rechter Vorhof.....	12
3.4.1.3 Die Lungenarterie	13
3.4.1.4 Papillarmuskel (Musculus papillaris).....	13
3.4.1.5 Dünndarm (Terminales Ileum)	15
3.4.1.6 Aorta (Aorta descendens).....	15
3.5 Verwendete Apparaturen.....	17
3.5.1 Apparatur 1	17
3.5.2 Apparatur 2	19
3.5.3 Der Kraftwandler.....	21
3.5.4 Versorgung mit Carbogen.....	22
3.6 Durchführung der Versuche	22
3.6.1 Wirkung der Substanzen auf die isolierten Meerschweinchenorgane	23
3.6.1.1 Atrium Dexter (Rechter Vorhof).....	23
3.6.1.2 Musculus papillaris (Papillarmuskel).....	24
3.6.1.3 Terminales Ileum (Dünndarm)	25
3.6.1.4 Aorta descendens.....	26
3.6.1.5 Arteria pulmonalis (Lungenarterie)	26
3.6.2 Untersuchung des Wirkmechanismus von SWS 25a an der Aorta	26
3.6.2.1 Untersuchungen mit Glibenclamid und Nitro-L-Arginin	26
3.6.2.2 Untersuchungen mit Phenylephrin	27
3.7 Verwendete Substanzen zur Untersuchung der Wirkmechanismen.....	28
3.7.1 Glibenclamid.....	28
3.7.2 Nitro-L-Arginin	29
3.7.3 Phenylephrin	29
3.8 Auswertung der Daten und Statistik.....	30
3.8.1 Atrium dexter.....	30
3.8.2 Musculus papillaris.....	30
3.8.3 Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum.....	31
3.8.4 Dimethylsulfoxid	31
3.8.5 Statistik	32
4. ERGEBNISSE.....	33
4.1 Ergebnisse der Testsubstanz SWS 25a.....	33
4.1.1. Atrium cordis dexter.....	33
4.1.2 Musculus papillaris.....	36
4.1.3 Aorta descendens	39

4.1.4 Arteria pulmonalis.....	42
4.1.5 Terminales ileum	45
4.2 Ergebnisse der Testsubstanz WHG 58 T.....	48
4.2.1 Atrium cordis dexter.....	48
4.2.2 Musculus papillaris.....	51
4.2.3 Aorta descendens	54
4.2.4 Arteria pulmonalis.....	57
4.2.5 Terminales Ileum	60
4.3 Versuche zur Analyse des Wirkungsmechanismus von SWS 25 auf die Aorta.....	63
4.3.1 Effekt von SWS 25a in Kombination mit Nitro-L-Arginin auf die Aorta.....	63
4.3.2 Effekt von SWS 25a in Kombination mit Glibenclamid auf die Aorta	66
4.3.3 Effekt von SWS 25a in Kombination mit Phenylephrin auf die Aorta.....	71
5. DISKUSSION.....	75
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	82
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	84
8. LEBENSLAUF	87

1. EINLEITUNG

Schwefelwasserstoff, Summenformel H_2S , folgliches Molekulargewicht 34,08 g/mol, ist seit Jahrzehnten als giftiges Gas gut bekannt (Winder und Winder 1933, Smith und Gosselin 1979). Er riecht intensiv nach faulen Eiern, die Geruchsschwelle liegt bei $0,025/\text{ml}/\text{m}^3$, und entsteht bei der Einwirkung von Säuren auf Schwermetallsulfide sowie bei reduktiver Zersetzung von Eiweiß (Forth et al. 2009).

Herstellung im Labormaßstab:

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



Die olfaktorische Warnwirkung ist nur bei relativ geringen Konzentrationen gegeben, denn es tritt rasch Gewöhnung ein und höhere Konzentrationen blockieren die Geruchsrezeptoren. Die wichtigsten betroffenen Organe bei einer akuten Vergiftung sind das zentrale Nervensystem und der Atemtrakt. Bei Inhalation hoher H_2S Konzentrationen treten Bewusstseinsverlust und zentrale Atemlähmung auf. Geringere Konzentrationen erzeugen Hyperpnoe, Krämpfe und Schwäche. (Forth et al. 2009).

Der Wirkungsmechanismus ist nicht endgültig geklärt. H_2S kann in hoher Konzentration Enzyme durch Sulfidbildung oder Disulfidbildung blockieren. Das im Stoffwechsel durch Protonierung entstandene Hydrogensulfidion blockiert das 3-wertige Eisen der Cytochromoxidase und inhibiert wie Cyanid die Enzyme der oxidativen Phosphorylierung (Estler und Schmidt 2007).

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

Weniger bekannt ist die Tatsache das Schwefelwasserstoff ebenso ein biologisches Gas ist, das im Körper endogen beim Cystein-Metabolismus entsteht und in einer

Reaktion die von der Cystathionin beta-Synthase (CBS) und/oder der Cystathionin gamma-Lyase (CSE) katalysiert wird (Stipanuk und Beck 1982, Hosoki et al. 1997).

In Studien an Mäusen, bei denen CSE genetisch ausgeschaltet wurde, verringerte sich die H₂S Konzentration in allen Organen und Geweben merklich und sie zeigten erhöhten Blutdruck sowie verringerte Gefäßrelaxation (Yang et al. 2008).

Diese Eigenschaft stellt eine Analogie zu anderen endogenen Transmittern wie Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenstoffmonoxid (CO) dar (Wang et al. 1997a,b).

Deshalb kam man zur Überzeugung, dass H₂S neben seiner Toxizität auch eine physiologische Rolle in der kardiovaskulären Regulation spielen könnte. In der Folge beschäftigten sich viele Studien damit.

Hosoki et al (1997) demonstrierten, dass H₂S die Aorta von Ratten in vitro relaxierte. Nun wurde daran gearbeitet den Wirkungsmechanismus auf den Grund zu gehen. Dazu wurde ein Zusammenhang mit den schon bekannten Regulationsmechanismen der vaskulären, glatten Muskulatur, K_{ATP} Kanäle, NO und CO, in Betracht gezogen.

Das ein Zusammenspiel von NO und H₂S existiert, wurde in einer Studie an pulmonalen Rattenaorten bestätigt (Wang et al. 2008).

Man fand weiters heraus, dass die relaxierende Wirkung von Schwefelwasserstoff auf isolierte Aortenringe von Ratten der Aktivierung von K_{ATP}-abhängigen Kanälen zugrunde liegt (Zhao et al. 2001).

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

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

Auch ein Zusammenhang zwischen H₂S und dem intrazellulären pH, der ebenfalls an der vaskulären Regulation beteiligt ist, wurde gezeigt (Lee et al. 2007)

Diese unterschiedlichen Studien weisen darauf hin, dass die K_{ATP} Kanäle nicht alleine für die physiologische Wirkung von Schwefelwasserstoff verantwortlich sind.

Eine besonders interessante Studie beschäftigte sich mit H_2S zur Behandlung einer künstlich biochemisch hervorgerufenen pulmonal arteriellen Hypertonie. Hier zeigte sich dass die erzeugten negativen Effekte durch Verabreichung von NaHS teilweise wieder aufgehoben werden konnten (Huang et al. 2008).

Dies könnte ein interessanter Therapieansatz zur Behandlung der Orphan Disease pulmonal-arterielle Hypertonie, kurz PAH, sein.

Die pulmonale Hypertonie mit ihren verschiedenen Unterformen, insbesondere der pulmonalen arteriellen Hypertonie, ist durch einen mittleren pulmonal arteriellen Blutdruck von > 25 mm Hg in Ruhe oder > 30 mm Hg unter Belastung gekennzeichnet (Mutschler et al. 2009).

Die auslösenden Faktoren sind weitgehend ungeklärt. Pathophysiologisch kommt es bei einer PAH zu einer Proliferation von Endothel und glatter Muskulatur, ein so genanntes vaskuläres Remodeling, damit zu einem Überwiegen vasokonstriktorischer Faktoren und einer verstärkten Thrombogenität bei gleichzeitig verminderter fibrinolytischer Aktivität im pulmonalen Gefäßbett. Die daraus resultierende Einschränkung des Gefäßlumens führt zu einer Druckerhöhung im kleinen Kreislauf, der Erhöhung der Nachlast im rechten Ventrikel und schließlich zum Rechtsherzversagen (Mutschler et al. 2009).

Die PAH ist ein schweres Krankheitsbild mit einer nach wie vor schlechten Prognose (5-Jahres-Überlebensrate 30 bis 50 %). Eine Heilung ist nur durch Transplantation möglich (Mutschler et al. 2009).

Die Pharmakotherapie der pulmonalen Hypertonie basiert auf dem Versuch, durch vasodilatierende Substanzen das Restlumen der pulmonalen Gefäße zu erhöhen. Therapeutisch eingesetzt werden:

- Iloprost (Prostacyclinderivat)
- Endothelinantagonisten wie Bosentan
- PDE5-Hemmer wie Sildenafil

Hinsichtlich der Therapie mit PDE5-Hemmern wurden interessante Versuche mit einem H₂S spendenden Sildenafil-Derivat (ACS6) durchgeführt. Es zeigte sich, dass es cAMP Spiegel erniedrigen konnte und die PDE5 Aktivität herabsetzte. Allerdings wurde nur hinsichtlich der Behandlung des Acute Respiratory Distress Syndrome, kurz ARDS, geprüft (Muzaffar et al. 2008).

Aufgrund seines Wirkmechanismus wären auf Schwefelwasserstofffreisetzung basierende Wirkstoffe natürlich auch hervorragend zur Behandlung der Volkskrankheit der essentiellen Hypertonie geeignet.

Die WHO/ISH-Leitlinie definiert den normalen Blutdruck als 130/85 mm Hg, die Hypertonie beginnt bei Werten >140/90 mm Hg. Dazwischen liegt ein Bereich der als normal hoch bezeichnet wird. Bei etwa 95 % der betroffenen liegt eine primäre oder essentielle Hypertonie vor, d.h. die pathophysiologische Ursache bleibt unklar. Etwa 5 % der Hypertoniepatienten haben eine sekundäre Hypertonie z.B renaler oder endokriner Genese, bei der die primäre Ursache zu behandeln ist (Forth et al. 2009)

Für die pharmakologische Monotherapie werden heute fünf Substanzklassen empfohlen:

1. Diuretika
2. β -Rezeptoren-Antagonisten
3. ACE-Inhibitoren
4. AT₁-Rezeptor Antagonisten
5. Kalziumkanalblocker

Nicht pharmakologische Maßnahmen wären:

- Gewichtsreduktion
- Einschränkung des Alkoholkonsums
- Kochsalzrestriktion
- Reduktion des Fettanteils der Nahrung
- Rauchen aufgeben

- Stressbewältigung

Auf der Basis der aktuellen Studienlage ist der Beginn der Hypertoniebehandlung mit einer niedrig dosierten Kombinationstherapie aus Diuretikum und β -Blocker oder Diuretikum und ACE-Hemmer hinsichtlich Wirksamkeit und Nebenwirkungen als gleichwertig der Monotherapie anzusehen. Wenn das Therapieziel mit der normalen therapeutischen Dosierung einer Monosubstanz nicht erreicht wird, sollte man sich frühzeitig zur Gabe von Zweier- oder auch Dreierkombinationen entschließen, da so die Erfolgsrate erhöht wird und die Dosen (und damit der unerwünschten Wirkungen) der individuellen Kombinationspartner klein gehalten werden können (Forth et al. 2009).

2. ZIELSETZUNG

Aufgabenstellung dieser Diplomarbeit war es die Wirkung zweier neu synthetisierter, Schwefelwasserstoff freisetzenden Verbindungen, SWS 25a und WHG 58T, an isolierten Meerschweinchenorganen zu testen. Es wurde die Veränderung von Inotropie und Chronotropie am Herzen, sowie die Wirkung auf die glatte Muskulatur untersucht.

Dazu wurden Präparate von Vorhöfen, Papillarmuskeln, Aorten, Lungenarterien und Dünndarmteilstücken hergestellt.

Um auswertbare und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten musste zu Beginn die richtige Präpariertechnik und die richtige Einstellung der Messgeräte erlernt werden.

Konnte eine signifikante Wirkung festgestellt werden, dies war bei Erreichen einer EC_{50} von unter $30 \mu\text{mol/l}$ der Fall, wurden zusätzlich Versuche durchgeführt um die zugrunde liegenden Wirkmechanismen festzustellen.

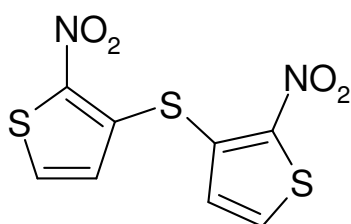
3. MATERIAL UND METHODIK

3.1 Testsubstanzen

Die beiden zu prüfenden Substanzen wurden an der Fakultät für Lebenswissenschaften, am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie von der Arbeitsgruppe rund um Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker neu synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

3.1.1 SWS 25a

Abbildung 1: Chemische Struktur von SWS 25a

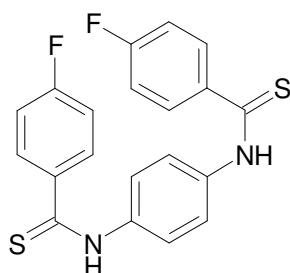


MG = 288 g/mol

Nomenklatur: 3,3'-Thiobis-(2-nitro)-thiophen

3.1.2 WHG 58T

Abbildung 2: Chemische Struktur von WHG 58T



MG = 384,47 g/mol

Nomenklatur: N,N'-(1,4-Phenylene)bis(4-fluorbenzothioamid)

3.1.3 Lösungsmittel

Um der Versuchsanordnung zu entsprechen musste die jeweilige Substanz in Lösung gebracht werden. Als Lösungsmittel diente Dimethylsulfoxid (DMSO), welches aufgrund seiner aprotischen, dipolaren Eigenschaften einerseits lipophile Substanzen, welche im Experiment vorlagen, gut löst aber auch andererseits mit Wasser mischbar ist. Vorgegeben, aufgrund der vorhandenen Organbäder mit 8 ml und 25 ml Fassungsvermögen, wurde die Einwaage immer so gewählt, dass man in jedem Gefäß nach vollständiger, kumulativer Zugabe eine Konzentration von 100 µmol/l im Gefäß erreichte.

Folgende Tabelle zeigt die berechneten und verwendeten Stammlösungen:

Tabelle 1: Stammlösungen

Substanz	Molare Masse	Volumen Organbad (ml)	Einwaage Substanz (100 µmol/l)
SWS 25a	288 g/mol	8	0,23 mg
		25	0,72 mg
WHG 58T	384,47 g/mol	8	0,31 mg
		25	0,96 mg

Die Wirkung auf die zu testenden Organe sollte bei Konzentrationen von, 1,3 ,10 ,30 und 100 µmol/l gemessen werden. Der zweite untersuchte Wirkstoff, WHG 58 T musste aufgrund der schlechten Löslichkeit in 200 µl gelöst werden. Die Messkonzentrationen betrugen für diesen Fall dann trotzdem 1, 3, 10, 30, 100 µmol/l. Dazu wurde, nachdem das jeweilige Organ eine beständige Vergleichsphase erkennen lies, in 45-minütigen Abständen, 1, 2, 7, 20, 70 µl, bzw. 2, 4, 14, 40, 140, der Stammlösung mit einer Finnmikropipette zugefügt.

Diese Abstände wurden gewählt da nach dieser Zeit die Erreichung eines „steady-state“ als gesichert angenommen werden konnte. Als „steady-state“ bezeichnet man in der Biotechnologie und Enzymkinetik ein erreichtes Fließgleichgewicht bzw. in der Medizin und Pharmazie konstante Blutplasmaspiegel an Wirkstoffen.

Tabelle 2: Darstellung des Pipettierschemas

Zugegebene Menge		Endkonzentration
100 µl (SWS 25a)	200 µl (WHG 58T)	100 µmol/l
1 µl	2 µl	1 µmol/l
2 µl	4 µl	3 µmol/l
7 µl	14 µl	10 µmol/l
20 µl	40 µl	30 µmol/l
70 µl	140 µl	100 µmol/l

3.2 Versuchstiere

Die in der vorliegenden Diplomarbeit beschriebenen Versuche wurden an den inneren Organen von Meerschweinchen durchgeführt. Diese wurden gewählt, da die Charakteristik der Ionenkanäle dieser Säugetiere, berücksichtigend, dass man in der Tierausswahl im Hinblick auf die Größe der Versuchsaapparaturen beschränkt ist, dem Menschen am Nächsten kommt.

Bezogen wurden die Nagetiere vom Institut für Toxikologie und Labortierzucht in Dobrá Voda, Universität Bratislava (Slowakische Republik). Die verwendeten Stämme lauteten „DH“ (Inzucht) und „TRIK“ (Auszucht), das Geschlecht war ausschließlich weiblich, das Alter lag zwischen vier und acht Wochen, das Gewicht bewegte sich zwischen 300 g und 600 g.

Die Meerschweinchen wurden am Beginn jedes Versuchstages durch einen präzisen Schlag auf das Genick getötet. Diese Methode hat sich als Schnellste, Schmerz- und Stressärmste bewährt.

Unmittelbar danach wurde der Thorax und das Abdomen mit einer OP-Schere geöffnet und das Herz samt Lunge entnommen. Als nächster Schritt wurde ein etwa 20 cm langes Stück des Ileums und zum Abschluss die Aorta entfernt. Sämtliche Organe wurden umgehend in eine begaste Nährlösung, siehe Kapitel 3.3, überführt und darin bis zur weiteren Präparation aufbewahrt.

3.3 Physiologische Elektrolytlösung

Die oben erwähnte Nährstofflösung, gebräuchlich Tyrode, nach dem Pharmakologen Maurice Vejux Tyrode, bezeichnet, diene zusammen mit einem in diese eingeleitetem Gasgemisch, bestehend aus 95 % O₂ und 5 % CO₂, genannt Oxymix bzw. Carbogen, zur optimalen Versorgung der Organe während der Präparation und den anschließenden Versuchen.

Zur Herstellung bediente man sich den Vorschriften von Reiter (1967) und entsprach einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Tyrode

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

Umgerechnet für 2 Liter ergibt sich folgende Zusammensetzung:

Tabelle 4: Herstellungsanleitung für 2 Liter

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

Die Lösung wurde am Beginn jedes Versuchstages frisch bereitet, indem die in Tabelle 4 angeführten Stammlösungen an NaCl, KCl, KH_2PO_4 , MgSO_4 und NaHCO_3 in einem 2 Liter fassenden Messkolben mit 1,5 Liter Aqua dest. vermischt wurden. Danach wurde die Glucose hinzugefügt und nach dem diese vollständig gelöst war mindestens 20 Minuten mit Carbogen begast um eine möglichst vollständige Gassättigung zu erreichen. Nach dieser Zeit wurde die notwendige Menge an CaCl_2 hinzugefügt, wobei danach zu trachten war keine schwerlöslichen Calciumsalze zu bilden, die eine Trübung der Lösung zufolge hätten. Um dies zu gewährleisten musste das CaCl_2 vorsichtig und tropfenweise eingebracht werden. Zum Abschluss der Zubereitung wurde der Messkolben bis zur Eichmarke mit Aqua dest. aufgefüllt.

3.4 Verwendete Organe

Um die Wirkungen der Substanzen zu testen wurde das Herz, der Dünndarm und die Aorta isoliert und weiter bearbeitet. Die Reihenfolge der Entnahme wurde bereits in Kapitel 3.2 beschrieben.

3.4.1 Die Präparation

3.4.1.1 Verwendete Materialien

Um präzises Arbeiten zu gewährleisten musste der Großteil der Arbeit unter Zuhilfenahme eines Auflichtmikroskops erfolgen. Um auch während des Präparierens möglichst schonende Bedingungen für die Präparate zu schaffen wurde als Arbeitsfläche eine mit Tyrode gefüllte Petrischale verwendet. Um die Objekte darin mit Präpariernadeln fixieren zu können war diese zusätzlich mit Kork ausgelegt, welcher mit einem Schlauch fixiert wurde. Zusätzlich kamen verschieden große Pinzetten, Federgriffscheren und Pipetten zur Anwendung.

Abbildung 3: Auflichtmikroskop und Werkzeuge



3.4.1.2 Rechter Vorhof

Im ersten Schritt wurde das Herz möglichst vollständig von umliegendem Gewebe, Fett und der Lunge befreit. Dann wurde das Organ mit 2 Präpariernadeln an der Korkunterlage befestigt, woraufhin man an die eigentliche Isolation des Vorhofs vornahm. Dabei musste darauf geachtet werden das Präparat keinesfalls zu überdehnen oder gar zu verletzen. Im schlimmsten Falle könnte dies nämlich zum Erlöschen des autonomen Schlages des Vorhofes führen.

Nachdem man den Vorhof vom Herz getrennt hatte, wurde er sogleich für die Verwendung im Messgerät weiter präpariert. Dazu wurde er an beiden Enden mit Nadeln fixiert und an jedem der beiden Enden wurde ein farblich anderer Bindfaden befestigt. Dies diente zur Unterscheidung welches anatomisch gesehen das „obere“ und welches das „untere“ Ende war. Mithilfe eines Knotens wurde dann jeweils ein Silberhäkchen eingefädelt, welches schließlich mit einem zweiten Knoten gesichert wurde. Dann wurde der fertig präparierte Vorhof wieder in ein Becherglas mit begaster Tyrode überführt.

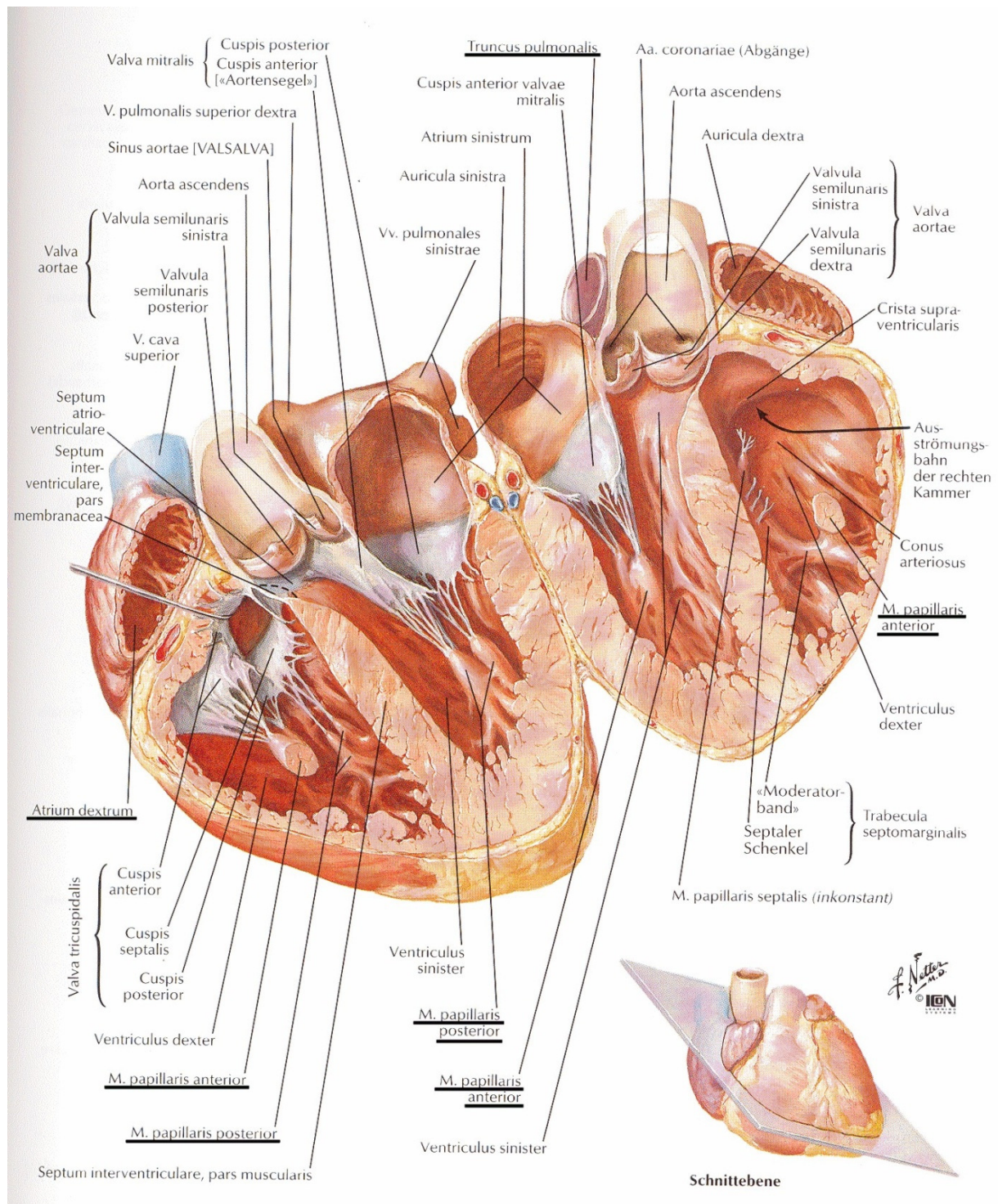
3.4.1.3 Die Lungenarterie

Für die hier beschriebenen Versuche wurde nur der Truncus pulmonalis, zu deutsch Lungenstamm, verwendet. Das ist jener Teil welcher aus der rechten Herzkammer entspringt. Der freilegbare Teil dieser Arterie, von dem direkt zwei bis drei Millimeter breite, ringförmige Präparate abgeschnitten wurden, war hier, je nach Meer-schweinchen verschieden, maximal 1 cm lang. Folglich musste man sehr sorgfältig vorgehen, um daraus zumindest 2-3 Stücke zu erhalten. Etwaiges Fett- und Muskelgewebe sowie Blutgerinnsel mussten ebenso vorsichtig entfernt werden.

3.4.1.4 Papillarmuskel (Musculus papillaris)

Nachdem aus dem Herzen schon der Vorhof und die Pulmonalarterie entfernt wurden, ging man nun an die Präparation der Papillarmuskeln aus den beiden Herzkammern. Dafür wurde das Herz entlang des Septums, zu deutsch Scheidewand, geöffnet und aufgeklappt. Da im Herz meist noch viel Blut vorhanden war musste man, um im Auflichtmikroskop klare Sicht zu erhalten, mehrmals die Tyrode wechseln. Nach Lokalisierung der gewünschten Organteile, wurde an deren Ansätzen mit Hilfe von Bindfäden erneut Silberhäkchen befestigt. Danach wurden die Papillarmuskeln aus der Herzwand geschnitten. Man musste weiters darauf achten alle Purkinje-Fasern zu entfernen. Diese könnten, als Teil des Erregungsleitungs-systems, Spontanaktivität aufweisen und störend wirken. Aufbewahrt wurden die Präparate, wie üblich, in begaster Tyrode.

Abbildung 4: Schematische Darstellung des Herzens (Netter FH 2003)



3.4.1.5 Dünndarm (Terminales Ileum)

Nach Entnahme des Herzens wurde ein Stück des Darms, genauer das terminale Ileum, das ist jener Teil der dann in den Dickdarm übergeht, entfernt. Dazu wurde der Bauchraum weiter geöffnet, sodass man direkt mit den Fingern zum Darm gelangen konnte. Dann suchte man sich den vorher beschriebenen Übergangsbereich und band den jejunalen Teil mit einem Bindfaden ab. Dies diente gleichzeitig als Markierung um die Enden nicht zu verwechseln. Während der gesamten Vorgehensweise war darauf zu achten den Darm nicht unnötig zu dehnen um die Muskulatur nicht zu verletzen. Wenn man das Teilstück dann in die Tyrode überführte, dieses Organ betreffend war die Gassättigung der Tyrode besonders wichtig, konnte man sehen wie der Darm Drehbewegungen ausführte. Dies war ein Zeichen dafür dass die Peristaltik funktionierte.

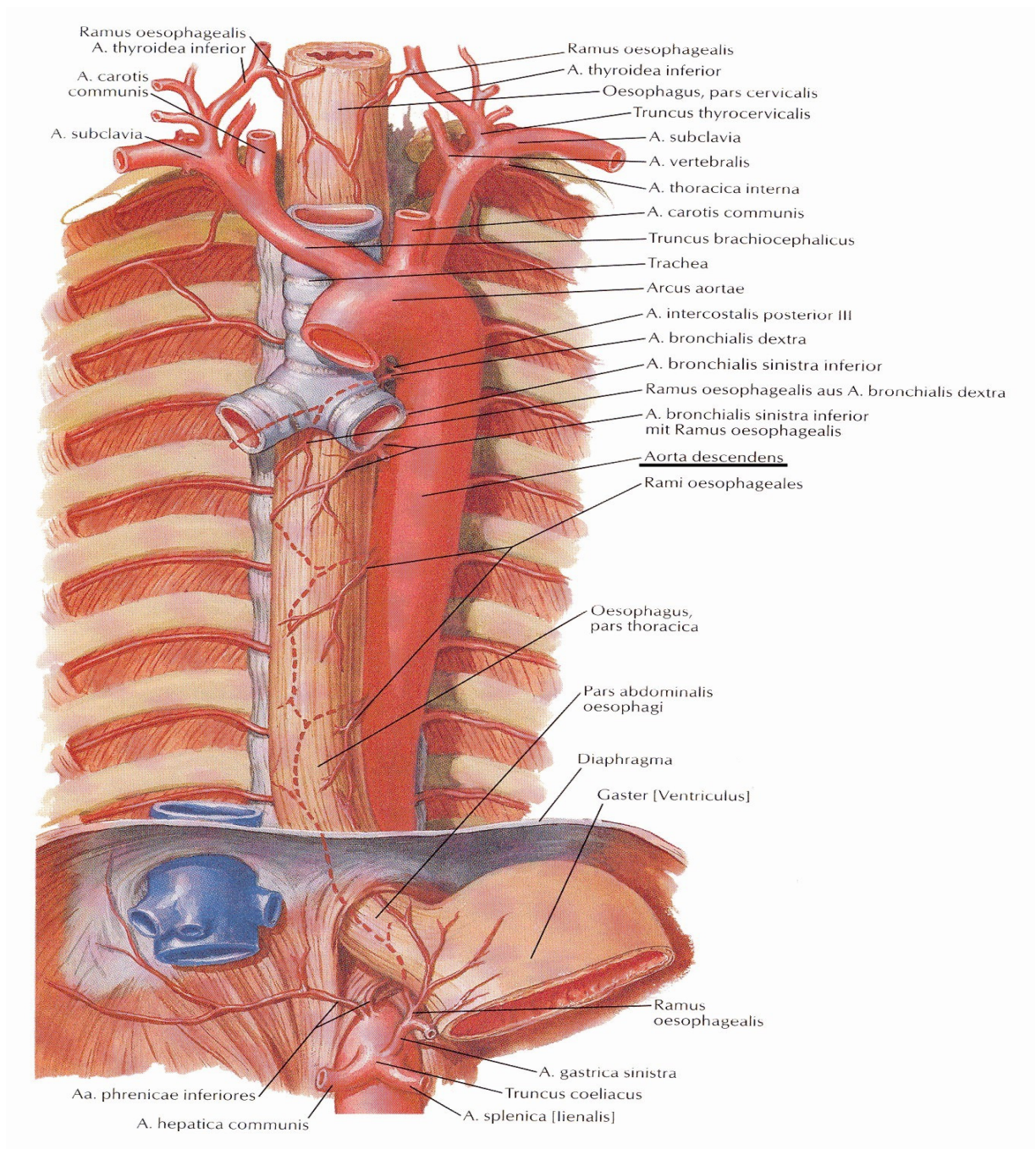
Anschließend wurde ein etwa 1 cm langes Stück herausgeschnitten. Dabei achtete man darauf dass die Enden schräg abgeschnitten wurden, die dadurch beidseitig entstandenen Spitzen wurden mit Präpariernadeln befestigt. Dies diente unter anderem dazu das Einrollen des Darms zu verhindern. Dann wurde in schon beim Vorhof beschriebener Art und Weise an jedem Ende ein Silberhäkchen befestigt. Bei dieser Arbeit musste man so vorgehen, dass man die Öffnungen nicht zuband. Dies war einerseits wichtig um die Darmröhre mithilfe einer Pipette von eventuell vorhandenem, restlichen Chymus zu befreien und andererseits um im späteren Versuch ein optimales Zirkulieren der Substanzlösung zu ermöglichen.

3.4.1.6 Aorta (Aorta descendens)

Am Ende der Präparation aus dem Tier widmete man sich der Aorta. Dazu wurde der Brustkorb aufgedehnt und gleichzeitig die Wirbelsäule durchgebogen. So konnte man ohne Probleme an die Aorta, die entlang des Rückgrates (siehe Abbildung 5) verläuft, gelangen. Man durchtrennte die Aorta am oberen Ende und schnitt dann vorsichtig am Rückgrat entlang bis man ein etwa 3 cm langes Stück gewonnen hatte. Um exakt zu arbeiten verwendete man eine Pinzette, mit der man das obere Ende des Blutgefäßes festhielt und immer einen leichten Zug von der Wirbelsäule weg aufrechterhielt. Ein Beschädigen oder Überdehnen war auch hier strikt zu vermeiden.

Das gewonnene Teilstück wurde analog zu den anderen Präparaten in der vorher beschriebenen Petrischale am Korkboden befestigt. Nun entfernte man vorsichtig das anhaftende Gewebe und schnitt die Aorta in möglichst viele, gleichmäßige 2 mm lange Stücke. Schadhafte oder unregelmäßige Teile mussten entsorgt werden, da sie die folgenden Messungen verfälscht hätten.

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Aorta (Netter FH 2003)



3.5 Verwendete Apparaturen

Die in dieser Diplomarbeit beschriebenen Versuche wurden an zwei unterschiedlichen Apparaturen durchgeführt. Apparatur 1 (siehe Abbildung 6) wurde für die Untersuchung an den Papillarmuskeln verwendet, Apparatur 2 (siehe Abbildung 8) diente für die Aorta, die Arteria pulmonalis, den Darm und den Vorhof. Das entsprechende Organ war über einen Silberdraht mit einem Kraftwandler verbunden. Dieser hatte die Aufgabe die Veränderungen an den Organen in ein elektrisches Signal umzuwandeln. Des weiteren war ein Verstärkerr zwischengeschaltet, der, schon dem Namen nach, dazu diente das Signal für den Schreiber zu verstärken. Letzterer zeichnete die Messergebnisse auf Millimeterpapier auf.

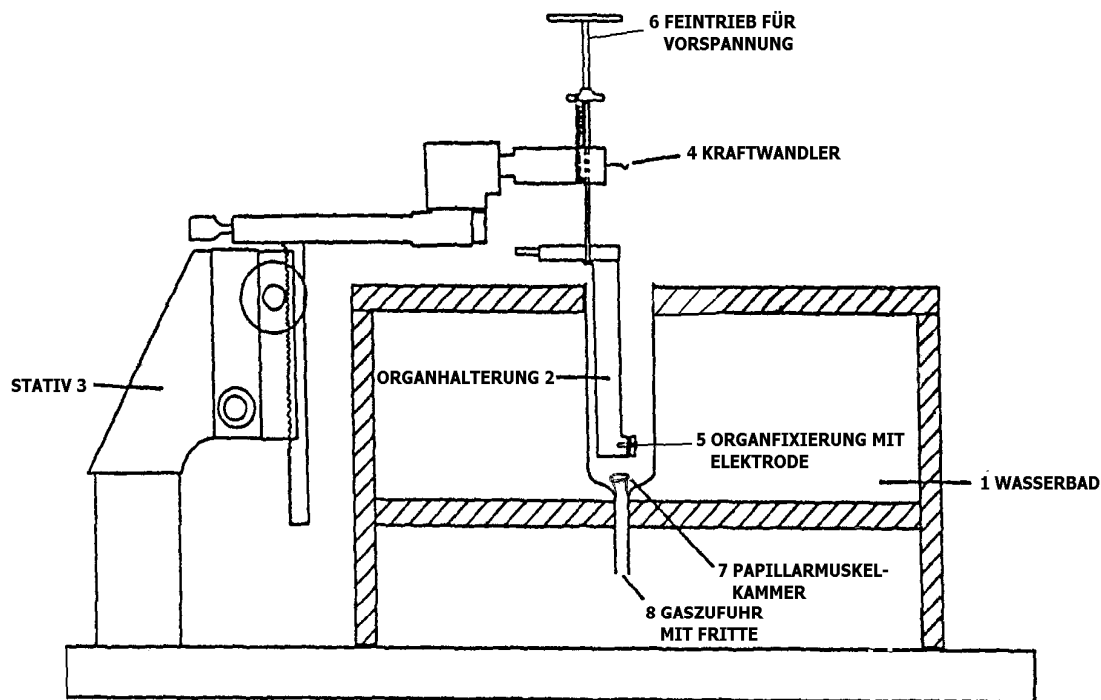
Um größtmögliche Reproduzierbarkeit zu gewährleisten mussten alle Versuchsbedingungen wie Sauerstoffversorgung (Oxymix), Temperatur, Zusammensetzung der Tyrode und pH-Wert immer so konstant wie möglich gehalten werden.

3.5.1 Apparatur 1

Die Verwendung dieses Gerätes beschränkte sich ausschließlich auf die Papillarmuskelpräparate.

Der Aufbau des Gerätes stellt sich folgendermaßen dar: Es besteht aus einer aus Acrylglas bestehenden Wasserbadwanne, in diese ragt eine so genannte Muskelkammer hinein. Zusätzlich verfügt die Apparatur noch über ein Stativ an dem der Kraftwandler, Feintrieb und Organhalterung befestigt ist. Zur besseren Vorstellung soll folgende Skizze dienen

Abbildung 6: Skizze Apparatur 1



Die Muskelkammer fasst ein Volumen von 25 ml, ebendiese Menge an Tyrode wurde auch verwendet. Um physiologische Bedingungen zu schaffen wurde das Wasserbad thermostatgeregelt konstant auf 35°C gehalten. Um die Nährstofflösung diesem Wert anzupassen musste diese mindestens 10 Minuten vor Versuchsbeginn in die Kammer eingebracht werden. Die Präparation des Muskels erfolgte wie schon in Kapitel 3.4.1.4 beschrieben. Das Präparat wurde mit dem Silberhäkchen auf die Organhalterung gehängt. Diese war über einem Silberdraht mit dem Kraftwandler verbunden. Nun klemmte man den Papillarmuskel zwischen der Elektrode und einer Plexiglasscheibe ein. Danach senkte man die Halterung in die Muskelkammer ab, sodass sie komplett in der Nährlösung stand. Da dieser Muskel, im Gegensatz zum Vorhof, nicht spontan schlug, musste er über die Elektrode gereizt werden. Dies wurde mit einem Accupulser Stimulator (Model Isostim 301T, WPI, Hamden, CT, USA) bewerkstelligt. Über den Silberchloriddraht wurde dann die Kontraktion auf den Kraftwandler übertragen, an einem Amplifier verstärkt und an den Flachbettschreiber übertragen.

Abbildung 7: Originalabbildung der Versuchsanordnung

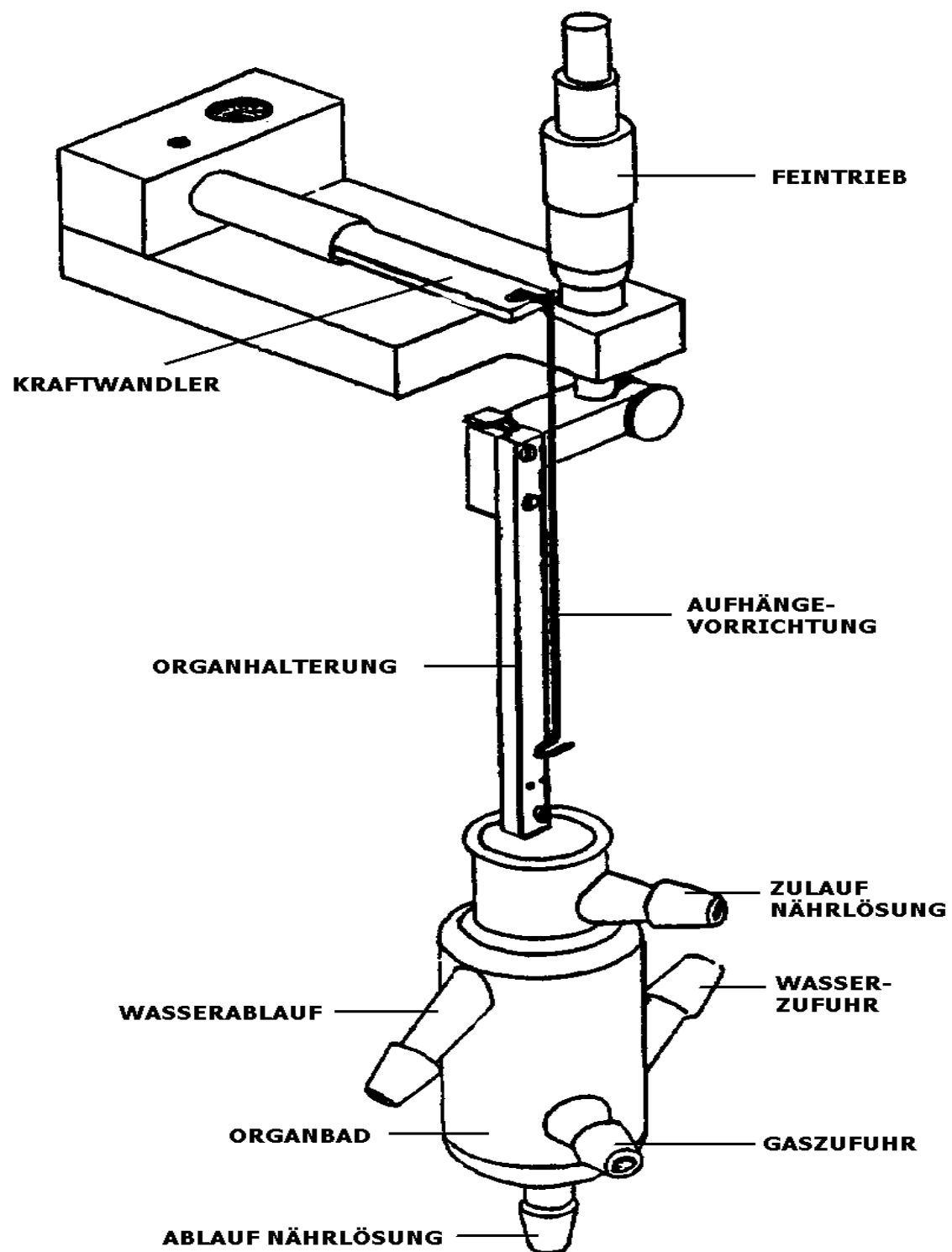


3.5.2 Apparatur 2

Für die Versuche an der Aorta, der Arteria pulmonalis, dem terminalen Ileum und dem rechten Atrium wurde die in nachstehender Skizze beschriebene Apparatur verwendet.

Im Prinzip erfolgte die Vermessung in diesem Gerät analog der des vorher Beschriebenen. Nur beim Einspannen der Präparate und der Temperatur des Wasserbades, 37°C, findet man Unterschiede. Hier wurde das jeweilige Organ zwischen zwei Silberdrähten befestigt. Bei der Aorta und der Arteria pulmonalis erfolgte dies direkt durch einfädeln der ringförmigen Präparate, bei Darm und Vorhof behelf man sich der angebundenen Häkchen. Auch hier wurden die Versuchsobjekte in die mit Tyrode gefüllten, temperierten und begasten Organbäder abgesenkt. Mittels Feintrieb wurde eine Vorspannung angelegt, anschließend eine Kontraktion erzwungen und diese bzw. deren Veränderungen in Stromsignale umgewandelt und aufgezeichnet.

Abbildung 8: Skizze Apparatur 2



3.5.3 Der Kraftwandler

Der Kraftwandler stellt einen essentiellen Bestandteil der Apparaturen dar. Mithilfe dieses Gerätes werden mechanische Veränderungen über eine sogenannte „Wheatstonsche Brücke“ in Elektrische überführt, was eine Messung erst möglich macht. Das Prinzip beruht auf einer Messung der Änderung in einem Dehnungsstreifen, der bedingt durch die Kontraktionsänderungen, über einen Widerstandswandler, einen konstanten Stromfluss verändert. So kann die Kontraktionsveränderung über einen Verstärker (4-Chanel Transducer Amplifier, Firma WPI) zu einem Flachbettschreiber (Flatbed Recorder Modell BD 112, Firma Kipp & Zonen) geleitet werden, welcher die Impulse auf Millimeterpapier überträgt.

Abbildung 9: Skizze des Kraftwandlers

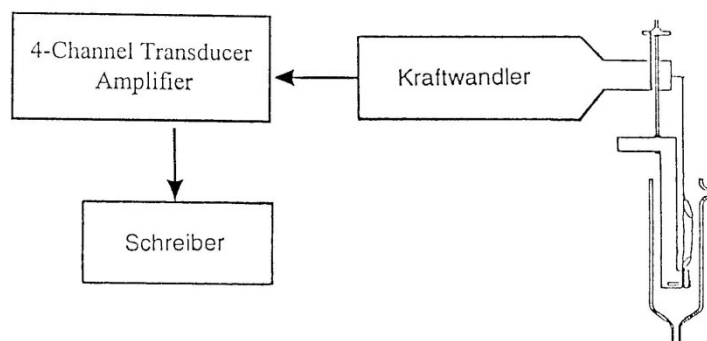
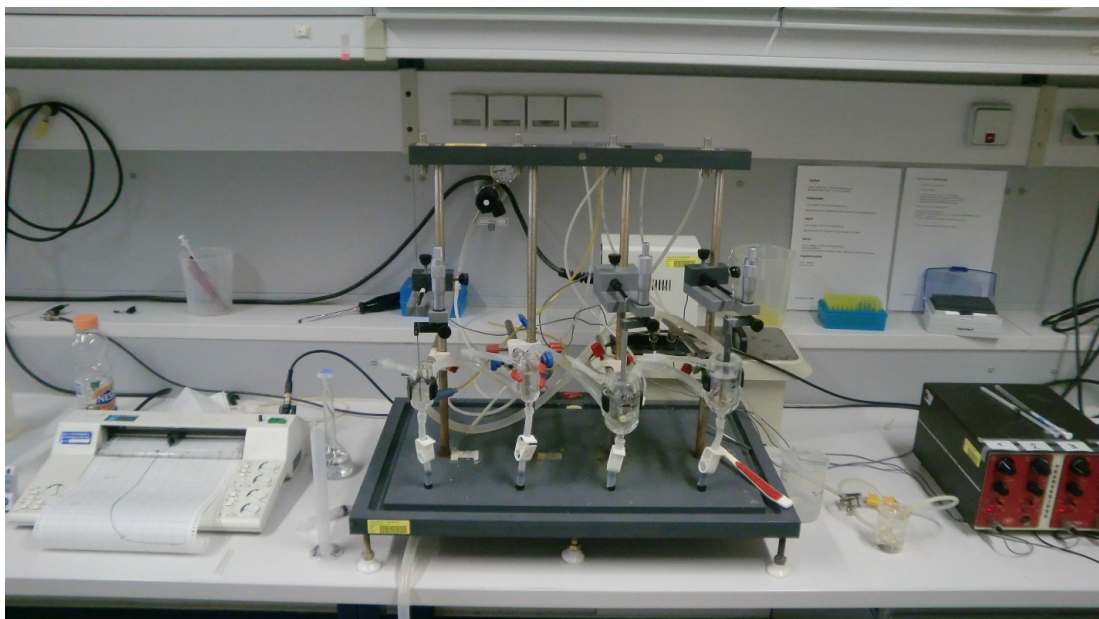


Abbildung 10: Originalabbildung der Versuchsanordnung



3.5.4 Versorgung mit Carbogen

Um eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff, eine ständig gleichmäßig Verteilung bzw. Vermischung der Wirkstoffe, sowie den pH-Wert konstant zu halten war eine ständige Versorgung mit dem schon mehrmals erwähnten Carbogengas notwendig. Gewährleistet wurde dies durch ein Schlauchsystem, das mit jedem Organbad verbunden war. Direkt vor dem Einlass in die Bäder befanden sich dabei Glasfritten, die eine feine Zerstäubung und so zusammen mit an den Anfängen der Schläuche befindlichen Schraubklemmen eine optimale Dosierung der Luft ermöglichten.

Abbildung 11: Originalabbildung der Gaszufuhr



3.6 Durchführung der Versuche

Dieses Kapitel beschreibt die Versuchsabläufe dieser Diplomarbeit. Vor Beginn musste jedenfalls sichergestellt werden, dass die Gefäße frei von Verunreinigungen waren. Dazu spülte man die Organbäder und dazugehörigen Halterungen mehrmals mit Aqua dest. durch, entfernte mögliche Substanzrückstände mit einer Bürste und

spülte mit der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung nach. Dann befüllte man die Kammern mit der Lösung.

3.6.1 Wirkung der Substanzen auf die isolierten Meerschweinchenorgane

3.6.1.1 Atrium Dexter (Rechter Vorhof)

Die Isolierung und Vorbereitung des Vorhofes wurde schon in Kapitel 3.4.1.2 beschrieben. Mithilfe der beiden angebundenen Häkchen wurde das Organ vorsichtig in die Apparatur 2 eingespannt. Dabei war die Länge der Silberdrähte nötigenfalls so zu verändern, dass das Präparat locker in der Halterung hing. Ein Überdehnen war strikt zu vermeiden um den Sinusknoten und so die Spontanaktivität nicht zu beeinflussen, welche für den korrekten Versuchsablauf unerlässlich war. Nun konnte man die nötigen Geräte einschalten und die erforderlichen Einstellungen vornehmen. Im ersten Schritt musste der Flachbettschreiber auf 5 mV und auf Speed 5 mm/sec eingestellt werden und mithilfe eines Drehrades auf den Nullpunkt am Millimeterpapier justiert werden.

Im zweiten Schritt wurde der Amplifier mittels Kippschalter zugeschaltet und der dadurch verstellte Schreiber mittels der Verstellmöglichkeit wieder auf den Nullpunkt abgeglichen. Im letzten Schritt der Vorbereitung wurde mithilfe des Feintriebs eine Vorspannung des Organs von 10,4 mN vorgenommen. Die Vorspannung diente dazu immer gleiche Ausgangsbestimmungen zu schaffen, da die Organe eine natürliche Plastizität aufwiesen. Danach wartete man eine etwa 45 minütige Gewöhnungsphase ab, worauf man mit der Messung beginnen konnte. Dazu wurde alle fünf Minuten der Schreiber abgesenkt und eine Aufzeichnung der Schlagfrequenz über einen Zeitraum von zwölf Sekunden durchgeführt. Bei 5 mm/sec entsprach dies auf dem Millimeterpapier 6 Kästchen, eines war somit 1 cm lang. Sobald die Frequenz über mindestens vier Messungen konstant blieb, konnte die Zugabe der Versuchssubstanzen beginnen. Dafür wurde die erste Konzentration zugegeben und wieder alle fünf Minuten, über eine Gesamtdauer von 45 Minuten, die Frequenz kontrolliert. Dann erfolgte die Zugabe der nächst höheren Konzentration. Pipettierschema siehe 3.1.2.

Das Zugeben der Substanzen mittels Pipette musste sehr gewissenhaft erfolgen, das Berühren der Silberdrähte und des Kraftwandlers war zu vermeiden, da sonst Fehlströme entstanden wären welche die Aufzeichnung verfälscht hätten.

3.6.1.2 Musculus papillaris (Papillarmuskel)

Der bereits präparierte (Kapitel 3.4.1.4) und eingespannte (Kapitel 3.5.1) Muskel wurde ins Organbad abgesenkt, dort eine Zeit lang zur Gewöhnung belassen und wurde dann unter eine Spannung von 3,92 mN gesetzt. Während des Versuchsablaufs wurde diese Spannung durch Nachjustierung am Feintrieb stets gleichgehalten, da die Kontraktionskraft mit der Ausgangsspannung einherging (Reiter M 1967). Da der Papillarmuskel, im Gegensatz zum Vorhof, keine Spontanaktivität aufweist musste er elektronisch gereizt werden. Dies wurde Mithilfe eines Reizgerätes (A310 Accupulser, Firma WPI) bewerkstelligt.

Durch diese Reize kam es bei dem Präparat zur Kontraktion. Nun konnte es vorkommen, dass es zu Kontraktionen kam obwohl das Reizgerät noch gar nicht zugeschaltet war. Dieses Phänomen war ein Zeichen dafür dass noch nicht entfernte Purkinjefasern vorhanden waren. Diese mussten vor Fortsetzung des Versuchs entfernt werden. Die Reize wurden in Form Rechteckimpulsen von 10 ms^{-1} bei einer Frequenz von 1 Hertz ausgesendet. Die eingebrachte Stromstärke wurde über eine Isolation Unit geregelt. Diese lag in etwa 10 % über der minimalen Reizschwelle. Es galt diese weitgehend einzuhalten, da es bei einer zu hohen Stromstärke zu einer Ausschüttung und Erschöpfung der Catecholaminspeicher kommen könnte, was in weiterer Folge zu einer Verfälschung der Versuchsergebnisse führen könnte (Furchgott RF et al. 1959) Diese Ergebnisse sind daran zu erkennen dass es zu einer selbstständigen Abnahme der Amplitude des sich kontrahierenden Papillarmuskels kommt, auch als „rund down“ bekannt.

Die Einstellung des Schreibers bezüglich Geschwindigkeit und die Zeit für Kontrollphase und Aufzeichnungen entsprachen weitgehend der des Vorhofs. Im Unterschied zu diesem wurde hier nicht 12 Sekunden gemessen, sondern nur eine bestimmte Anzahl von Amplituden aufgezeichnet, nämlich sieben bis neun. Die Messung und kumulative Substanzzugabe entsprach dem bekannten Schema, lediglich wurde am Ende jedes Konzentrationsintervalls eine Aufzeichnung bei 20

mm/sec durchgeführt, wodurch eine breitere, besser vermessbare Zeichnung entstand.

3.6.1.3 Terminales Ileum (Dünndarm)

Ähnlich dem Vorhof wurde der mit 2 Silberhäkchen versehene Darm, siehe Kapitel 3.4.1.5, in die Organhalterung eingespannt. Man ging so vor, dass der im Meerschweinchen jejunally gelegene Teil oben lag, der Caecale unten. Die entsprechenden Seiten hatte man vorher durch die Verwendung von verschiedenfarbigen Bindfäden deutlich gekennzeichnet. Auch hier war wieder behutsame Behandlung geboten. Nach Absenken ins das Organbad aktivierte man die Geräte. Einzigen Unterschied stellte die Vorspannung dar, die hier mit 4,92 mN zu wählen war. Nun folgte eine 20-minütige Wartezeit in der sich das Organ an die Bedingungen gewöhnen sollte. Hier kam es regelmäßig zu einer Verschiebung der Vorspannung, da sich die Darmmuskulatur in der warmen Nährstofflösung etwas entspannte und sich auch die Peristaltik änderte. Dies wurde mittels Feintrieb wieder ausgeglichen. Dann konnte der Schreiber abgesenkt und die Tyrode über einen Ablaufschlauch abgelassen werden. Neues Medium für den Darm wurden nun exakt 25 ml einer 60 mmol Kaliumchloridlösung, welche mit einem Messzylinder abgemessen und direkt ins Organbad geschüttet wurden. Die Bereitung dieser Lösung erfolgte täglich frisch in einem 100 ml Messkolben durch Lösung von 450 mg KCl in Tyrode.

Durch diese Zugabe kam es zu einer sofortigen Kontraktion des Darms, welche man im Unterschied zu Aorta und Arteria pulmonalis, auch mit freiem Auge gut beobachten konnte. Auch die Aufzeichnung des Flachbettschreibers unterschied sich von diesen zwei noch später beschriebenen Organen. Zuerst beobachtete man eine rasante Kontraktion, die ebenso rasch wieder abnahm, sich aber dann bei der Hälfte der ursprünglichen Kontraktion einpendelte und konstant blieb. Nun musste man mindestens 45 Minuten zuwarten und kontrollieren ob man eine konstante Plateauphase erreichte. Ein zu verwerfendes Präparat war daran zu erkennen, dass es eine ständige, der Zeit proportionale Abnahme der Kontraktion aufwies. Meist wurde dann auch keine eindeutige Plateauphase erreicht. Die Substanzzugabe erfolgte wieder nach bereits beschriebenen 45-minütigen Schema.

3.6.1.4 Aorta descendens

Da die Aorten schon ringförmig vorlagen, siehe Kapitel 3.4.1.6, musste man sie nur noch zwischen die zwei Drähte der Aufhängevorrichtung einfädeln. Dabei achtete man darauf, dass die Stücke ganz ohne Spannung waren. Nach Ablassen in das Organbad wurden der Schreiber und der Verstärker zugeschaltet und die Nullpunkteinstellung durchgeführt. Dann spannte man das Organ bei 10 mV auf 10 cm vor. Umgerechnet ergab dies einem Zug von 19,6 mN. Nach der 20-minütigen Entspannungsphase wurde das Gerät auf 5 mV, dies ergab folglich 9,81 mN, umgestellt und der sich dadurch verschobene Nullpunkt mittels Feintrieb wieder abgeglichen. Nun wurde analog zum Darm die Tyrode abgelassen und durch eine Kaliumchloridlösung ersetzt. Einziger Unterschied war die Konzentration derselben, sie entsprach 90 mmol, denn hier wurden 670 mg KCl in 100 ml Tyrode gelöst. Im Folgenden kam es wieder zu einer raschen Kontraktion, die in den ersten Sekunden sehr schnell geschah und sich dann langsam fortsetzte um dann im Idealfall eine Plateau zu erreichen. Hierzu wartete man wiederum mindestens 45 Minuten. Diese maximal Konzentration diente wie bei jedem Präparat, außer denen des Herzens, als Referenz für die dilatierende Wirkung der Versuchssubstanzen. Die Substanzzugabe folgte wieder dem bekannten Schema.

3.6.1.5 Arteria pulmonalis (Lungenarterie)

Der Ablauf kam dem der Aorta grundsätzlich gleich, einziger Unterschied lag in der Vorspannung die immer konstant bei 5 mV, also 9,81 mN, belassen wurde. Ansonsten wurde in gleicher Art und Weise die Abnahme der maximalen Kontraktion durch die Testsubstanzen gemessen.

3.6.2 Untersuchung des Wirkmechanismus von SWS 25a an der Aorta

3.6.2.1 Untersuchungen mit Glibenclamid und Nitro-L-Arginin

Es wurden auf dieselbe Art und Weise präparierte Aortenstücke und dieselbe Apparatur 2 wie schon in bei den vorangegangenen Versuchen verwendet. Auch der Versuchsablauf war bis zur Plateauphase der Kontraktion gleich. Nach Erreichen der

maximalen Kontraktion wurden, in jeweils getrennten Versuchsreihen, die Antagonisten Glibenclamid bzw. Nitro-L-Arginin zugesetzt. Die Versuche unterschieden sich nur dahingehend, dass bei Glibenclamid zwei verschiedene Konzentrationen verwendet wurden, nämlich 30 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$. Bei Nitro-L-Arginin wurde ausschließlich mit 100 $\mu\text{mol/l}$ gearbeitet.

Nachdem die jeweiligen Substanzen 45 Minuten Einwirkzeit bekommen hatten, wurde die der EC_{50} entsprechende Menge an SWS 25a zugesetzt und wieder 45 Minuten gewartet. Danach war das Ende der Versuche erreicht. Die Auswertung wird im folgenden Kapitel 4 näher erörtert.

3.6.2.2 Untersuchungen mit Phenylephrin

Um die Versuchsreihe mit diesem α -Sympathomimetikum durchführen zu können musste zuerst eine Verdünnungsreihe erstellt werden. Man verwendete Konzentrationen von 0.1, 0.3, 1, 3; und 10 $\mu\text{mol/l}$. Als nächsten Schritt fädelt man einen Aortenring in die Apparatur 2 ein, senkte ihn in das mit 18 ml Tyrode gefüllte Organbad und spannte wie bei den Standardversuchen vor. Danach wartete man 20 Minuten zu, worauf man 0,67 ml der höchsten Konzentration der Phenylephrinverdünnungsreihe in das Bad einbrachte. Danach startete man sofort die Aufzeichnung und nahm den Verlauf etwa 40 Sekunden auf. Dann wurde innerhalb von 10 Minuten 2 mal mit frischer Nährstofflösung ausgewaschen. Nun wiederholte man den Vorgang mit der nächsten Verdünnung, spülte wiederum und begann von Neuem usw. Die erhaltenen Werte für die Kontraktionen dienten als Referenz für die Versuche mit der Testsubstanz.

Der Ablauf dieser Prozedur war mit dem vorher beschriebenen identisch, bis auf die Tatsache, dass in den 18 ml Tyrode nun jeweils die ermittelte EC_{50} Konzentration eingestellt wurde. Beim ersten Schritt direkt durch Einspritzen in das Bad und abwarten der 45 Minuten für den steady-state, bei den weiteren durch Verwendung einer Tyrode, in der eine EC_{50} Konzentration des Wirkstoffs herrschte, als Spüllösung. Dies gewährleistete eine ständige gleich bleibende Konzentration des Wirkstoffes.

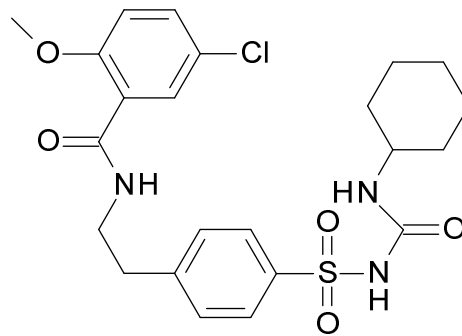
Um diesen Ablauf zeitlich immer genau einzuhalten, verwendete man für jegliche Zeitmessung in diesem Versuch eine Stoppuhr. Um Reproduzierbarkeit zu

gewährleisten musste weiters immer gleich schnell und an derselben Stelle in der Nähe der Aorta eingespritzt werden.

3.7 Verwendete Substanzen zur Untersuchung der Wirkmechanismen

3.7.1 Glibenclamid

Abbildung 12: Strukturformel



MG = 494,0 g/mol

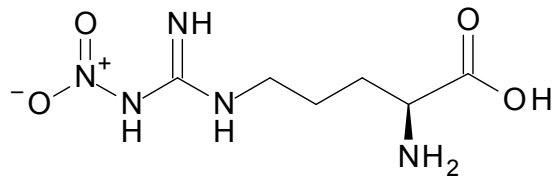
Glibenclamid gehört zur Gruppe der Sulfonylharnstoffderivate und wird aufgrund seiner Wirkweise als orales Antidiabetikum eingesetzt.

Es bindet in den B-Zellen des Pankreas an Membranen und schließt dadurch K_{ATP} -Kanäle. Die resultierende Membrandepolarisation öffnet spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle. Ca^{2+} strömt in die B-Zelle und startet die Insulinsekretion (Forth et al. 2009)

Unerwünschte Nebenwirkungen sind vor allem gastrointestinale Beschwerden und allergische Reaktionen. Im Gegensatz zu allen physiologischen Stimulatoren der Insulinsekretion können Sulfonylharnstoffe und ihre Analoga sowohl bei Stoffwechselgesunden als auch Typ-2 Diabetikern schwere Hypoglykämien auslösen (Forth et al. 2009)

3.7.2 Nitro-L-Arginin

Abbildung 13: Strukturformel



MG = 219,20 g/mol

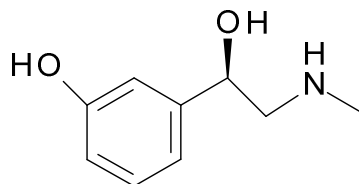
Nitro-L-Arginin ist ein Nitroderivat der Aminosäure Arginin. Es ist ein Inhibitor der Stickstoffmonoxid Oxidase und daher ein Vaso-und Koronarkonstriktor (Bansinath et al.1993).

NO wurde früher als „Endothelium-derived relaxing factor“ bezeichnet, erst vor einigen Jahren stellte man fest, dass es sich dabei um dieselben Verbindungen handelt.

Aus dem Endothel freigesetztes NO aktiviert die Guanylylcyclase (GC-S), diese bildet aus GTP cGMP. Über eine weitere Kaskade setzt dieser second messenger Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Reticulum frei, was zur Relaxation der glatten Muskulatur führt (Forth et al. 2009).

3.7.3 Phenylephrin

Abbildung 14: Strukturformel



MG = 167,21 g/mol

Phenylephrin ist ein α -Adrenorezeptor-Agonist. Solche erregen sympathische α -Rezeptoren. Sie werden zur systemischen oder lokalen Vasokonstriktion eingesetzt (Mutschler et al. 2008). Es ist bis auf eine fehlende 3-Hydroxylgruppe strukturgleich mit Adrenalin und wird in Europa hauptsächlich als lokaler Vasokonstriktor verwendet, z. B. als Wirkstoff in Nasentropfen zum Abschwellen der Schleimhäute im Naseninneren. In Augentropfen wirkt es als Mydriatikum, führt also zu einer Weitstellung der Pupillen (Cooper und Mowbray 2004).

Systemisch wird nur noch Midodrin (Gutron®) eingesetzt. Es dient der Behandlung neurogener hypotoner Blutdruckstörungen (Mutschler et al. 2008). Die Wirkung ist am ehesten mit der von Noradrenalin vergleichbar.

3.8 Auswertung der Daten und Statistik

3.8.1 Atrium dexter

Durch die vorgenommenen Messungen wurde die Chronotropie, zu Deutsch die Schlagfrequenz des Sinusknoten festgestellt. Durch Zugabe der Testsubstanz konnte man dann eine eventuelle Veränderung in der Anzahl der Schläge beobachten. Durch den Versuchsablauf, der schon in Kapitel 3.6.1.1 beschrieben wurde, erhielt man die Ausschläge und somit gleichzeitig die Frequenz für 12 Sekunden. Multipliziert mit 5 kam man dann auf die Schläge pro Minute. Je nach Substanz konnte man am Ende der kumulativen Zugaben eine neutrale, positiv oder negativ chronotrope Wirkung auf den Vorhof nachweisen.

3.8.2 Musculus papillaris

In den Experimenten zu diesem Herzmuskel versuchte man die Änderung der Kontraktionskraft in mN zu ermitteln. Um die Ergebnisse rationaler darzustellen rechnete man diese aber in Prozent um.

Die erhaltenen Amplituden wurden vermessen und die erhaltenen, gemittelten Werte in Zentimeter notiert. Die Papillarmuskeln wurden beinahe ausschließlich bei 2 mV und 5 mV vermessen. Dies musste man berücksichtigen, die erhaltenen Werte mit 0,4 (2 mV) und 0,98 (5 mV) multiplizieren und so standardisieren. Der vor

Substanzzugabe ermittelte, konstante Wert wurde mit 0 % angenommen, so konnte man in weiterer Folge die Abnahme in Prozent errechnen.

3.8.3 Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum

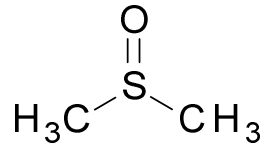
Ziel der Testungen war die dilatierende bzw. spasmolytische Wirkung der Substanzen auf diese Organe festzustellen, nach dem diese mithilfe von Kaliumchlorid maximal kontrahiert worden waren. Vor und nach jeder Substanzzugabe, welche in 45 Minuten Abständen erfolgte, musste in der Kurve markiert werden. So konnte eine mögliche Veränderung von Konzentration zu Konzentration nachvollzogen und berechnet werden. Hierzu nahm man den Wert vom Nullpunkt bis zur Plateauphase als Referenz an und maß dann am Ende jeder Einwirkzeit der verschiedenen Konzentrationen den verringerten Abstand zur Nulllinie. So konnte man die Werte prozentual vergleichen. Dafür musste man jedoch einen Eichfaktor berücksichtigen der von den bei den Versuchen verwendeten mV Wert abhing. Beim Standard von 5 mV entsprach 1 cm 0,98 mN. Arbeitete man bei 2 mV musste der Wert mit 0,2 und bei 10 mV mit 2 multipliziert werden.

3.8.4. Dimethylsulfoxid

Als Lösungsmittel für die Substanzen diente Dimethylsulfoxid, kurz DMSO. Dieses dient in pharmazeutischen Zubereitungen einerseits als Lösungsmittel und andererseits zur Verbesserung der topischen Resorption. Des Weiteren wirkt es antiphlogistisch, lokalanästhetisch, schwach bakterio- und fungistatisch, ferner diuretisch und vasodilatorisch (Hunnius 2004).

Da aus diesem Grund eine Eigenwirkung von DMSO auf die Dilatation denkbar war, wurden Blindversuche mit DMSO als Wirkstoff alleine durchgeführt. Vor allem auf die glatte Muskulatur konnten zum Teil signifikante Wirkungen festgestellt werden. Die erhaltenen Werte für das jeweilige Organ wurden vor der statistischen Auswertung mit einberechnet.

Abbildung 15: Strukturformel von Dimethylsulfoxid



MG = 78,13 g/mol

3.8.5 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Kontraktionskraft sowie der Schlagfrequenz wurden die Mittelwerte und die Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechnet. Zur Ermittlung dieser statistischen Daten bediente man sich dem Programm „Sigma Plot 9.0“ ebenso für die Berechnung des EC₅₀ Wertes. Dieser stellt die mittlere effektive Konzentration des Wirkstoffes in mmol/l dar, bei der die Hälfte des Kontrollwertes erreicht wird. In diesem Fall sind dies Kontraktion und Schlagfrequenz. Um die Irrtumswahrscheinlichkeit zu beurteilen wurde zusätzlich der „Student-t-Test“ für gepaarte Beobachtungen durchgeführt. Werte von < 5% (P < 0,05) und < 1% (P < 0,01) waren signifikant, Werte kleiner als 0,1% (P < 0,001) hochsignifikant.

4. ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse der Testsubstanz SWS 25a

4.1.1. Atrium cordis dexter

Um die Beeinflussung der Schlagfrequenz des rechten Vorhofes zu ermitteln wurden sechs Versuche durchgeführt. Die Methodik wurde schon in Kapitel 3.4.1.3 beschrieben. Die gesammelten Werte wurden arithmetisch gemittelt und so ein Kontrollwert (= 0 %) von $248 \pm 25,47$ Schläge pro Minute festgelegt.

Die Substanz erzielte erst bei einer Badkonzentration von $30 \mu\text{mol/l}$ eine signifikante Wirkung auf die Chronotropie, eine EC_{50} konnte jedoch auch bei der Endkonzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ nicht erreicht werden, in den ersten beiden Versuchen dieser Testreihe setzte die autonome Aktivität des Vorhofes bei dieser Konzentration gar vollständig aus.

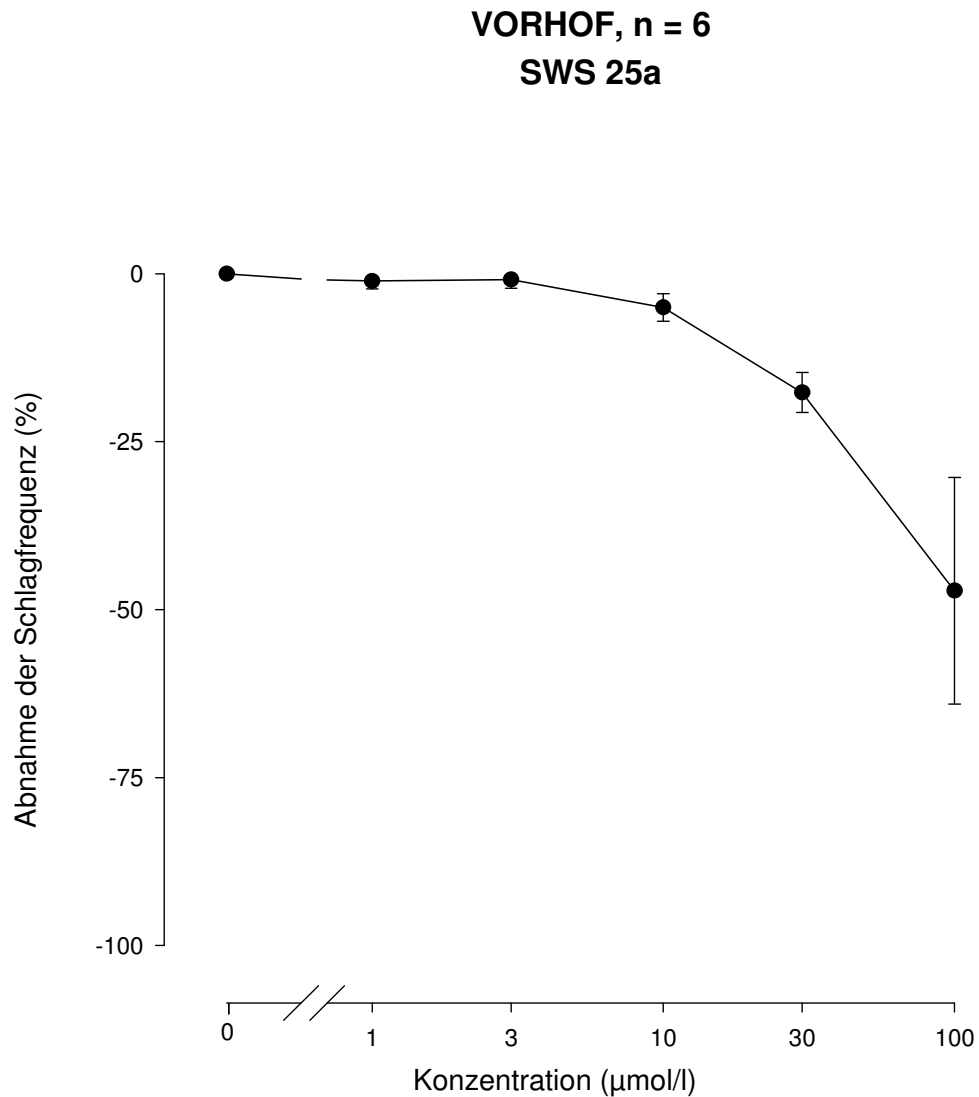
Tabelle 5: Versuchsergebnisse von SWS 25a am Vorhof

SMS 25a $\mu\text{mol/l}$	f $\pm$ SEM (x/min)	f $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$248 \pm 25,47$	0 ± 0	6	---
1	$244 \pm 23,28$	$-1,08 \pm 1,16$	6	n.s
3	$259 \pm 25,74$	$-0,86 \pm 1,28$	6	n.s
10	$233 \pm 20,19$	$-5,01 \pm 2,05$	6	0,05
30	$202 \pm 22,46$	$-17,67 \pm 3,0$	6	0,01
100	$143 \pm 47,19$	$-47,19 \pm 16,86$	6	0,05

Erläuterung zu Tabelle 5:

In der Tabelle sind die arithmetischen Mittelwerte der Schläge (f) in Anzahl/Minute und die dem entsprechenden prozentualen Werte ersichtlich. SEM bezeichnet den Standardfehler. n ist die Anzahl an Versuchen.

Diagramm 1: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS 25a am Vorhof

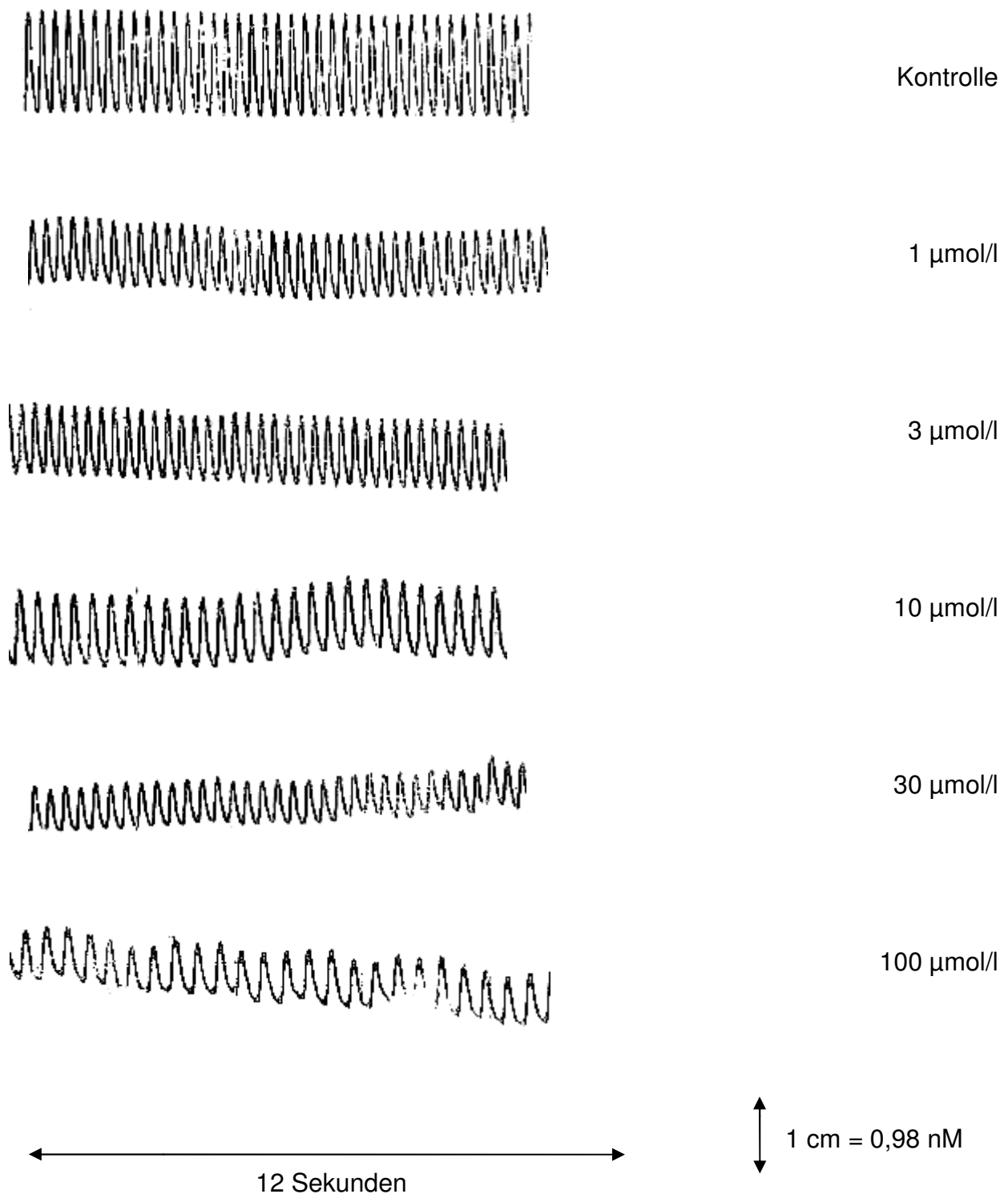


Erläuterung zu Diagramm 1:

Dieses Diagramm zeigt den Einfluss von SWS 25a auf die Schlagfrequenz in einer übersichtlichen Kurve dargestellt. Die x-Achse stellt die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ und die y-Achse die Abnahme der Chronotropie in Prozent dar.

Die gefüllten Punkte markieren die Mittelwerte, die sie durchquerenden Balken symbolisieren die Größe der Standardfehler.

Abbildung 16: Originalaufzeichnungen der chronotropen Wirkung von SWS 25a



Legende zu Abbildung 16:

Die negativ chronotrope Wirkung ist an der Zahl der Amplituden abzulesen.

4.1.2 Musculus papillaris

Für die Untersuchung der inotropen Wirkungen am Papillarmuskel wurden sechs Versuche durchgeführt.

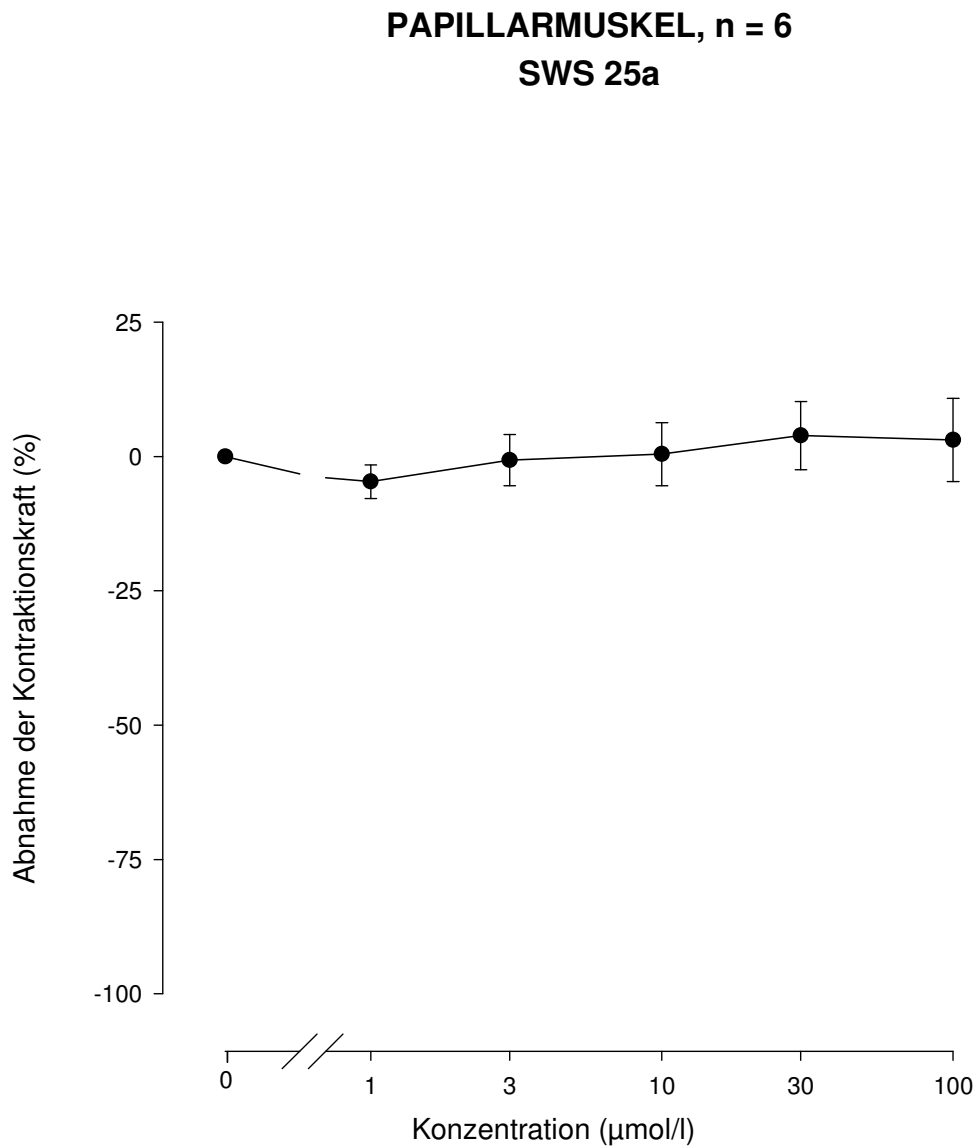
Als Ergebnis der Versuchsreihe ließ sich eine leichte Abnahme der Kontraktionskraft feststellen, die allerdings in keinem Versuch, berücksichtigt man die Standardabweichungen, signifikant war. Auf die Muskelpräparate lies sich bei höheren Konzentrationen ein leicht positiv inotroper Effekt nachweisen.

Tabelle 6: Versuchsergebnisse von SWS 25a am Papillarmuskel

SMS 25a μmol/l	f_c ± SEM (mN)	f_c ± SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	1,58 ± 0,45	0 ± 0	6	---
1	1,49 ± 0,43	-4,7 ± 3,11	6	n.s
3	1,57 ± 0,48	-0.68 ± 4,76	6	n.s
10	1,63 ± 0,52	0,45 ± 5,87	6	n.s
30	1,66 ± 0,50	3,89 ± 6,39	6	n.s
100	1,59 ± 0,44	3,08 ± 7,73	6	n.s

Legende zu Tabelle 6: Darstellung der Mittelwerte samt Standardfehler, Irrtumswahrscheinlichkeit in Zahl und Prozent.

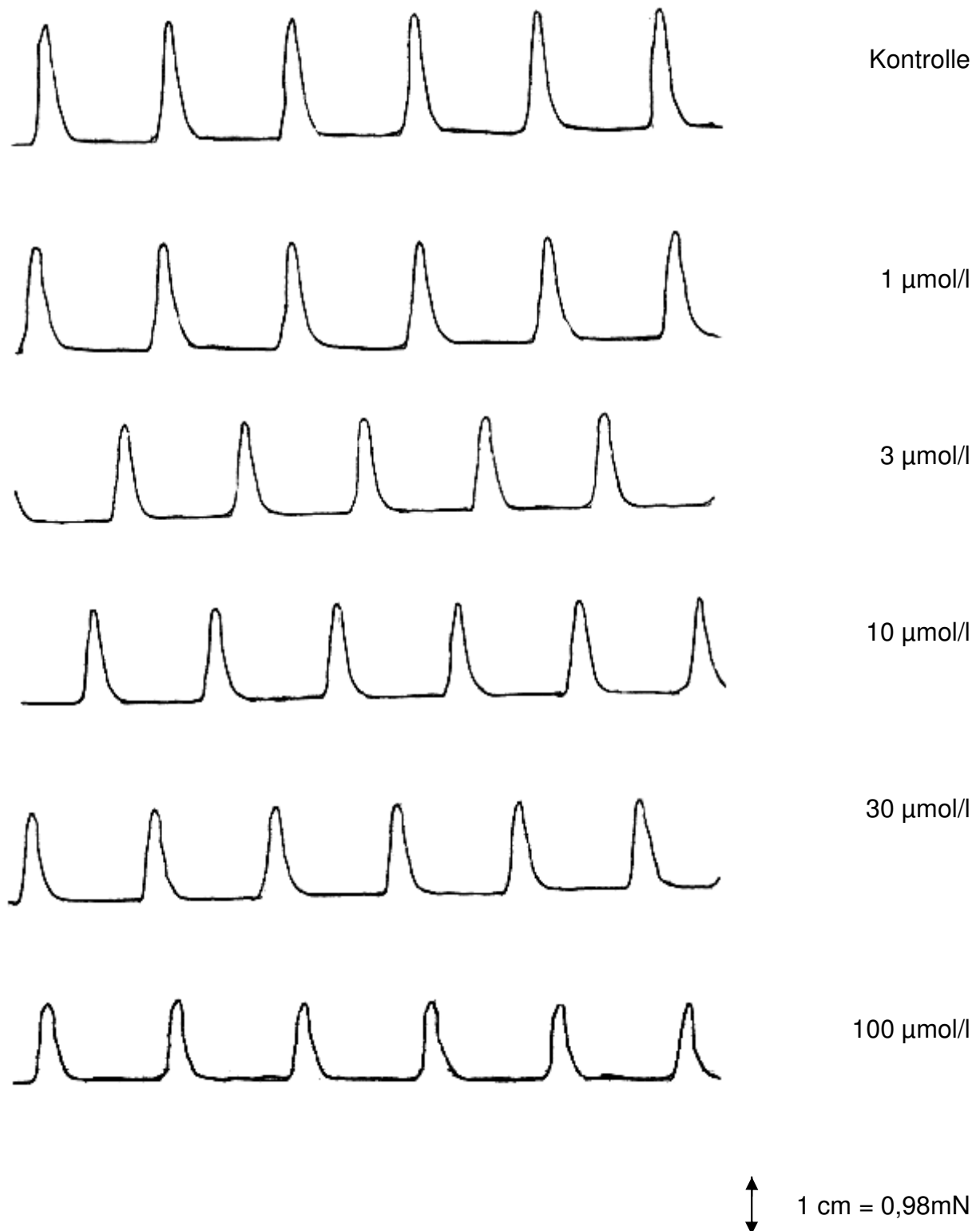
Diagramm 2: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS 25a am Papillarmuskel



Legende zu Diagramm 2:

Die vorher beschriebenen Wirkungen am Papillarmuskel werden durch diese Graphik dargestellt. Man sieht deutlich dass die Ab- und Zunahme der Inotropie nur leicht um den Ausgangswert schwankt. Auf der x-Achse ist die Konzentration in µmol/l, auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft aufgetragen.

Abbildung 17: Originalaufzeichnung der inotropen Wirkung von SWS 25a



Legende zu Abbildung 17:

Die Aufzeichnungen des Schreibers zeigen die Veränderung der Amplitude im Laufe der Zugabe der Testsubstanz.

4.1.3 Aorta descendens

Um eine mögliche dilatierende Wirkung von SWS 25a auf die glatte Muskulatur der Aorta zu untersuchen wurden sechs Präparate vermessen.

Die Vorgehensweise wurde schon in Kapitel 3 beschrieben. Durch Errechnen der Mittelwerte kam man zu einem Kontrollwert von $8,11 \pm 0,37$ mN.

Schon bei etwa einer Konzentration im Organbad von etwa $2 \mu\text{mol/l}$ war eine deutliche Abnahme der Kontraktion erkennbar. Dies steigerte sich mit jeder Zunahme erheblich, so dass schon bei einer Konzentration von $30 \mu\text{mol/l}$ eine vollständige Entspannung der Aortenringe vorlag.

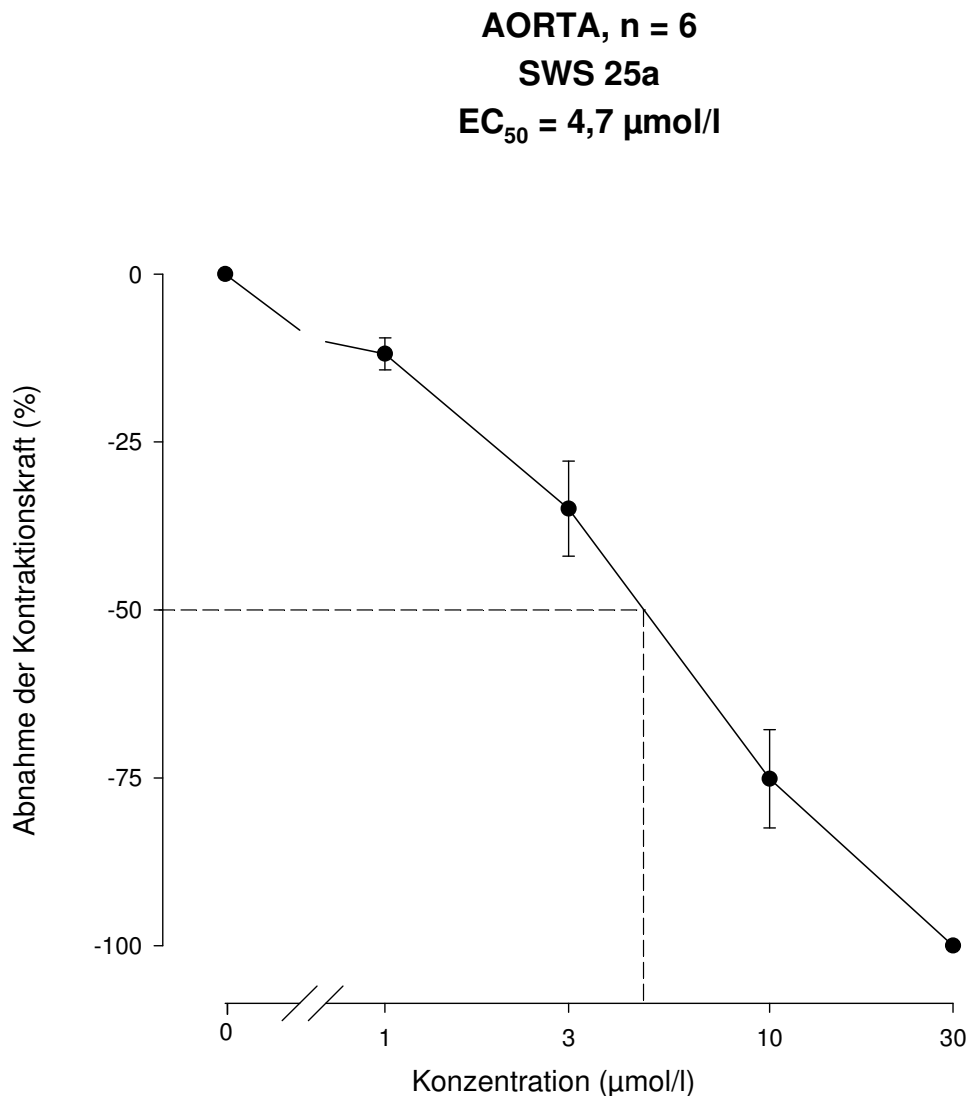
Tabelle 7: Versuchsergebnisse von SWS 25a am Vorhof

SWS 25a $\mu\text{mol/l}$	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$8,11 \pm 0,37$	0 ± 0	6	---
1	$7,13 \pm 0,33$	$-11,89 \pm 2,37$	6	0,01
3	$5,27 \pm 0,61$	$-34,92 \pm 7,07$	6	0,001
10	$2,02 \pm 0,60$	$-75,14 \pm 7,31$	6	0,001
30	0	-100	6	0,001

Legende zu Tabelle 6:

In dieser Darstellung sind die arithmetischen Mittelwerte und der Standardfehler angegeben. f_c steht hier für die Kontraktionskraft in mN. Ebenso ist der prozentuale Wert angegeben.

Diagramm 3: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS 25a an der Aorta



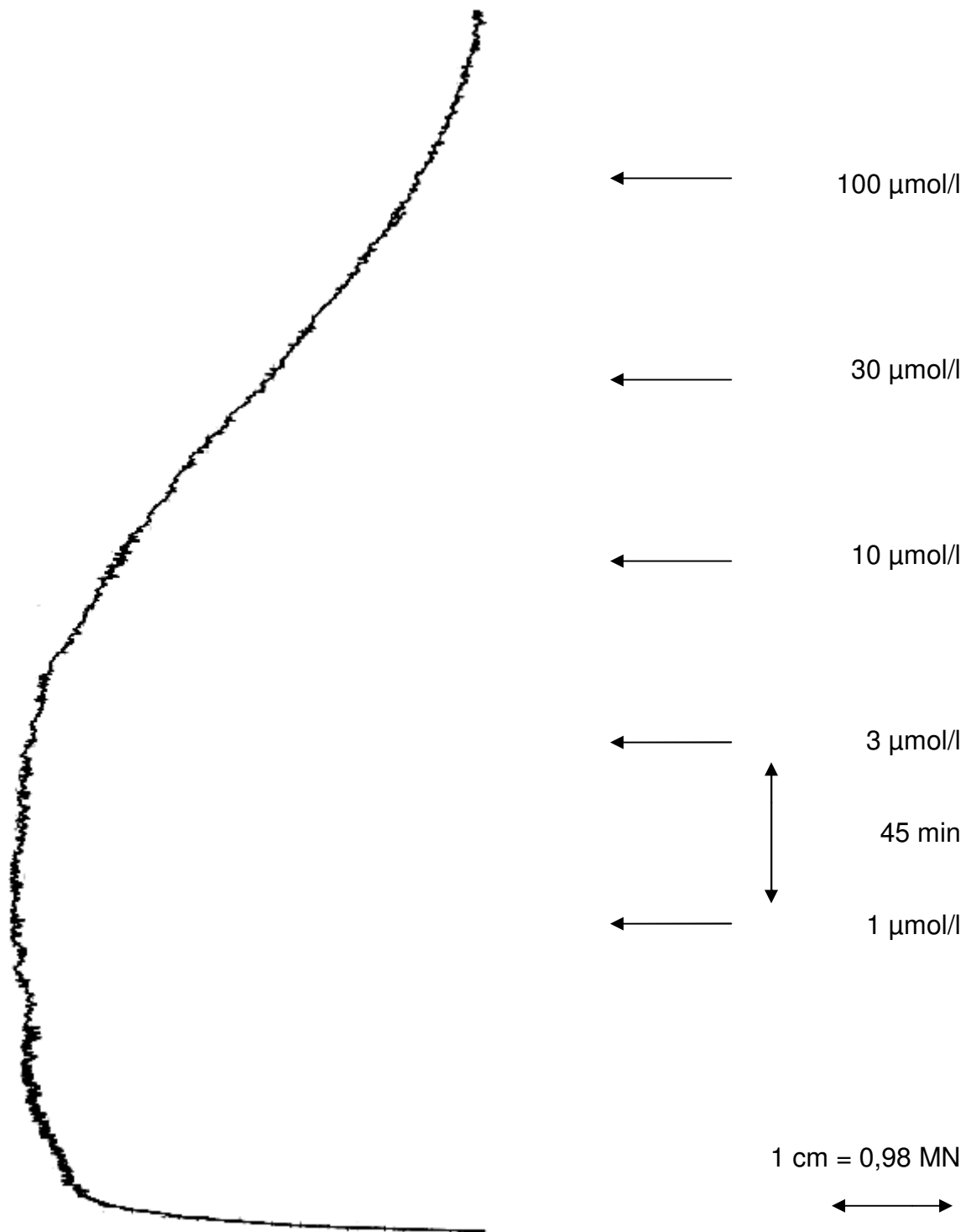
Legende zu Diagramm 3:

Die effektive Wirkung der Testsubstanz SWS 25a ist in dieser Graphik ersichtlich, schon ab etwa 1 µmol/l fällt die Kurve steil ab, noch bevor 30 µmol/l erreicht werden ist die maximal mögliche Dilatation erreicht

Auf der Abszisse sind die Konzentrationen in µmol/l aufgetragen, auf der Ordinate die Abnahme der Kontraktion in Prozent.

Der EC₅₀ Wert kann, hier durch die strichlierten Linien dargestellt, zeichnerisch ermittelt werden und beträgt 4,7 µmol/l.

Abbildung 18: Originalaufzeichnung der vasodilatierenden Wirkung von SWS 25a



Legende zu Abbildung 18:

In der vorliegenden Kurve sieht man die rasche Abnahme der Kontraktion durch ihren schnellen Abfall. Die Pfeile markieren den jeweiligen Einspritzzeitpunkt, die Abstände dazwischen die Zeit von 45 Minuten.

4.1.4 Arteria pulmonalis

Um die Beeinflussung von SWS 25a auf die Lungenarterie zu ermitteln wurden fünf Versuche durchgeführt. Nach maximaler Kontraktion erfolgte die kumulative Substanzzugabe. Die gesammelten Werte wurden arithmetisch gemittelt, der Ausgangswert(= 0 %) mit $15,81 \pm 2,49$ mN festgelegt. Hier zeigte sich eine ähnlich starke Wirkung wie an der Aorta, wobei aber nicht bei jedem Präparat eine vollständige Entspannung eintrat. Die EC_{50} lag dennoch bei mehr als passablen $9,1 \mu\text{mol/l}$.

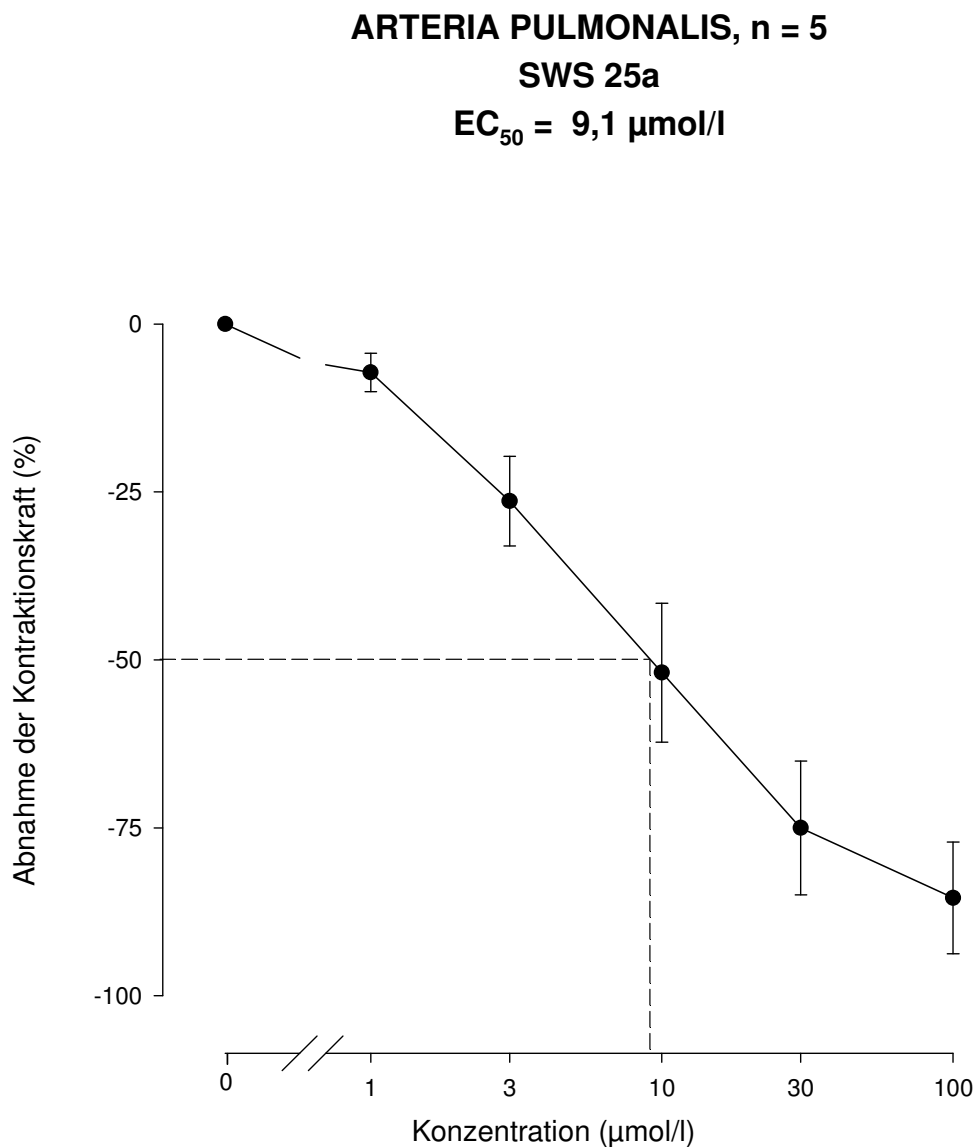
Tabelle 8: Versuchsergebnisse von SWS 25a an der Lungenarterie

SMS 25a $\mu\text{mol/l}$	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$15,81 \pm 2,49$	0 ± 0	5	---
1	$14,73 \pm 2,56$	$-7,2 \pm 2,88$	5	0,05
3	$12,02 \pm 2,94$	$-26,36 \pm 6,67$	5	0,01
10	$48,11 \pm 10,3$	$-51,89 \pm 10,33$	5	0,01
30	$24,98 \pm 9,97$	$-75,02 \pm 9,97$	5	0,001
100	$14,57 \pm 2,11$	$-85,43 \pm 8,32$	5	0,001

Legende zu Tabelle x:

Hier sind die Mittelwerte der Kontraktionsänderung samt Standardfehler und ihre Entsprechung in Prozent angegeben.

Diagramm 4: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS 25a an der Lungenarterie

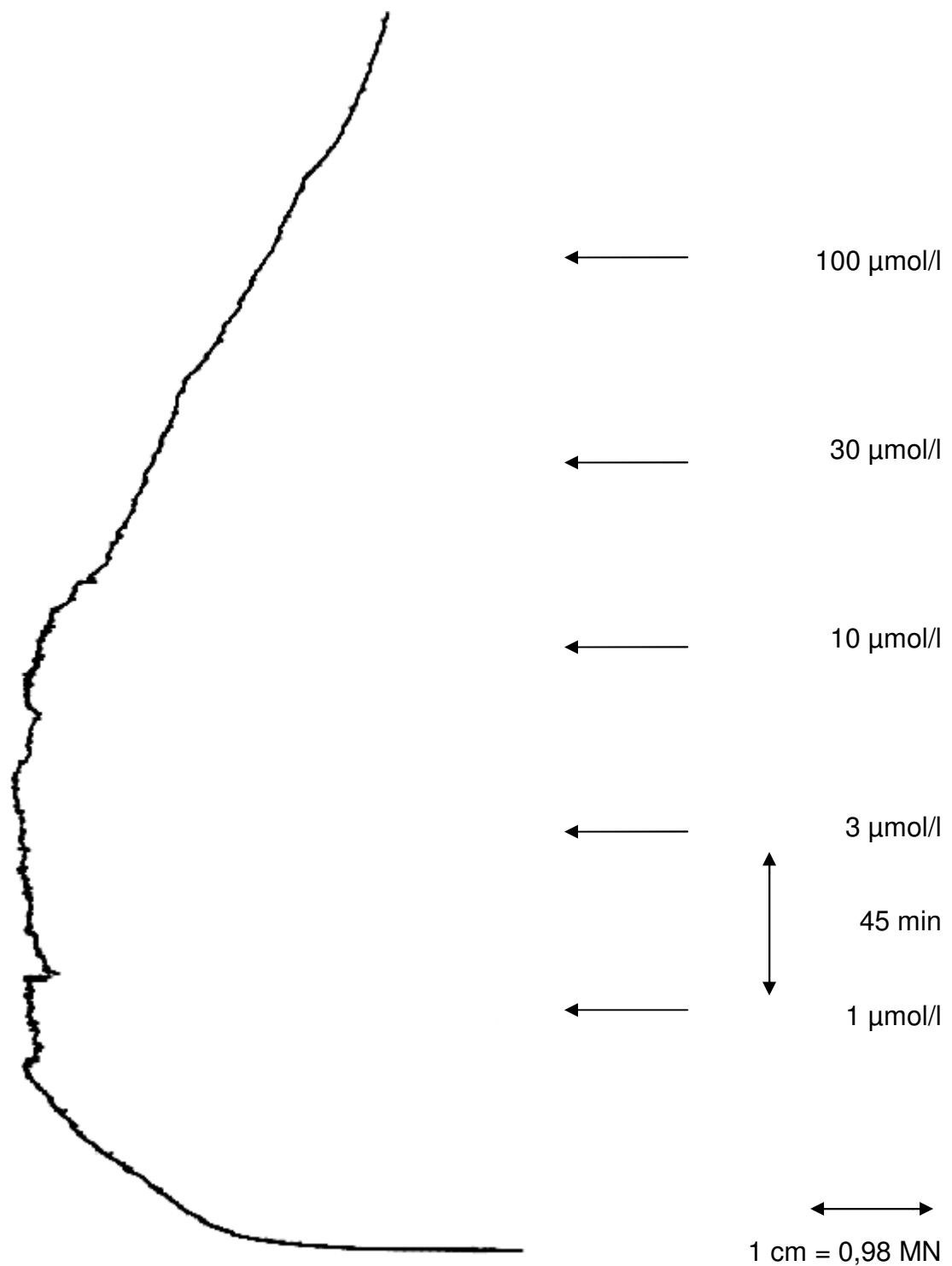


Legende zu Diagramm 4:

Dieses Diagramm zeigt den Einfluss von SWS 25a auf die Arteria pulmonalis in einer übersichtlichen Kurve dargestellt. Die x-Achse stellt die Konzentration in µmol/l und die y-Achse die Abnahme der Kontraktion in Prozent dar.

Die gefüllten Punkte markieren die Mittelwerte, die sie durchquerenden Balken symbolisieren die Größe der Standardfehler. Der EC₅₀ Wert ist hier wieder mit strichlierter Linie markiert.

Abbildung 19: Originalaufzeichnung der vasodilatierenden Wirkung von SWS 25a



Legende zu Abbildung 19:

Diese Originalaufzeichnung zeigt die Abnahme der Kontraktion über die Zeit.

4.1.5 Terminales ileum

Die Wirkung auf das terminale Ileum bzw. seine glatte Muskulatur wurde in einer Versuchsreihe mit sechs Testungen untersucht. Der Kontrollwert wurde wie immer durch mitteln aller Experimente errechnet und betrug in diesem Fall $15,81 \pm 2,49$ mN. Schon nach Erreichen der ersten Badkonzentration von $1 \mu\text{mol/l}$ konnte eine Wirkung nachgewiesen werden, die nach Erreichen von $3 \mu\text{mol/l}$ sehr deutlich wurde und sich mit jeder Erhöhung noch steigerte. So konnte ein EC_{50} Wert schon bei $6 \mu\text{mol/l}$ eruiert werden. Bei der Endkonzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ waren die Präparate nahezu vollständig relaxiert.

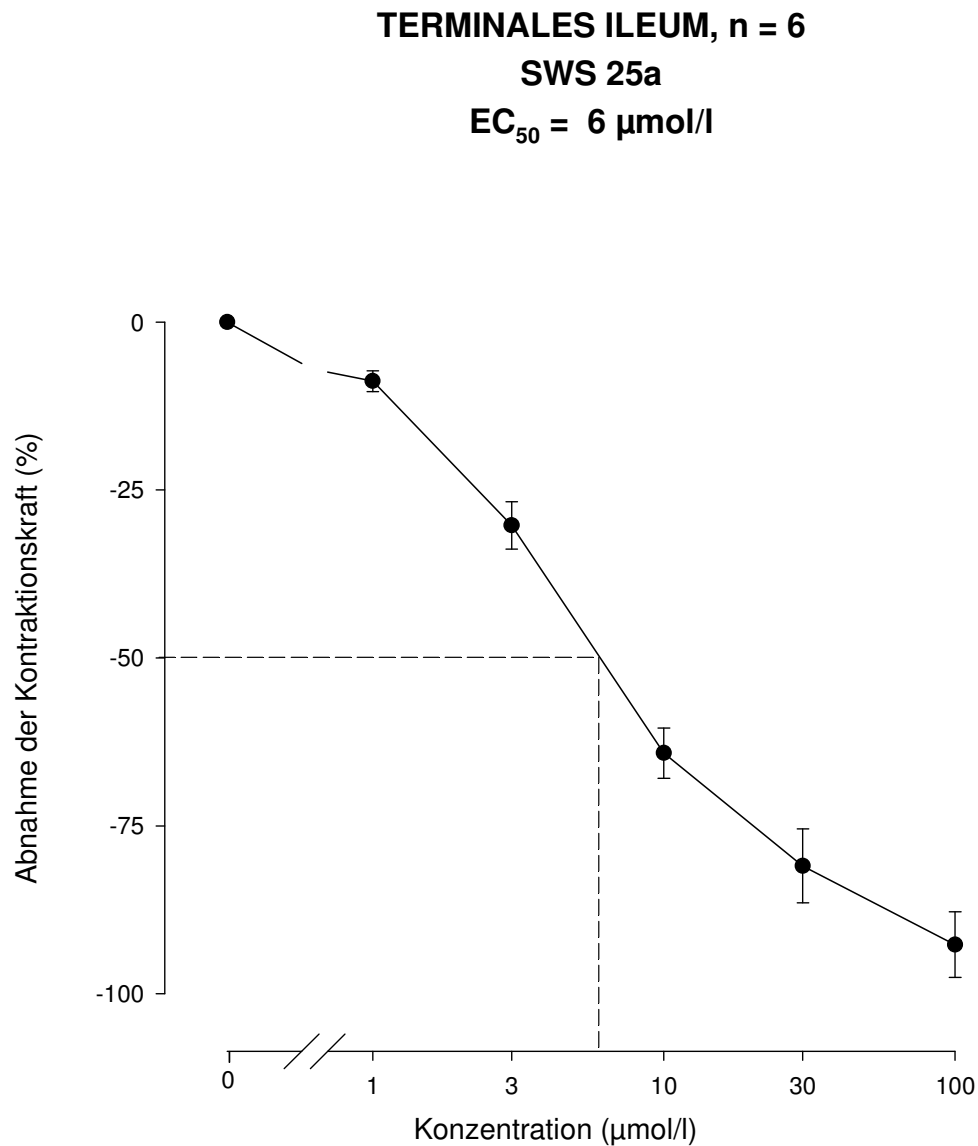
Tabelle 9: Versuchsergebnisse von SWS 25a am Dünndarm

SMS 25a $\mu\text{mol/l}$	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$9,66 \pm 1,93$	0 ± 0	6	---
1	$8,54 \pm 1,84$	$-8,79 \pm 1,56$	6	0,01
3	$6,77 \pm 1,43$	$-30,25 \pm 3,54$	6	0,001
10	$3,5 \pm 0,79$	$-64,18 \pm 3,75$	6	0,001
30	$1,89 \pm 0,64$	$-80,97 \pm 5,49$	6	0,001
100	$1,79 \pm 0,66$	$-92,70 \pm 4,89$	6	0,001

Legende zu Tabelle 9:

f_c steht für die Kontraktionskraft, SEM für die Standardabweichung. n steht für die Anzahl der Versuche, die Irrtumswahrscheinlichkeit P ist ebenso angeführt.

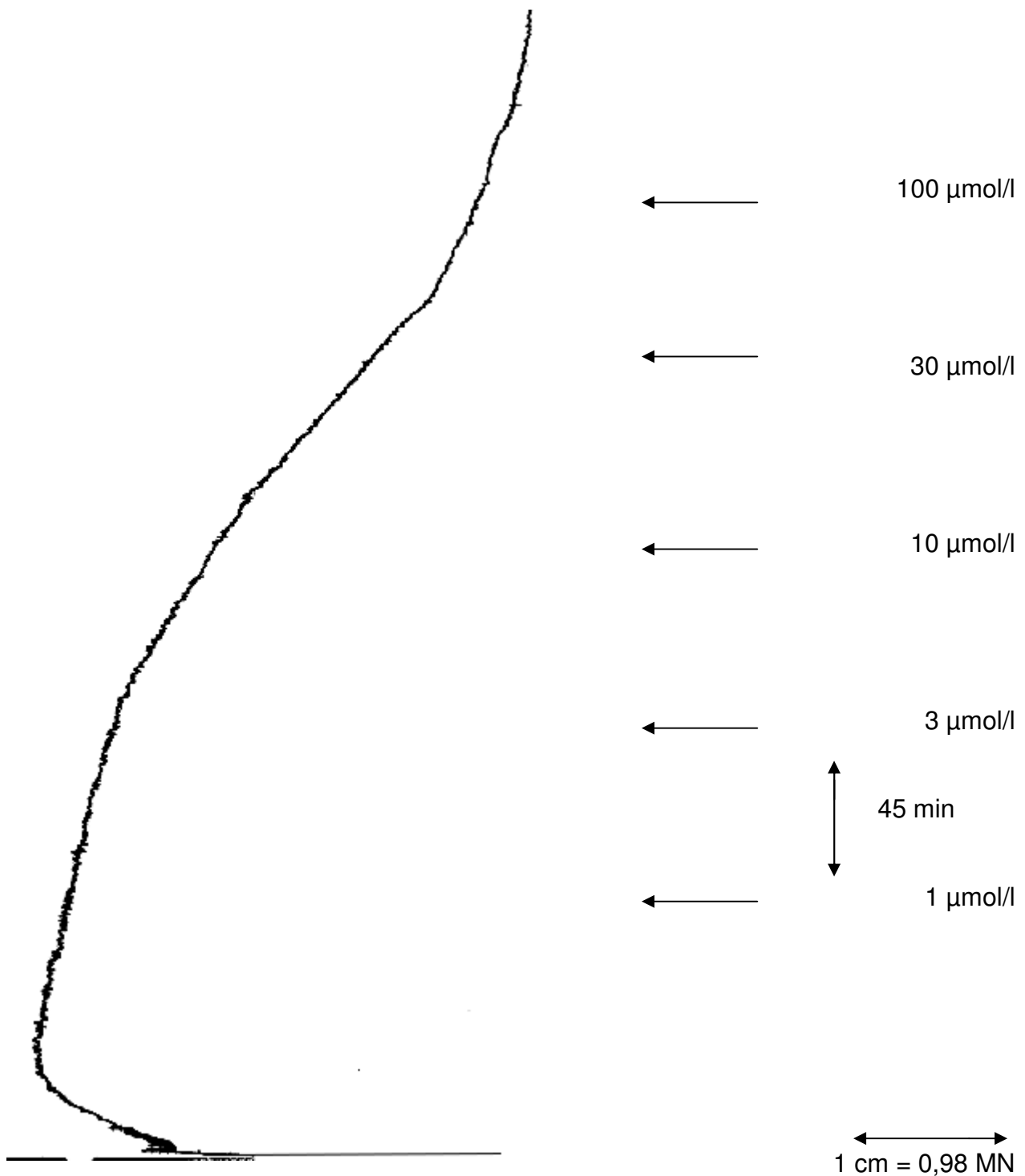
Diagramm 5: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS 25a am Dünndarm



Legende zu Diagramm 5:

Die steile Abnahme der Kurve spiegelt die intensive Wirkung der Testsubstanz auf das Organpräparat wieder. Auf der x-Achse sind die Konzentrationen in µmol/l und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft aufgetragen.

Abbildung 20: Originalaufzeichnung der spasmolytischen Wirkung von SWS 25a



Legende zu Abbildung 20:

Hier ist der originale Kurvenverlauf des Schreibers unter die Wirkung von SWS 25a dargestellt. Man sieht die Kontraktionsabnahme durch den fallenden Verlauf deutlich. Die Pfeile markieren die Einspritzabstände im 45 Minuten Rhythmus.

4.2 Ergebnisse der Testsubstanz WHG 58 T

Zu beachten ist das ab hier alle Versuche mit 200 μmol DMSO durchgeführt wurden. Dadurch ergab sich ein geändertes Pipettierschema. Siehe dazu Kapitel 3.1.3.

4.2.1 Atrium cordis dexter

Zur Untersuchung der Wirkung von oben genannter Testsubstanz auf den Vorhof wurden fünf Versuche durchgeführt.

Den Kontrollwert ermittelte man durch Errechnung des arithmetischen Mittelwertes der Versuchsgesamtheit. In diesem Fall betrug dieser $212 \pm 12,70$ Schläge/Minute. Nachdem alle Konzentrationsstufen durchlaufen waren konnte man feststellen, dass eine Wirkung auf die Chronotropie nicht vorhanden ist. Alle Werte bewegten sich konstant innerhalb bzw. nur knapp außerhalb des Standardfehlers.

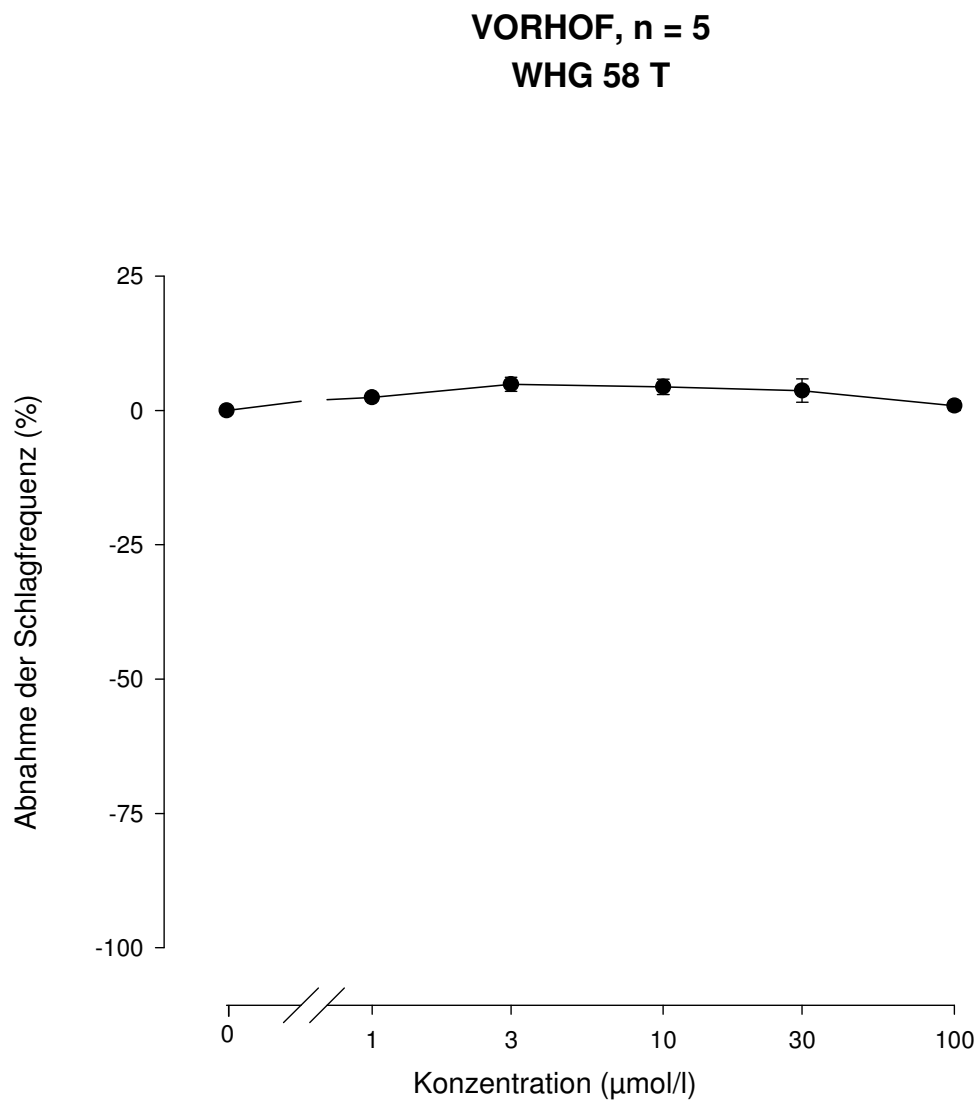
Tabelle 10: Versuchsergebnisse von WHG 58T am Vorhof

SMS 25a $\mu\text{mol/l}$	f $\pm$ SEM (mN))	f $\pm$ SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$212 \pm 12,70$	0 ± 0	5	---
1	$217 \pm 12,70$	$2,40 \pm 0,15$	5	n.s
3	$222 \pm 12,41$	$4,85 \pm 1,33$	5	n.s
10	$221 \pm 12,39$	$4,38 \pm 1,42$	5	n.s
30	$220 \pm 14,41$	$3,68 \pm 2,17$	5	n.s
100	$214 \pm 13,55$	$0,88 \pm 0,91$	5	n.s

Legende zu Tabelle x:

Diese Tabelle zeigt die gesammelten Mittelwerte und die Veränderungen der Schläge pro Minute und in Prozent. Ebenso ist die Irrtumswahrscheinlichkeit angegeben.

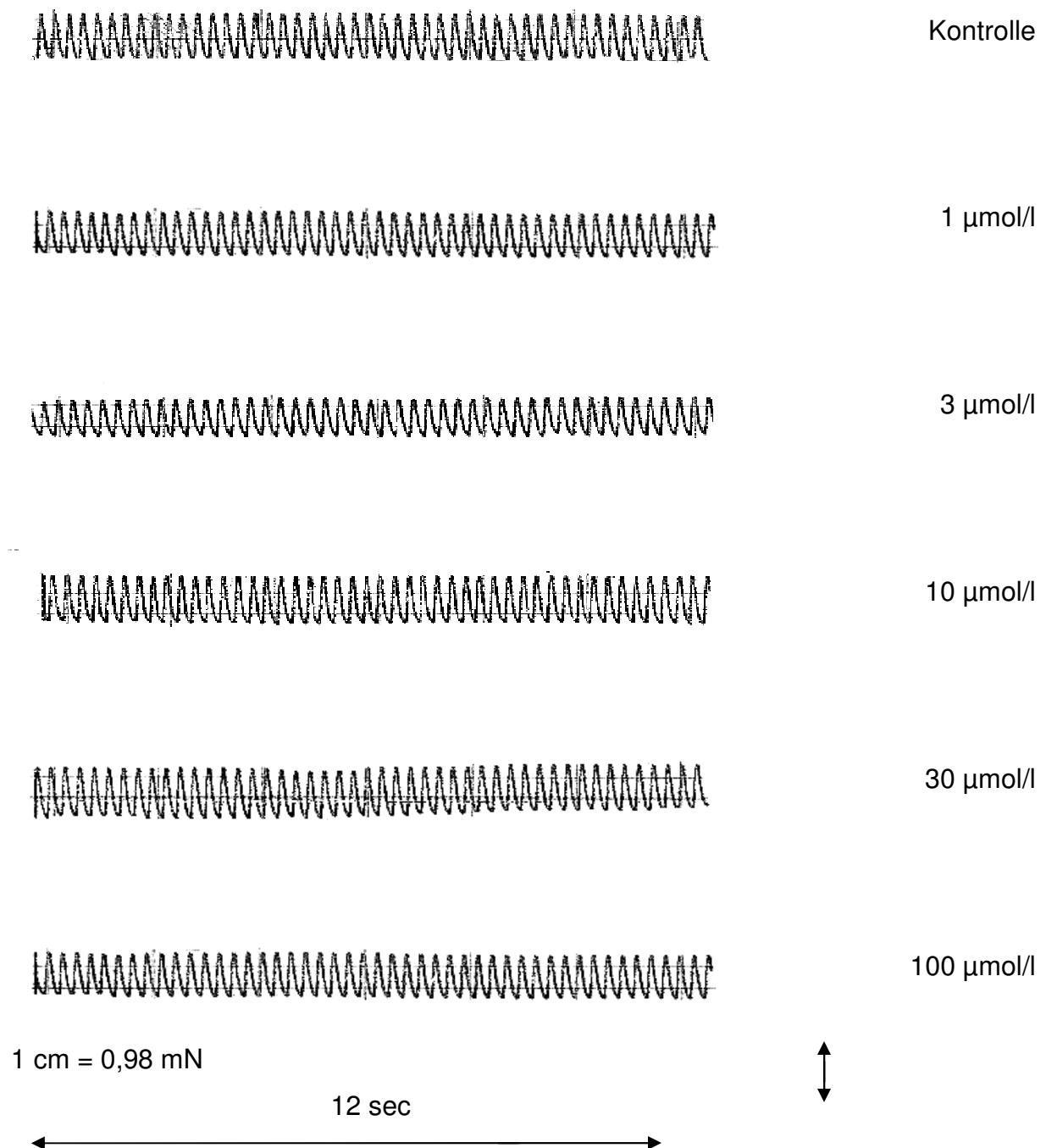
Diagramm 6: Konzentrations-Wirkungskurve von WHG 58T am Vorhof



Legende zu Diagramm 6:

Diese Abbildung veranschaulicht die fehlende Wirkung auf das vorliegende Organpräparat eindrücklich. Unter Substanzeinfluss kam es zu einer leichten, nicht signifikanten Zunahme der Schlagfrequenz. Auf der Abszisse ist die Konzentrationszunahme, auf der Ordinate die Abnahme der Schlagfrequenz aufgetragen.

Abbildung 21: Originalaufzeichnungen der chronotropen Wirkung von WHG 58T



Legende zu Abbildung 21:

In der Abbildung sieht man die Aufzeichnungen der Amplituden an deren Anzahl man die Schläge pro Minute misst. Eine Aufzeichnung entspricht 12 Sekunden, um auf die Anzahl für eine Minute zu kommen multipliziert man mit fünf.

4.2.2 Musculus papillaris

Um die Beeinflussung von WHG 58 T auf die Inotropie zu ermitteln wurden sechs unabhängige Messungen durchgeführt.

Als Kontroll- bzw. Ausgangswert wurde $1,58 \pm 0,45$ mN errechnet. Dieser diente als Basis für mögliche Abnahme der Schlagkraft während der Substanzzugabe. Im Versuch zeigte sich dass der Wirkstoff nicht in der Lage war die Inotropie entscheidend zu beeinflussen. Von der ersten Konzentrationszugabe bis zum Ende wurde lediglich eine leichte Abnahme bzw. anfänglich eine leichte Zunahme der Schlagkraft verzeichnet. Somit konnte auch kein EC_{50} Wert ermittelt werden.

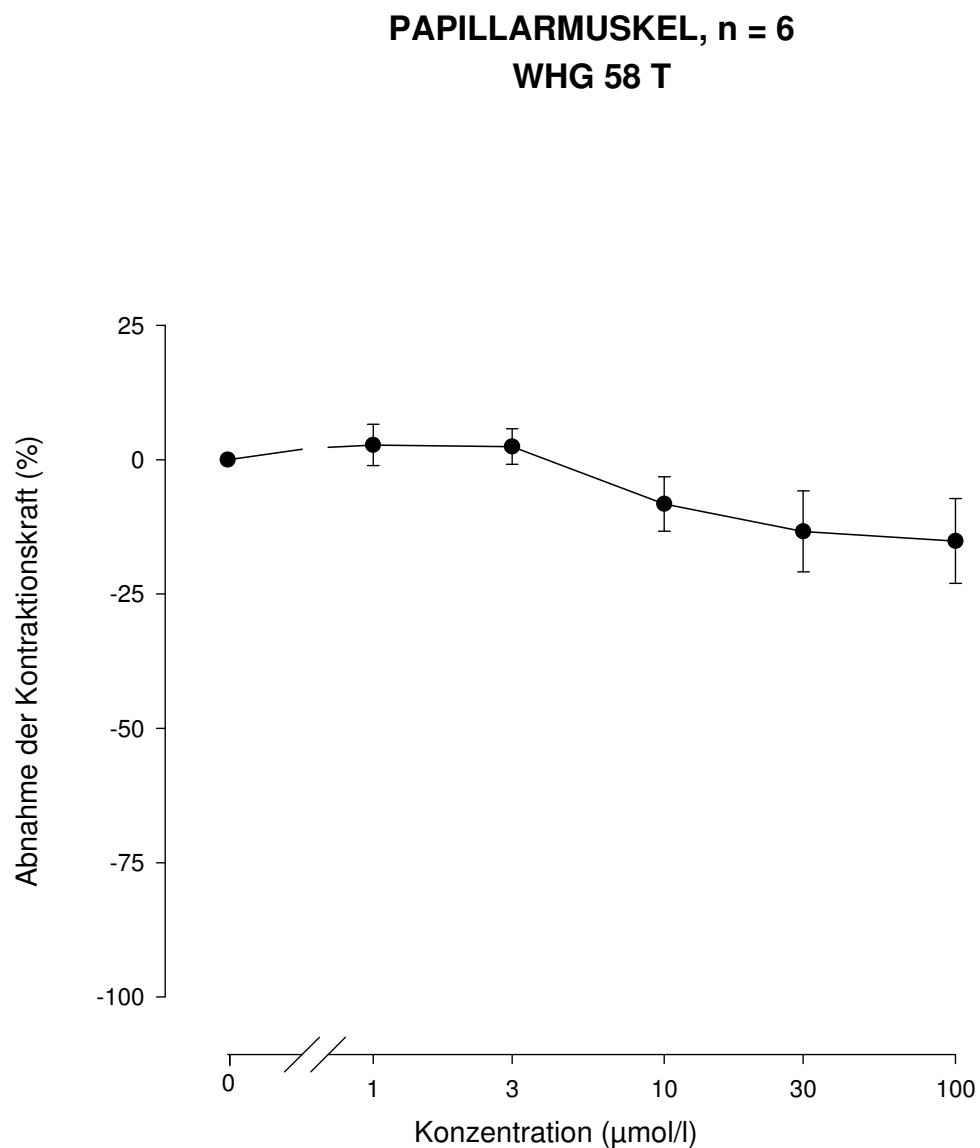
Tabelle 11: Versuchsergebnisse von WHG 58T am Papillarmuskel

SMS 25a $\mu\text{mol/l}$	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN))	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$1,69 \pm 0,36$	0 ± 0	6	---
1	$1,76 \pm 0,40$	$2,73 \pm 3,82$	6	n.s
3	$1,78 \pm 0,41$	$2,43 \pm 3,33$	6	n.s
10	$1,56 \pm 0,35$	$-8,24 \pm 5,06$	6	n.s
30	$1,50 \pm 0,35$	$-13,36 \pm 7,53$	6	n.s
100	$1,48 \pm 0,36$	$-15,14 \pm 7,92$	6	n.s

Legende zu Tabelle 11:

Es werden die arithmetischen Mittelwerte, die Irrtumswahrscheinlichkeit, die Standardfehler und deren prozentuale Entsprechungen angeführt. Die Messungen wurden bei Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ durchgeführt.

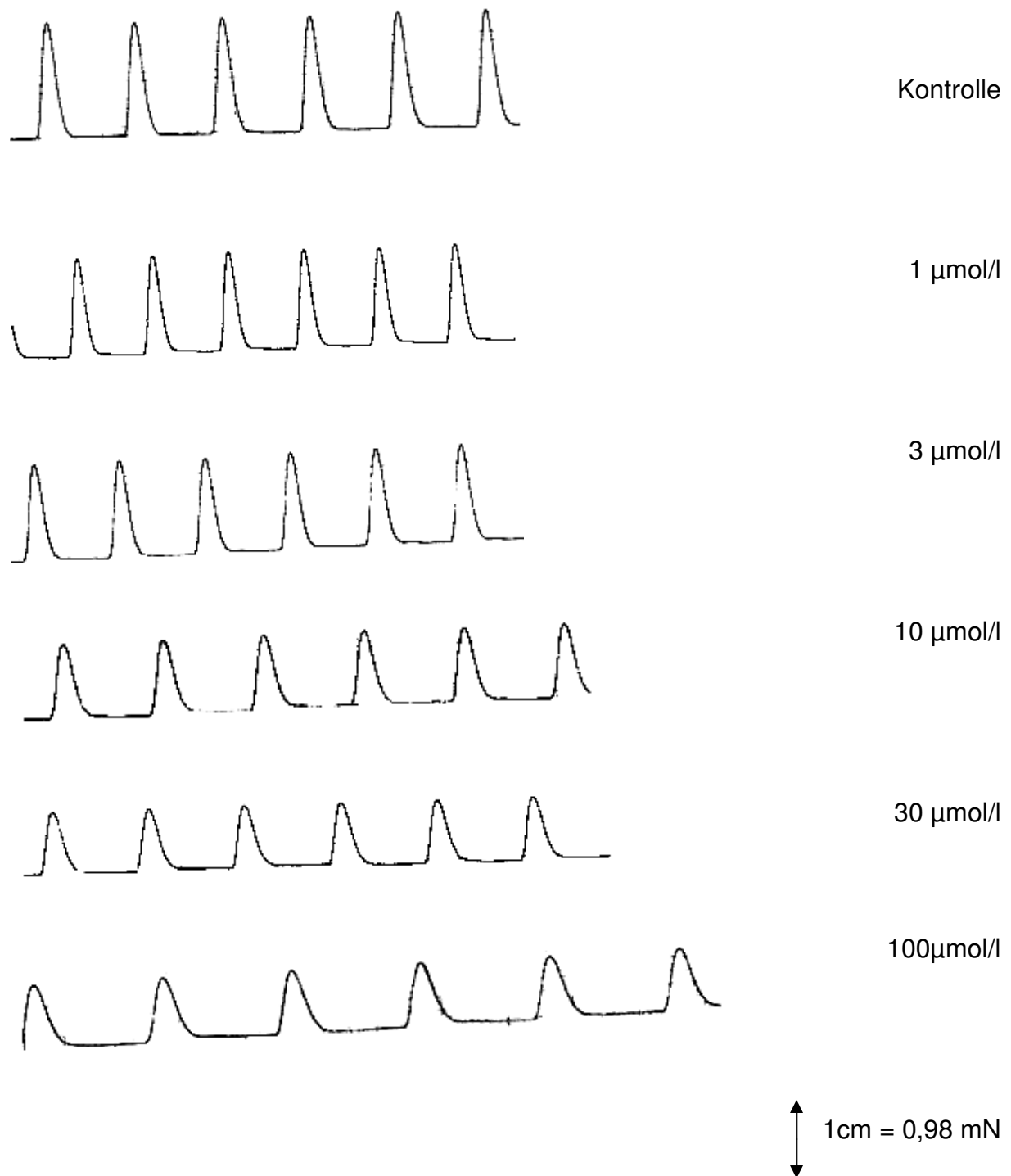
Diagramm 7: Konzentrations-Wirkungskurve von WHG 58T am Papillarmuskel



Legende zu Diagramm 7:

An diesem Konzentrations-Wirkungsdiagramm ist die geringe Wirkung der Substanz ersichtlich. Auf der x-Achse sind die Konzentrationen in µmol/l und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft aufgetragen.

Abbildung 22: Originalaufzeichnungen der inotropen Wirkung von WHG 58T



Legende zu Abbildung 22:

Hier sind die Originalaufzeichnungen des Schreibers dargestellt.

4.2.3 Aorta descendens

Die Ergebnisse hinsichtlich der vasodilatierenden Wirkung an der Hauptschlagader erhielt man aus einer Reihe von fünf Versuchen.

Schon nach den ersten Versuchen war ersichtlich dass keine signifikante Wirkung auf die Aorta zu erwarten ist. Die Kontraktion nahm erst bei einer Wirkstoffkonzentration von knapp unter 100 $\mu\text{mol/l}$ merkbar ab. Der Kontrollwert wurde, wie bei allen Versuchen, durch Errechnen des Mittelwertes festgestellt und betrug hier $8,19 \pm 0,64 \text{ mN}$.

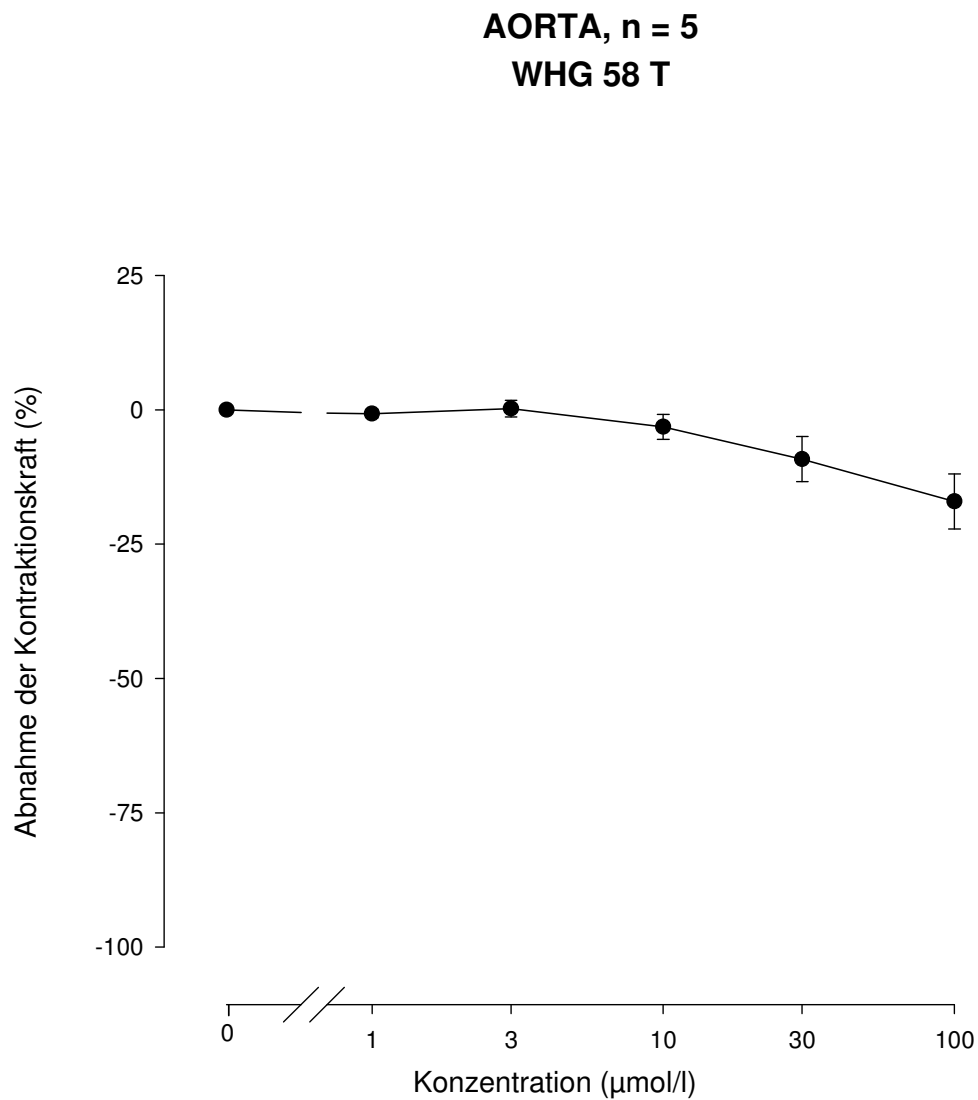
Tabelle 12: Versuchsergebnisse von WHG 58T an Aorta

SMS 25a $\mu\text{mol/l}$	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$8,19 \pm 0,64$	0 ± 0	5	---
1	$8,14 \pm 0,66$	$-0,71 \pm 0,79$	5	n.s
3	$8,21 \pm 0,63$	$0,22 \pm 1,55$	5	n.s
10	$7,86 \pm 0,60$	$-3,17 \pm 2,33$	5	n.s
30	$7,44 \pm 0,69$	$-9,2 \pm 4,21$	5	n.s
100	$6,79 \pm 0,67$	$-17,05 \pm 5,13$	5	0,05

Legende zu Tabelle 12:

f_c steht für die Kontraktionskraft, SEM für die Standardabweichung. Beide Größen sind sowohl in mN als auch Prozent angegeben. Die Wirkung war außer bei 100 $\mu\text{mol/l}$ nicht signifikant.

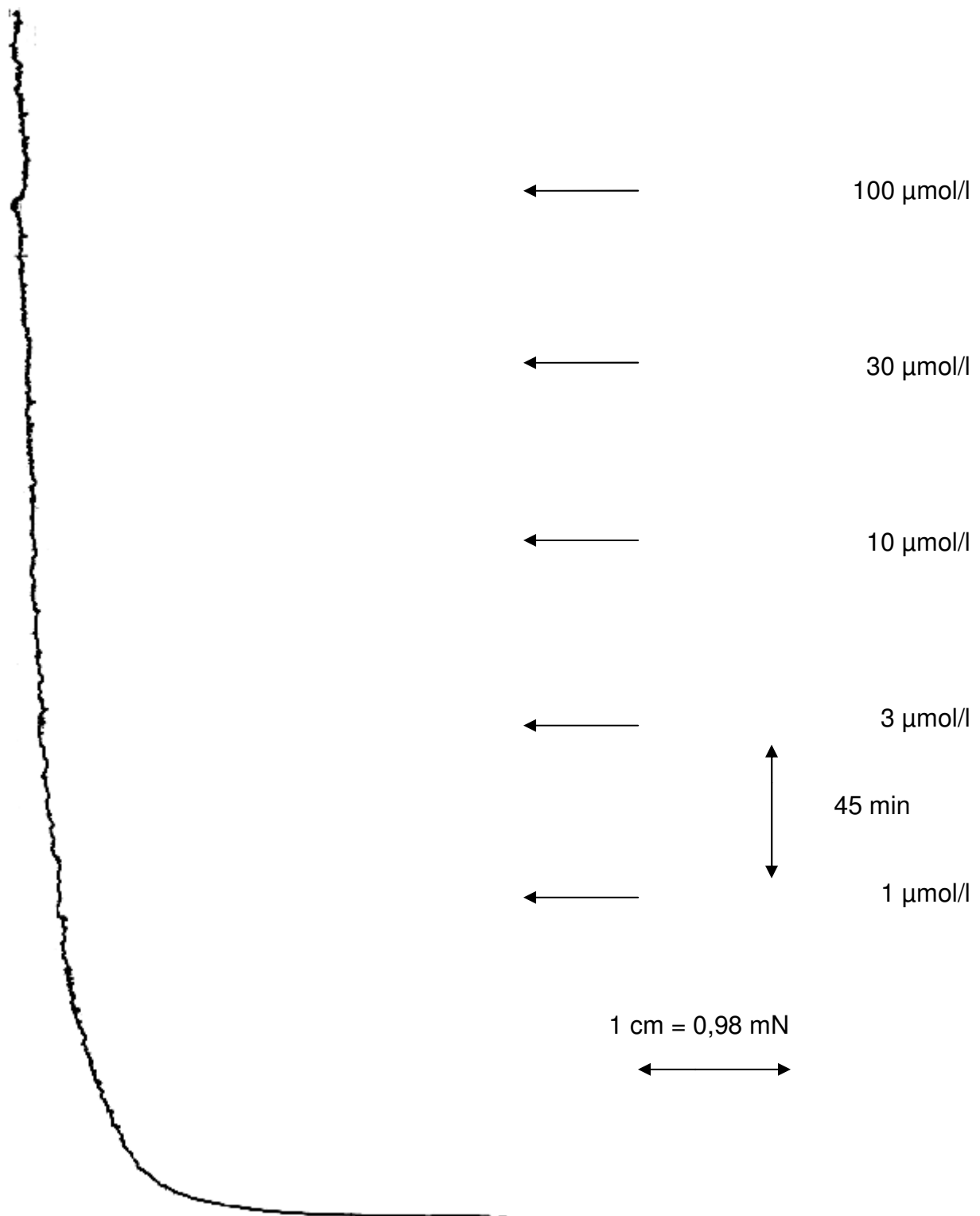
Diagramm 8: Konzentrations-Wirkungskurve von WHG 58T an der Aorta



Legende zu Diagramm 8:

Die Kurve in dieser Abbildung beschreibt den Effekt von WHG 58T auf die glatte Muskulatur der Aorta. Er besitzt keine Signifikanz. Die x-Achse zeigt die Konzentrationszunahme, die y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft.

Abbildung 23: Originalaufzeichnungen der dilatierenden Wirkung von WHG 58T



Legende zu Abbildung 23:

Der Originalkurvenverlauf des Schreibers der Testsubstanz WHG 58T ist hier abgebildet.

4.2.4 Arteria pulmonalis

Nach der Durchführung von fünf Versuchen konnte keine verwertbare Wirkung auf die Pulmonalarterie festgestellt werden. Lediglich bei höheren Wirkstoffkonzentrationen, welche durch kumulative Zugabe erreicht wurden, konnte lediglich eine schwache Abnahme der Kontraktion gezeigt werden. Der errechnete Ausgangswert dieser Versuchsreihe betrug $13,27 \pm 1,90$ mN.

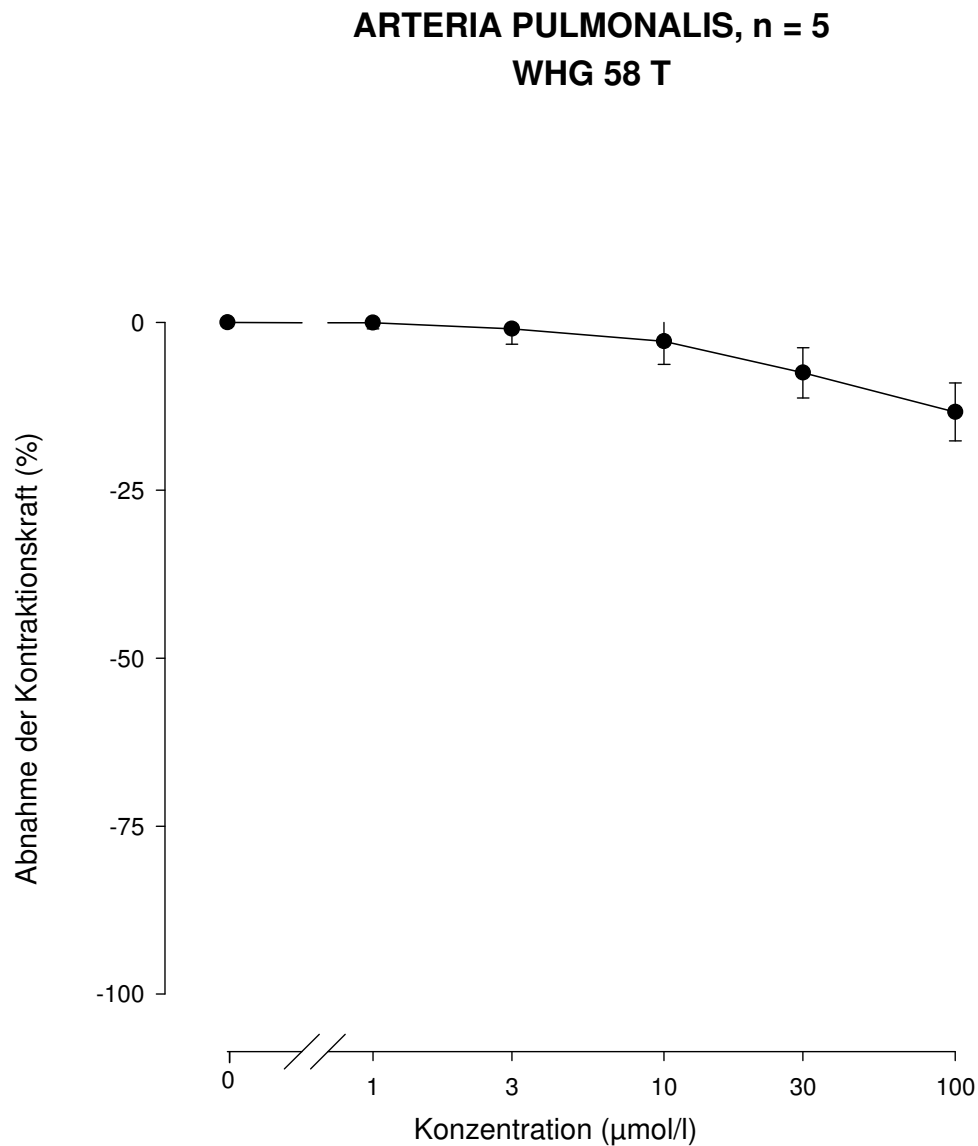
Tabelle 13: Versuchsergebnisse von WHG 58T an der Lungenarterie

SMS 25a μmol/l	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$13,27 \pm 1,90$	0 ± 0	5	---
1	$13,24 \pm 1,85$	$-0,04 \pm 0,90$	5	n.s
3	$13,11 \pm 1,82$	$-0,94 \pm 2,30$	5	n.s
10	$12,85 \pm 1,78$	$-2,83 \pm 3,41$	5	n.s
30	$12,20 \pm 1,67$	$-7,5 \pm 3,73$	5	n.s
100	$11,45 \pm 1,61$	$-13,33 \pm 4,32$	5	n.s

Legende zu Tabelle 13:

Aus der Tabelle kann man den geringen Effekt auf die Pulmonalarterie ablesen. Die prozentuale Abnahme beträgt maximal 13,33 %, eine EC_{50} wurde somit nicht erreicht. Weiters sind die Werte für die Irrtumswahrscheinlichkeit angeführt.

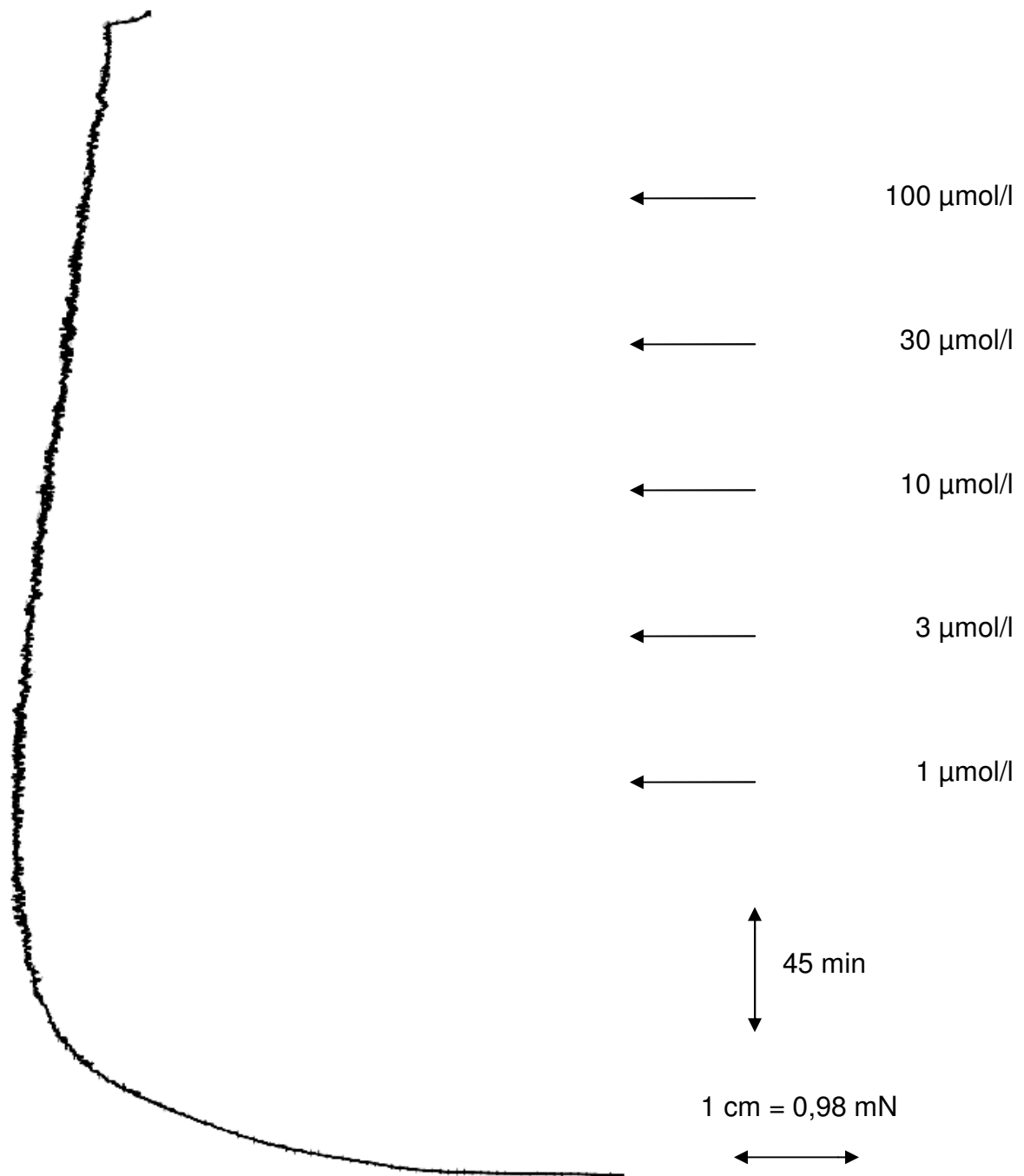
Diagramm 9: Konzentrations-Wirkungskurve von WHG 58T an der Lungenarterie



Legende zu Diagramm 9:

Aus dieser Darstellung geht eindeutig hervor wie gering die Wirkung an der Pulmonalarterie ausfällt, so dass kein EC_{50} Wert erreicht wurde. Auf der x-Achse ist die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen, auf der y-Achse die Kontraktionsabnahme.

Abbildung 24: Originalaufzeichnungen der dilatierenden Wirkung von WHG 58T



Legende zu Abbildung 24:

Hier ist die Kurve wie sie der Flachbettschreiber aufzeichnet zu sehen.

4.2.5 Terminales Ileum

Für die Untersuchung einer möglichen dilatierenden Wirkung auf den Dünndarm wurden sechs Versuche durchgeführt.

Quer durch alle Konzentrationsstufen ließ sich nur eine mäßige Wirkung nachweisen, die Abnahme der Kontraktion erreichte gegen Ende in etwa -15 Prozent vom Kontrollwert. Ein EC_{50} Wert konnte demgemäß nicht erreicht werden. Ausgegangen wurde von einem Wert von $9,43 \pm 1,09$ mN.

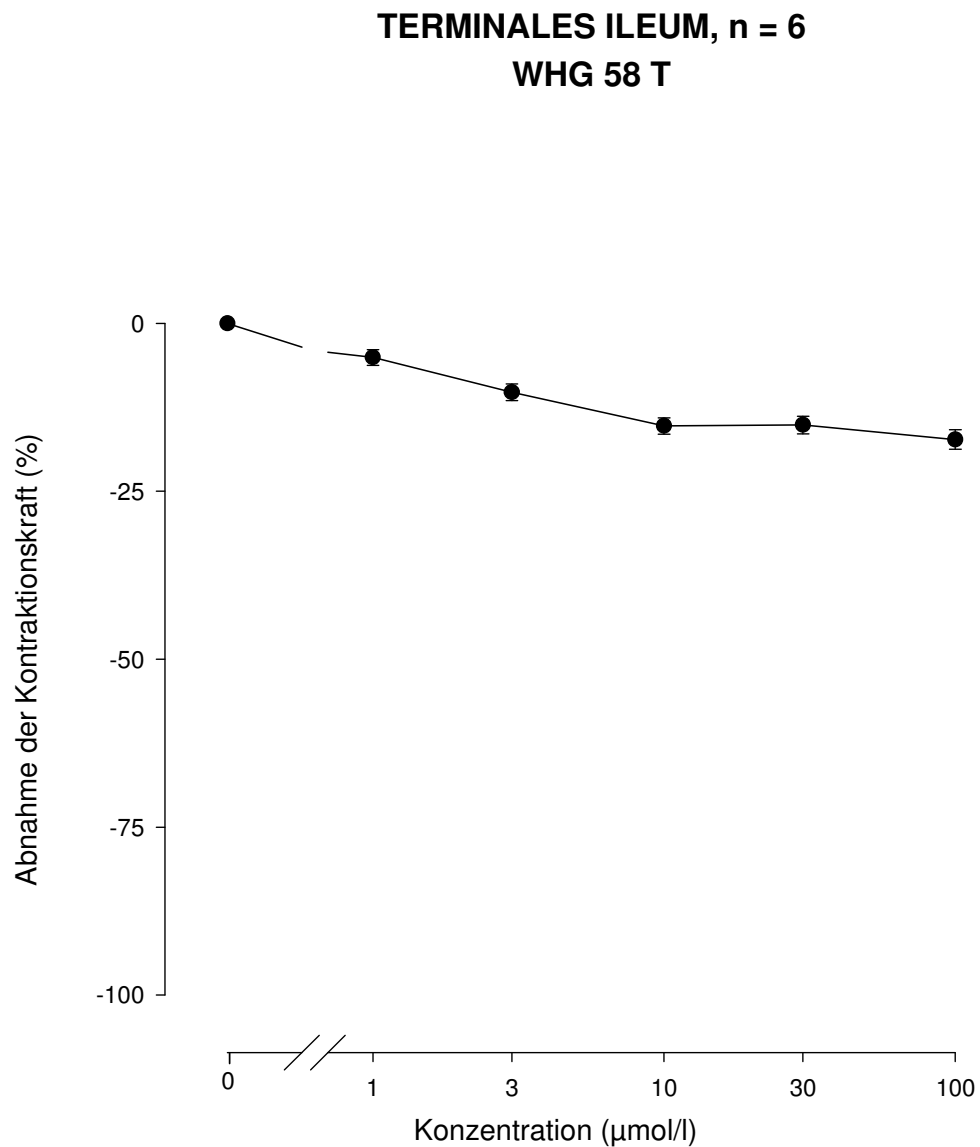
Tabelle 14: Versuchsergebnisse von WHG 58T am Dünndarm

SMS 25a $\mu\text{mol/l}$	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$9,43 \pm 1,09$	0 ± 0	6	---
1	$8,97 \pm 1,17$	$-5,07 \pm 2,00$	6	n.s
3	$8,58 \pm 1,23$	$-10,25 \pm 3,88$	6	n.s
10	$8,11 \pm 1,22$	$-15,27 \pm 4,45$	6	0,01
30	$8,18 \pm 1,31$	$-15,12 \pm 5,21$	6	0,05
100	$8,06 \pm 1,46$	$-17,30 \pm 7,25$	6	0,05

Legende zu Tabelle 14:

In dieser Darstellung sind die arithmetischen Mittelwerte und der Standardfehler sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit angegeben. f_c steht für die Kontraktionskraft in mN. Ebenso ist der prozentuale Wert angegeben.

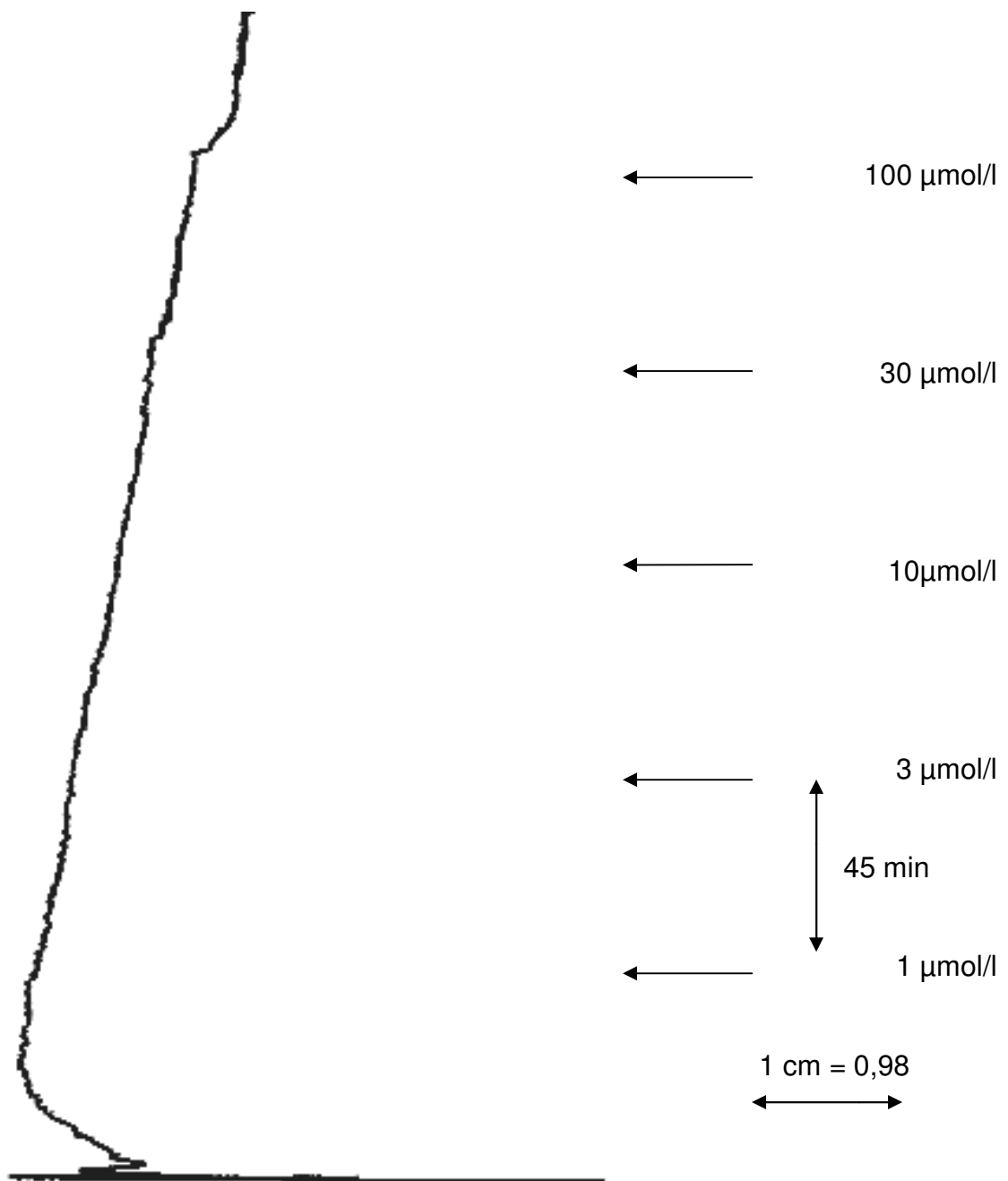
Diagramm 10: Konzentrations-Wirkungskurve von WHG 58T am terminalen Ileum



Legende zu Diagramm 10:

An diesem Konzentrations-Wirkungsdiagramm ist die geringe Wirkung der Substanz ersichtlich. Die Abszisse zeigt die Konzentrationszunahme in µmol/l, die Ordinate die Abnahme der Kontraktion in Prozent.

Abbildung 25: Originalaufzeichnungen der spasmolytischen Wirkung von WHG 58T



Legende zu Abbildung 25:

In der Abbildung ist klar ersichtlich, dass aufgrund der schwachen Wirkung keine EC_{50} erreicht werden konnte.

4.3 Versuche zur Analyse des Wirkungsmechanismus von SWS 25 auf die Aorta

Aufgrund dessen dass die Wirkung auf die Aorta am Stärksten war wurden Untersuchungen durchgeführt um die Wirkweise näher zu erforschen.

Hierzu wurden Versuchsreihen gestartet, bei denen die Substanzen Nitro-L-Arginin, Glibenclamid und Phenylephrin zum Einsatz kamen.

4.3.1 Effekt von SWS 25a in Kombination mit Nitro-L-Arginin auf die Aorta

Die Vorgehensweise wurde bereits früher angeschnitten, siehe dazu Kapitel 3.6.2.1.

Die Untersuchung hatte das Ziel herauszuarbeiten ob SWS 25a über das NO-System wirkt. Nitro-L-Arginin ist ein Inhibitor der NO-Synthase. Würde Schwefelwasserstoff via Stimulation derselben wirken, käme es bei dem Versuch zu keiner Relaxation.

Nach maximaler Kontraktion durch die Kaliumchloridlösung wurde ein Kontrollwert von $6,63 \pm 1,33$ mN ermittelt.

Dann wurden zuerst 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin und nach 45 minütiger Gewöhnungszeit SWS 25a in einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ zugesetzt, was der ermittelten, gerundeten EC_{50} der Substanz entsprach.

Die Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin brachte keine signifikante Veränderung. Nach Zugabe von SWS 25a kam es nur zu einer sehr schwachen Abnahme von etwa 0,74 mN, was etwa 12 Prozent entsprach. Somit kann man die Wirkung über das NO-System als durchaus signifikant bezeichnen.

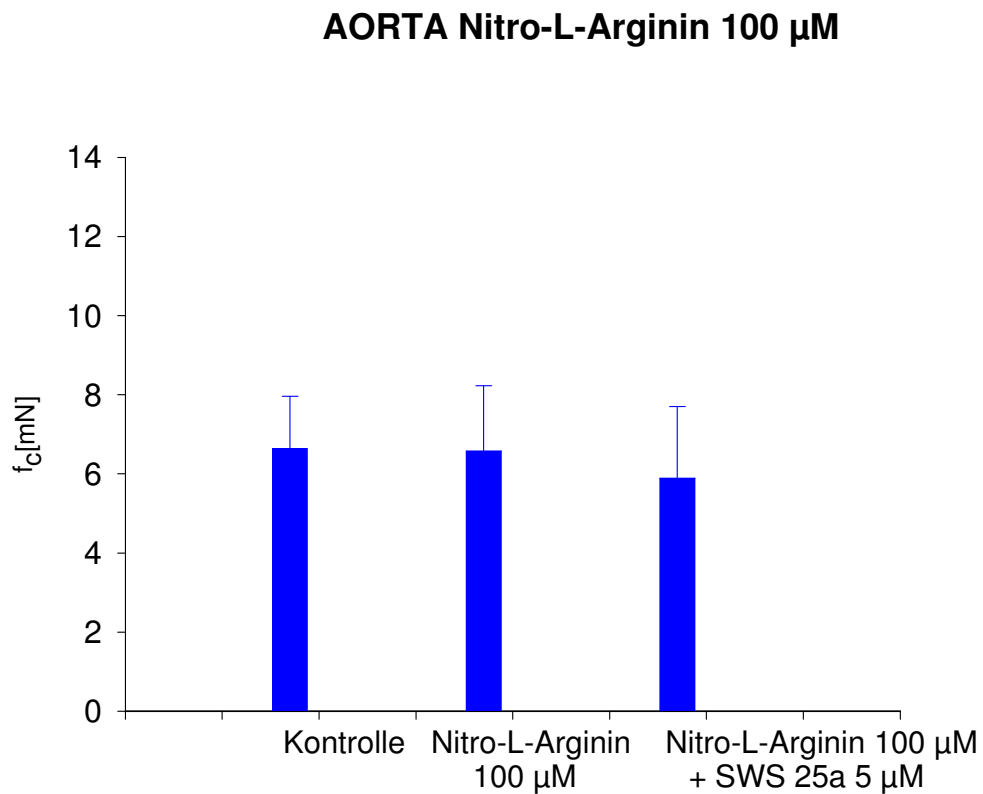
Tabelle 15: Ergebnisse Wirkmechanismus mit Nitro-L-Arginin

Konz. ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche	Irrtums- wahrscheinlichkeit
Kontrolle	$6,63 \pm 1,33$	4	---
100 μM Nitro-L-Arginin	$6,58 \pm 1,65$	4	---
+ 5 μM SWS 25a	$5,89 \pm 1,81$	4	n.s

Legende zu Tabelle 15:

Es werden die arithmetischen Mittelwerte und der Standardfehler der Ergebnisse während der Versuchsreihe angeführt.

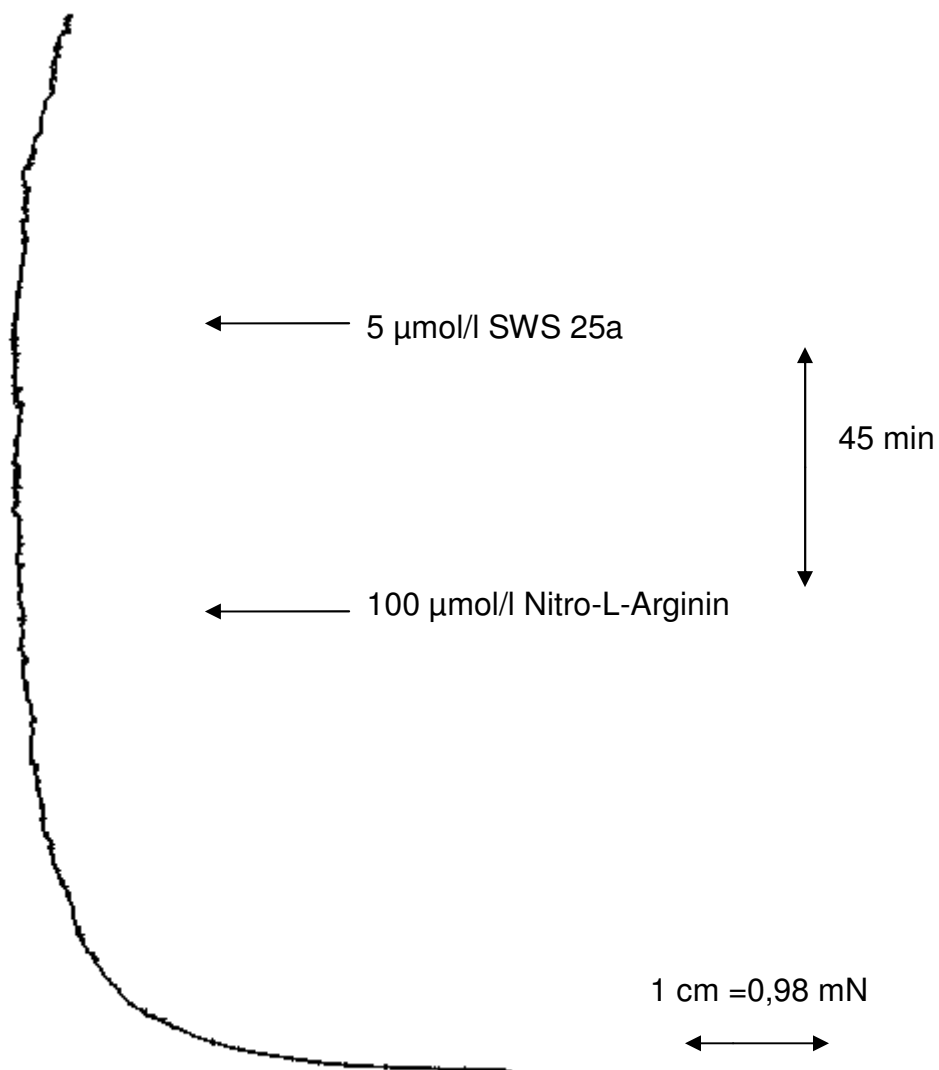
Diagramm 11: Graphische Darstellung der Ergebnisse des Versuches in einem Balkendiagramm.



Legende zu Diagramm 11:

Die blauen Balken stellen die Stärke der Kontraktion in mN dar, die dünnen Striche darauf geben die Größe des Standardfehlers an. Wie ersichtlich ist die Wirkung von SWS 25a minimal. Auf der y-Achse ist die Kontraktionskraft in mN aufgetragen.

Abbildung 25: Originalaufzeichnungen des Versuchs mit Glibenclamid an der Aorta



Legende zu Abbildung 25:

Im Kurvenverlauf des Detektors sieht man die schwache Abnahme der Kontraktion übersichtlich dargestellt. Die Pfeile markieren die Einspritzzeitpunkte bzw. den Zeitabstand.

4.3.2 Effekt von SWS 25a in Kombination mit Glibenclamid auf die Aorta

In diesem Versuch galt es herauszufinden ob der Kaliumkanalblocker Glibenclamid in der Lage war die Wirkung von SWS 25a zu antagonisieren. Damit wäre der Wirkmechanismus auf eine Öffnung der Kaliumkanäle zurückzuführen. Es wurden zwei verschiedene Konzentrationen vermessen, 30 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$. Die grundsätzliche Vorgehensweise ist analog der zu dem Experiment mit Nitro-L-Arginin, siehe 4.3.1.

Während es nach Zugabe von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid zu fast keiner Abnahme der Kontraktion kam, erzielte die Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ eine Abnahme um fast 20 Prozent. Die Zugabe von jeweils 5 $\mu\text{mol/l}$ SWS 25a relaxierte das Organ bei beiden Versuchen noch mal in gleicher Weise um etwa 12 Prozent.

Somit schwächt die Zugabe des Kaliumkanalblockers die Wirkung von SWS 25a ab, was auf eine Beteiligung von diesen Kanälen schließen lässt.

Tabellen 15 und 16: Ergebnisse Wirkmechanismus mit Glibenclamid

Konz. ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche	Irrtums- wahrscheinlichkeit
Kontrolle	$6,37 \pm 1,16$	4	---
30 μM Glibenclamid	$6,16 \pm 1,09$	4	---
+ 5 μM SWS 25a	$5,39 \pm 0,92$	4	n.s

Konz. ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche	Irrtums- wahrscheinlichkeit
Kontrolle	$8,93 \pm 1,66$	4	---
100 μM Glibenclamid	$7,33 \pm 1,38$	4	---
+ 5 μM SWS 25a	$6,59 \pm 1,33$	4	n.s

Legende zu Tabelle 15 und 16:

Hier sind die Mittelwerte der Kontraktionsänderung samt Standardfehler sowohl für 30 $\mu\text{mol/l}$ als auch für 100 $\mu\text{mol/l}$ angegeben.

Diagramm 12: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Versuche in einem Balkendiagramm.

AORTA Glibenclamid 30 μM

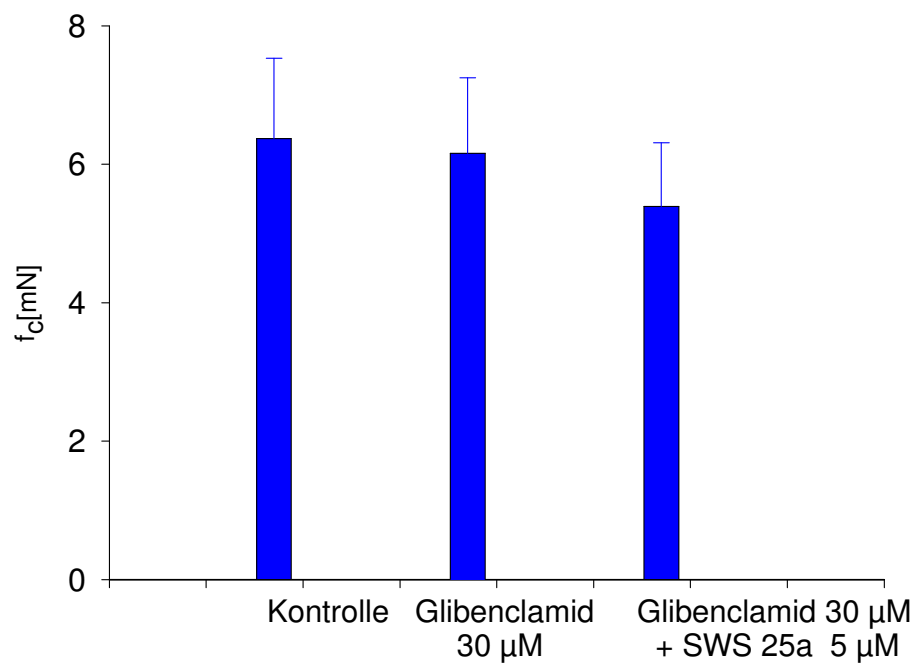
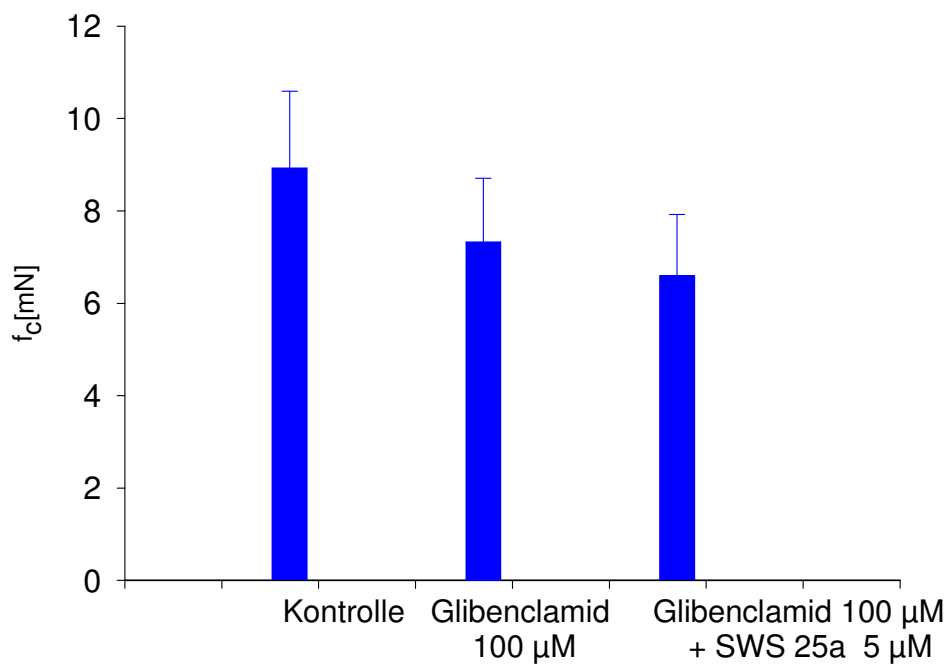


Diagramm 13 : Graphische Darstellung der Ergebnisse der Versuche in einem Balkendiagramm.

AORTA Glibenclamid 100 μM



Legende zu Diagramm 12 und 13:

In dieser Graphik werden die Auswirkungen auf die Kontraktilität nach Zugabe von Glibenclamid in den zwei Testkonzentrationen, sowie nach Zugabe der EC_{50} Konzentration von SWS 25a dargestellt.

Abbildung 26: Originalaufzeichnungen des Versuchs mit Glibenclamid an der Aorta

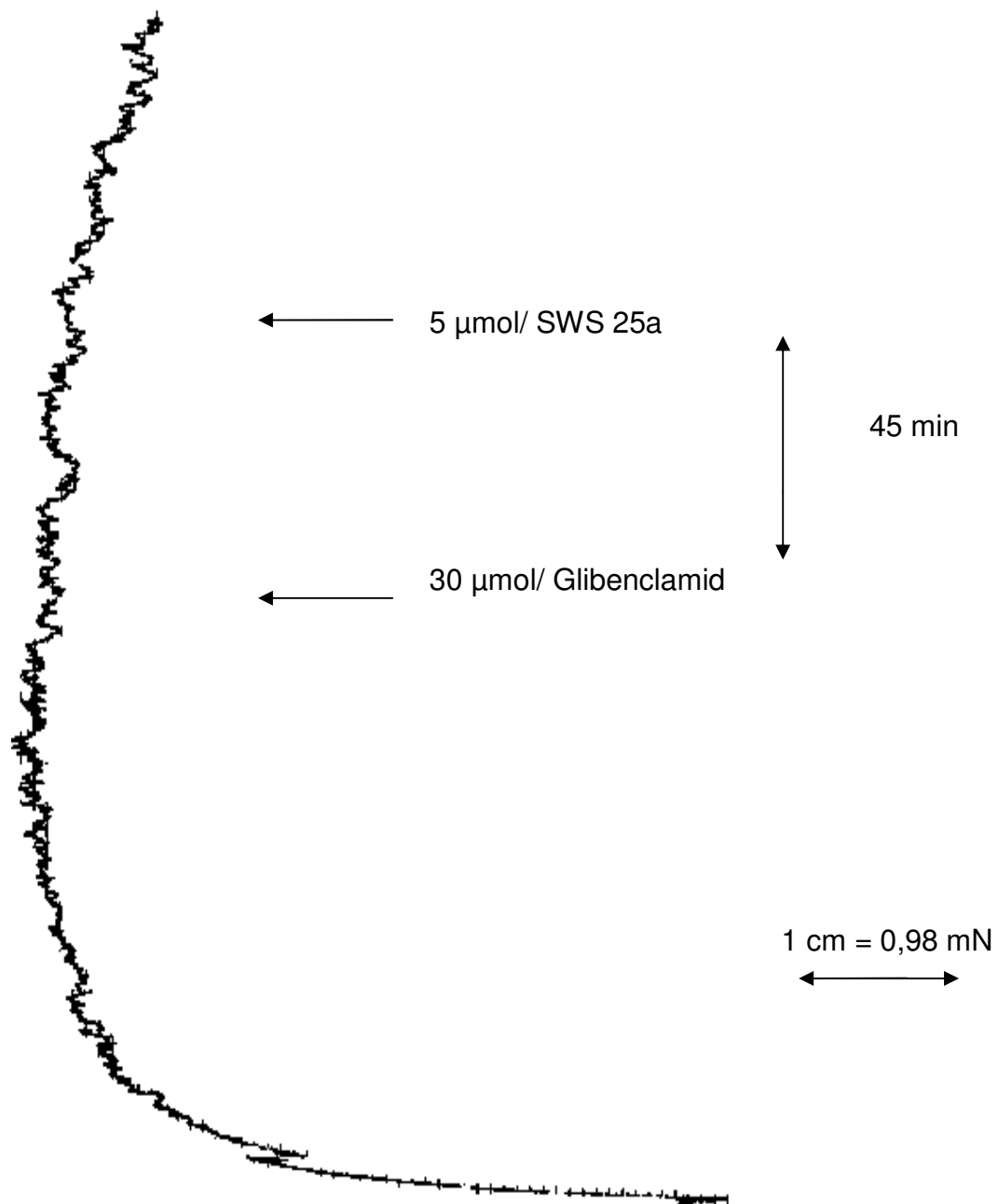
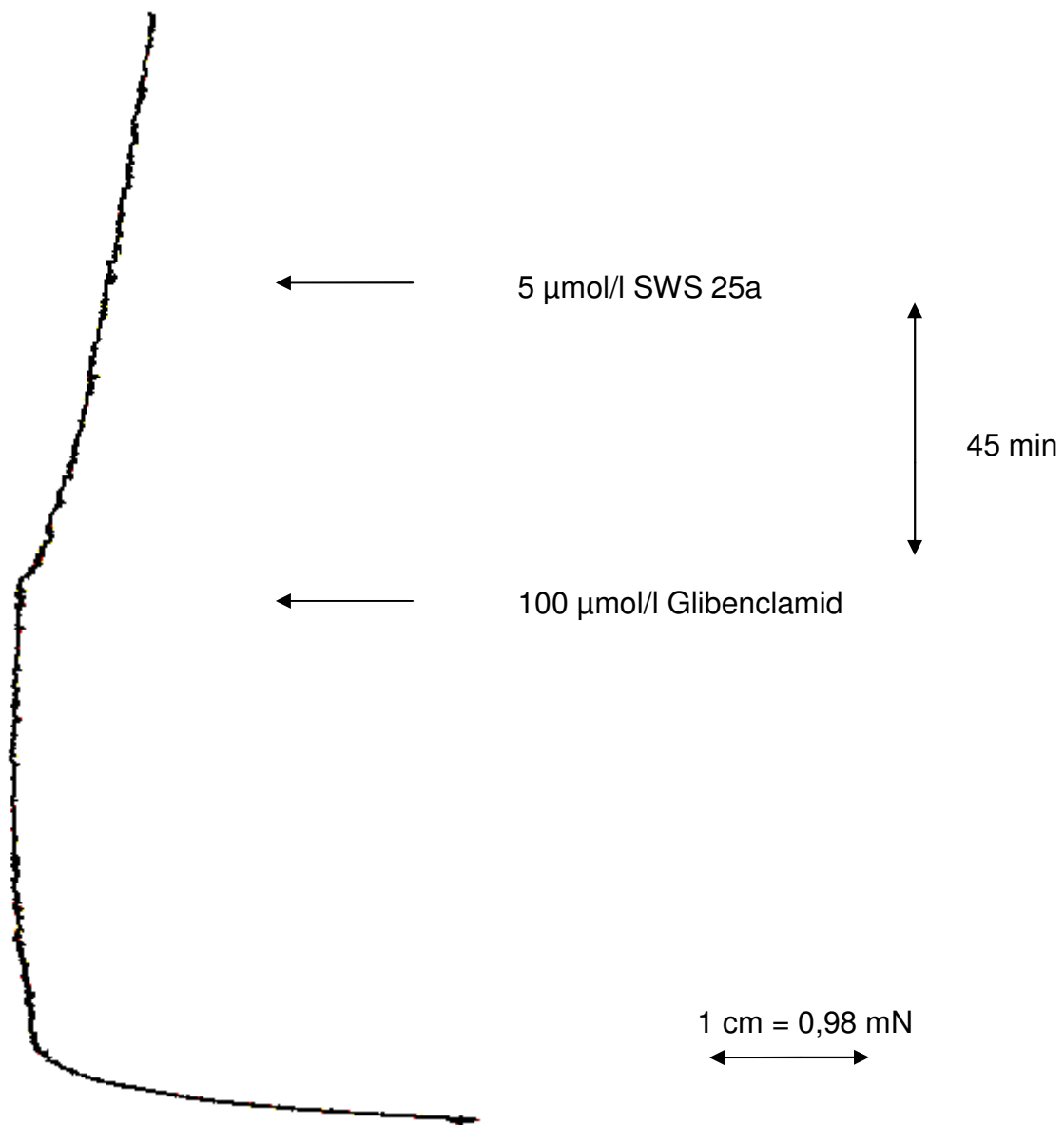


Abbildung 27: Originalaufzeichnungen des Versuchs mit Glibenclamid an der Aorta



Legende zu den Abbildungen 26 und 27:

Die Abbildungen der beiden Versuche zeigen wie sich die jeweiligen Substanzzugaben auf die Kontraktion der Aorta auswirkten.

4.3.3 Effekt von SWS 25a in Kombination mit Phenylephrin auf die Aorta

Als letzte Möglichkeit wurde eine Wirkung von SWS 25a über eine Blockade von α -Rezeptoren ausgetestet. Dafür wurde mit dem α -Sympathomimetikum Phenylephrin (PHE) gearbeitet. Zuerst wurde eine Verdünnungsreihe mit 0,1, 0,3, 1, 3, 10 $\mu\text{mol/l}$ hergestellt und mit diesen zuerst Blindwerte ohne SWS 25a und danach Messwerte in Kombination erfasst. Siehe dazu auch Kapitel 3.6.2.2 und 3.7.3.

Unter Einfluss von 5 $\mu\text{mol/l}$ SWS 25a wurde Wirkung von 10 $\mu\text{mol/l}$ PHE um 1,05 mN abgeschwächt, dies entspricht etwa -12 Prozent, bei der niedrigsten Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ Phenylephrin änderte sich das Ergebnis um 0,08 mN auf -45 Prozent. Der Durchschnitt des Versuchs lag bei etwa -33 Prozent Verlust an Kontraktionskraft von PHE.

Ein gewisser Einfluss auf α -Rezeptoren scheint demnach gegeben.

Tabellen 17a und 17b:

Phenylephrin HCl ($\mu\text{mol/l}$) Kontrolle	$f_c \pm \text{SEM}$	Anzahl der Versuche n
0,1	$0,18 \pm 0,04$	3
0,3	$0,79 \pm 0,30$	3
1	$3,64 \pm 1,17$	3
3	$7,70 \pm 2,19$	3
10	$8,97 \pm 1,97$	3

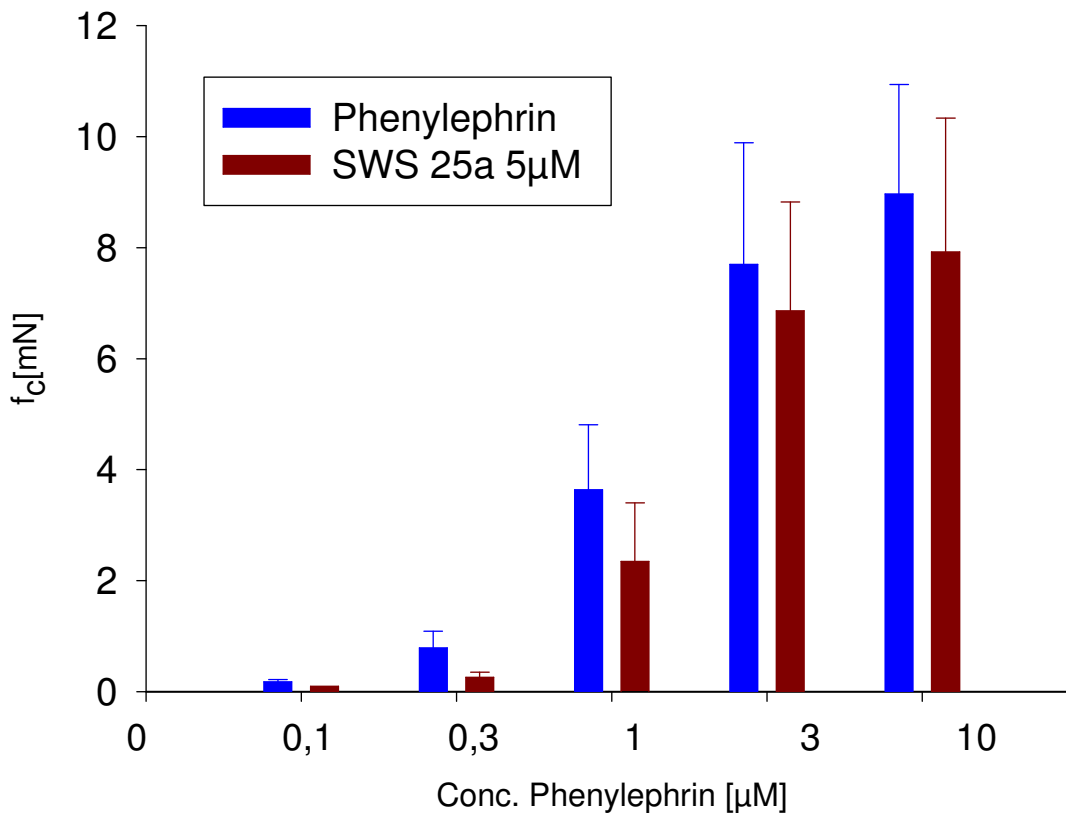
SWS 25a (5 $\mu\text{mol/l}$) + Phenylephrin	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahr- scheinlichkeit (P)
0,1	$0,10 \pm 0,04$	3	n.s
0,3	$0,26 \pm 0,09$	3	0,05
1	$2,35 \pm 1,05$	3	n.s
3	$6,86 \pm 1,96$	3	n.s
10	$7,92 \pm 2,41$	3	n.s

Legende zu Tabellen 17a und 17b:

Tabellarische Darstellung der Änderung der Kontraktionskraft f_c in mN während den Versuchen.

Diagramm 14: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse

AORTA Phenylephrin
SWS 25a 5 μ M
n = 3

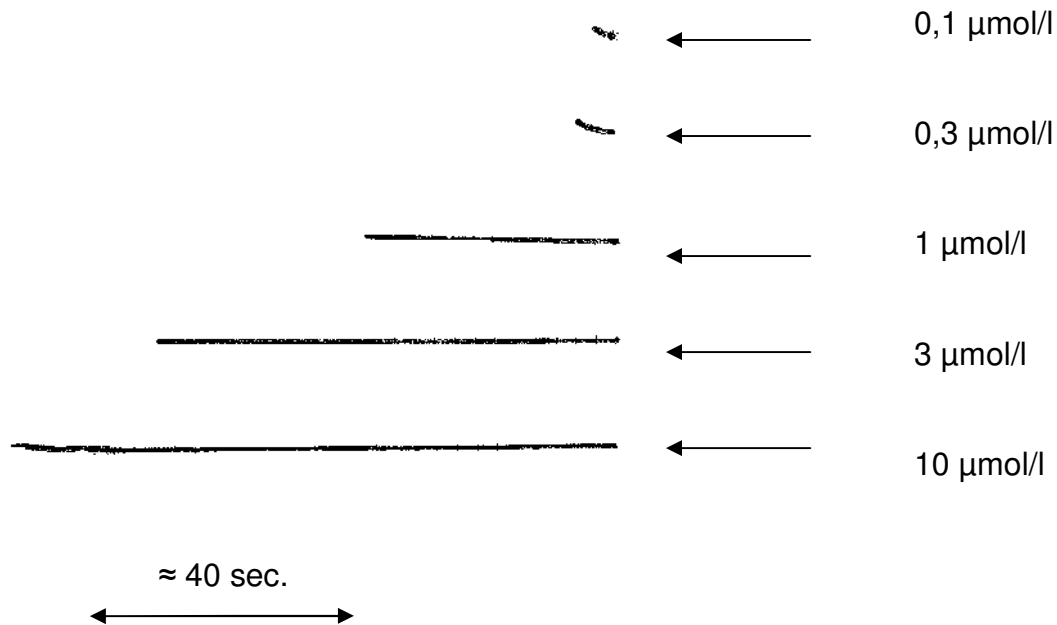


Legende zu Diagramm 14:

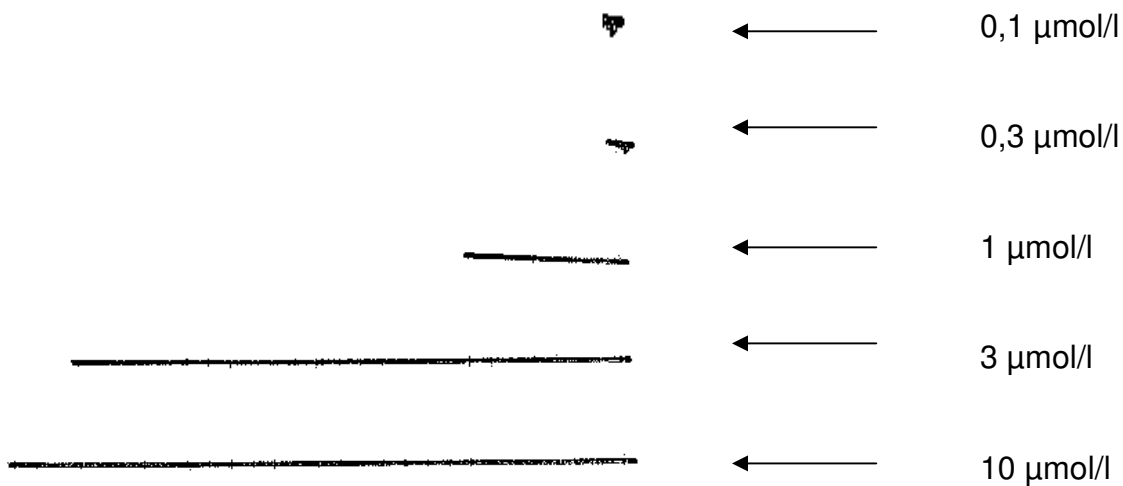
Dieses Balkendiagramm zeigt die Ergebnisse übersichtlich dargestellt. Auf der Abszisse ist die Konzentration von Phenylephrin dargestellt, auf der Ordinate die Kontraktionskraft. Die Konzentration von SWS 25a betrug immer den EC_{50} Wert von 5 μ mol/l. Es ist deutlich zu sehen, dass durch alle Stufen eine leichte α -blockierende Wirkung vorliegt. Die x-Achse beschreibt die Phenylephrinkonzentrationen in μ mol/l, die y-Achse die Kontraktion in mN.

Abbildung 28: Originalaufzeichnung des Versuchs mit Phenylephrin an der Aorta

Kontrollmessungen:



Messungen in Kombination mit SWS 25a:



Legende zu Abbildung 28:

Die Striche zeigen die Kontraktionsänderung unter den verschiedenen Versuchen. Zuerst wurde nur mit Phenylephrin gemessen, dann in Kombination mit SWS 25a.

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Diplomarbeit wurde die Wirkung zweier neu synthetisierter, H₂S freisetzender Substanzen, SWS 25 a und WHG 58T auf isolierte Organe von Meerschweinchen getestet.

Die erhaltenen Versuchsergebnisse sowie deren Auswertung wurden im Kapitel 4 ausführlich aufgelistet und beschrieben. In diesem Kapitel soll nun die Bewertung folgen. Da die Wirkung auf glattmuskuläre Präparate einerseits und auf Herzmuskelpräparate andererseits untersucht wurde, können in dieser Hinsicht die Daten vergleichend gegenübergestellt werden.

Zunächst wird auf die Wirkung von SWS 25a genauer eingegangen.

Die Wirkung auf die glatte Muskulatur der getesteten Organe kann durchwegs als signifikant bezeichnet werden, in allen Fällen konnte ein EC₅₀ Wert von unter 10 µmol/l erreicht werden.

Folgende Tabelle stellt die Daten übersichtlich dar

Tabelle 18: EC₅₀ Werte der Präparate mit glatter Muskulatur

Organpräparat	EC ₅₀ (µmol/l)
Aorta	4,7
Arteria pulmonalis	9,1
Terminales Ileum	6

Wie ersichtlich war die Wirkung auf die Aorta am Effektivsten. An diesem Organ war nicht nur der EC₅₀ Wert am Niedrigsten, zusätzlich kam es schon bei Erreichen einer Badkonzentration von 3 µmol/l zu einer Abnahme der Kontraktion von $34,92 \pm 7,07$ Prozent und bereits bei 30 µmol/l trat eine vollständige Vasodilatation ein. Durch zeichnerische Auswertung der Konzentrations-Wirkungskurve konnte ein EC₅₀ Wert von 4,7 µmol/l errechnet werden. An der steilen Abnahme der Konzentrations-Wirkungskurve, diese ist in Kapitel 4.1.3 abgebildet, ist dies deutlich zu erkennen.

Dieses Ergebnis legte eine Untersuchung der zugrunde liegenden Wirkungsmechanismus nahe. Dies wurde durch Untersuchungen mit den

Antagonisten Glibenclamid bzw. Nitro-L-Arginin und dem Agonisten Phenylephrin realisiert.

Zunächst wurde ein Zusammenspiel mit dem NO-System in Betracht bezogen. Dazu wurde mit Nitro-L-Arginin, einem Inhibitor der Stickstoffmonoxid Oxidase gearbeitet (Bansinath et al.1993). Nach Hemmung der NO-Synthase wurde nun betrachtet ob die Testsubstanz trotzdem noch Einfluss nehmen konnte. Die Ergebnisse zeigten, dass die Wirkung von SWS 25a in Verbindung mit Nitro-L-Arginin deutlich vermindert war. Die Abnahme vom Ausgangswert von $6,63 \pm 1,33$ betrug lediglich $0,74$ mN. Ein signifikanter Zusammenhang mit dem NO-System scheint somit gegeben.

Die nächsten Versuchsreihen betrachteten ob die Wirkung über die Öffnung von Kaliumkanälen zustande kommen könnte. Dazu wurde mit dem Kaliumkanalblocker Glibenclamid, ein Sulfonylharnstoffderivat, in zwei verschiedenen Konzentrationen (30 und $100 \mu\text{mol/l}$) getestet.

Die Wirkung von SWS 25a war durch den Einfluss von Glibenclamid deutlich vermindert, ein Indiz für die Beteiligung der Kaliumkanäle am Wirkmechanismus.

Abschließend wurde mit Phenylephrin auf eine mögliche Mitwirkung von α -Rezeptoren untersucht. Die Ergebnisse zeigten dass unter dem Einfluss der EC_{50} Konzentration der Testsubstanz die Wirkung des Sympathomimetikums abgeschwächt wurde. Bei der höchsten Konzentration lag der Wert bei -12 Prozent.

Zusammenfassend kann man zu dem Schluss kommen, dass die Wirkung von SWS 25a hauptsächlich im Zusammenhang mit dem NO-System und der Öffnung von Kaliumkanälen steht. Ein Einfluss auf α -Rezeptoren muss auch in Betracht gezogen werden.

Der zweitstärkste Effekt konnte am terminalen Ileum nachgewiesen werden. Es kam bald nach Substanzzugabe zu einer starken Abnahme der Kontraktion, bei 3 und $10 \mu\text{mol/l}$ ergaben sich Werte von $-30,25 \pm 3,54$ und $-64,18 \pm 3,75$ Prozent ausgehend vom Kontrollwert. Somit konnte die EC_{50} mit $6 \mu\text{mol/l}$ errechnet werden.

Die Versuche an der Arteria pulmonalis lieferten ebenfalls statistisch höchst signifikante Ergebnisse. Die Vasodilatation verlief zwar geringfügig langsamer und

bei der Organbadendkonzentration kam es zu keiner vollständigen Relaxierung der Organe, es konnte jedoch auch ein erfreulicher niedriger EC_{50} Wert von $9,1 \mu\text{mol/l}$ festgestellt werden.

Der Effekt auf die Herzmuskulatur ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 19: Wirkung auf Herzmuskelpräparate

Organpräparat	SWS 25a Kontraktionskraft f_c (%) $\pm$ SEM bei $100 \mu\text{mol/l}$
Rechter Vorhof	$-47,19 \pm 16,86$
Papillarmuskel	$3,08 \pm 7,73$

Verglichen mit den Resultaten an der glatten Muskulatur, mussten hier deutlich geringere Effekte festgestellt werden. Am Vorhof wurde ein EC_{50} Wert nur knapp nicht erreicht, die Auswirkungen auf den Papillarmuskel waren verschwindend gering.

Die Schlagfrequenz des Vorhofs wurde erst bei ab $30 \mu\text{mol/l}$ deutlich beeinflusst, $-17,67 \pm 3,0$, die Endkonzentration lieferte Werte von $-47,19 \pm 16,86$ Prozent. Allerdings wirkte sich die Substanz in der höchsten Konzentration in einigen Fällen stark negativ chronotrop, so dass sich die Auswertung aufgrund der kleinen Amplituden sehr schwer gestaltete. In 2 Fällen setzte der Vorhof seine autonome Aktivität sogar vollständig aus.

Der Einfluss auf die Inotropie der Papillarmuskeln war ohne Aussagekraft. Während bei den beiden niedrigsten Konzentration eine schwache bis keine negativ inotrope Wirkung festzustellen war, nahm die Schlagkraft ab $10 \mu\text{mol/l}$ zu und erreichte am Ende einen Wert von $+3,08 \pm 7,73$ Prozent verglichen mit dem Ausgangswert ($=0 \%$). Aufgrund dieser Ergebnisse konnte eine Wirkung ausgeschlossen und somit natürlich auch ein EC_{50} Wert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass SWS 25a entscheidend auf alle Präparate mit glatter Muskulatur wirkt, im Gegensatz zu den Herzmuskelpräparaten.

Nun werden die Ergebnisse der Untersuchung der Testsubstanz WHG 58T detaillierter eingegangen.

Tabelle 20: Wirkung auf Präparate mit glatter Muskulatur

Organpräparat	EC ₅₀ (µmol/l)
Aorta	> 100 µmol/l
Arteria pulmonalis	> 100 µmol/l
Terminales Ileum	> 100 µmol/l

Wie hier sogleich ersichtlich wird konnte an keinem der glattmuskulären Präparate ein EC₅₀ Wert ermittelt werden bzw. lagen über 100 µmol/l.

Der Versuch an der Aorta zeigte bei den Konzentrationen bis 10 µmol/l so gut wie keinen Einfluss, erst ab etwa 30 µmol/l betrug die Relaxation $-9,2 \pm 4,21$ Prozent. Am Ende des Versuchs wurde eine Kontraktionsabnahme von $-17,05 \pm 5,13$ Prozent bezogen auf den Kontrollwert festgestellt.

Ganz ähnlich stellte sich die Konzentration am terminalen Ileum dar. Ab der ersten Konzentrationsstufe kam es zu einer schwachen, gleich bleibenden Abnahme der Kontraktilität. Bei 100 µmol/l wurde die maximale Entspannung mit $-17,30 \pm 7,25$ Prozent des Kontrollwertes erreicht. Die in Kapitel 4.2.5 dargestellte Konzentrations-Wirkungskurve verdeutlicht dies sehr schön. Auch hier konnte folglich kein EC₅₀ Wert ermittelt werden.

Den schwächsten aller Effekte wies WHG 58T an der Arteria pulmonalis auf. Es konnte zwar vom Beginn bis zum Ende des Versuches eine wachsende Entspannung des Präparates festgestellt werden, die jedoch bei der Endkonzentration in lediglich $-13,33 \pm 4,32$ Prozent gipfelte.

Nachfolgend ist die Wirkung auf die Herzmuskelpräparate angeführt.

Tabelle 21:Wirkung auf Herzmuskelpräparate

Organpräparat	WHG 58T Kontraktionskraft f_c (%) ± SEM bei 100 µmol/l
Rechter Vorhof	0,88 ± 0,91
Papillarmuskel	-15,14 ± 7,92

In vorangehender Tabelle wird auf einen Blick der fehlende Effekt der Testsubstanz auf die isolierten Herzmuskelpräparate ersichtlich.

Die Substanz WHG 58T wies keinen Effekt auf den rechten Vorhof auf. Bei der Testendkonzentration von 100 µmol/l blieb die Schlagfrequenz bis auf eine vernachlässigbare Zunahme stetig konstant

Am Papillarmuskel konnte zwar am Ende der Versuche eine gemittelte Abnahme um 15,14 ± 7,92 Prozent vom Ausgangswert erreicht werden, für weitere Untersuchungen ist solch ein Wert jedoch, sowie für alle Präparate wenn keine EC₅₀ erreicht werden kann, nicht signifikant genug.

Zusammenfassend ist über WHG 58T zu sagen, dass es kein Organ entscheidend beeinflussen konnte, die stärkste Wirkung prozentual gesehen ergab sich auf Aorta und das terminale Ileum.

Die sehr wahrscheinliche Beteiligung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen an der vaskulären Regulation des Blutdrucks wurde in mehreren Studien beleuchtet.

Es zeigte sich, dass H₂S in Konzentrationen von 18 bzw. 60 µM, mit 20µM KCl bzw. Phenylephrin kontrahierte Rattenaortenringe dilatierte (Zhao et al.2001).

Tests mit unterschiedlichen Blockern von calciumsensitiven Kaliumkanälen zeigten keine Auswirkung auf die Vasokonstriktion. In einem weiteren Versuch zeigte sich

jedoch dass der hypotensive Effekt von H_2S durch den K_{ATP} -Kanalblocker Glibenclamid antagonisiert wurde und vom K_{ATP} Kanalöffner Pinacidil imitiert wurde (Zhao et al. 2001). Dieselbe Arbeitsgruppe untersuchte auch die physiologischen Spiegel von Schwefelwasserstoff im Plasma und kam zum Ergebnis dass dieser bei Ratten etwa $50 \mu\text{M}$ betrug. Die physiologische Konzentration in Geweben ist deutlich höher. Im Gehirngewebe wurde eine Konzentration von $50\text{-}160 \mu\text{M}$ nachgewiesen (Hosoki et al. 1997).

Zusammenfassend kam man zum Schluss das Schwefelwasserstoff innerhalb von physiologisch relevanten Konzentrationen eine Vasodilatation hervorruft und so neben NO und CO einen weiteren intrinsischen, gasförmigen vasoaktiven Mediator darstellt (Zhao et al. 2001).

Zhao et al. postulierten jedoch auch das H_2S , im Gegensatz zu NO und CO, nicht nur an der vaskulären glatten Muskulatur wirkt, sondern auch einen geringen Endothel abhängigen Effekt aufweist. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Aktivierung des cGMP Pfades für NO und CO Freisetzung essentiell ist, während H_2S hauptsächlich via Öffnung K_{ATP} Kanälen an den Gefäßmuskeln wirkt aber auch durch eine Veränderung der Kaliumleitfähigkeit im Endothel.

Dies wurde durch Versuche untermauert bei denen Aortenringe jeweils einmal mit 20 mmol KCl und 100 mmol KCl kontrahiert wurden. Bei der geringeren Konzentration kam es zu einer Relaxation von $90 \pm 8,2$ Prozent, während es bei der Höheren nur zu $19 \pm 3,9$ Prozent kam. Dieser Unterschied in der Relaxation zeigt wie hoch die mögliche zusätzliche Wirkung über eine Veränderung in der Kaliumleitfähigkeit der Zellen sein könnte (Zhao et al. 2001).

Legt man diese Daten auf die Versuchsreihe von SWS 25a an der Aorta um muss man davon ausgehen, dass die Wirkung nicht nur über Beeinflussung K_{ATP} Kanäle läuft. Denn in den Versuchen wurde die Aorta mit 90 mmol KCl vorkontrahiert und es wurde im Endeffekt eine Relaxation von 100 Prozent erreicht. Also müssen noch andere Faktoren an der Wirkung beteiligt sein.

Diese These wird auch in einer Studie bestätigt (Elsey et al. 2010).

In einer interessanten Studie von 2008 konnte jedoch auch aufgezeigt werden, dass der ATP-Kaliumkanalblocker Glibenclamid nicht in der Lage war die Wirkung von H_2S signifikant zu mindern, was eine Beteiligung dieser Kanäle relativierte. Vielmehr wurde eine Beeinflussung des Adenylatcyclase/cAMP Weg postuliert. Es wurde ein vasokonstriktorischer Effekt von NaHS an mit Phenylephrin vorkontrahierten und danach mit β -Agonisten relaxierten Rattenaorten festgestellt. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin dass H_2S eventuell die β -adrenerge Funktion in Blutgefäßen beeinflusst. Dies könnte mit dem Adenylatcyclase/cAMP-Pfad zusammenhängen der durch die Aktivierung von β -Rezeptoren stimuliert wird. Dies wurde durch Versuche mit dem Adenylatcyclase-Stimulator Forskolin, einem Diterpen, untermauert. Die präzise Aufklärung des Wirkmechanismus und ihre Zusammenhänge bezüglich Vasorelaxation und Dilatation bedürfen jedoch noch weiterer Untersuchungen (Lim et al. 2008).

Abschließend kann festgestellt werden, dass die untersuchte Substanz SWS 25a im Gegensatz zu WHG 58T stark vasodilatorisch und spasmolytisch wirkt.

Diese Wirkungen beruhen vermutlich auf einer Freisetzung von H_2S , während hingegen WHG 58T keine oder nur geringe H_2S freisetzende Eigenschaften besitzen dürfte.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Vorliegende Diplomarbeit behandelt die Prüfung zweier schwefelwasserstofffreisetzender Substanzen, SWS 25a und WHG 58T, auf deren Einfluss auf isolierte Organe von Meerschweinchen. Ziel war es einen EC_{50} zu erreichen. Dieser stellt die mittlere effektive Konzentration des Wirkstoffes in mmol/l dar, bei der die Hälfte des Kontrollwertes erreicht wird

Es wurden die Effekte sowohl auf glatte Muskulatur anhand von Aorta, Arteria pulmonalis und terminalen Ileum vermessen, als auch auf quergestreifte Muskulatur anhand von Präparaten von Vorhof und Papillarmuskeln. Mittels isometrischen Kontraktionsmessungen wurden die dilatierenden, spasmolytischen, inotropen und chronotropen Wirkungen untersucht.

Dazu wurden die Organe jeden Tag frisch präpariert und in Organbädern die mit physiologischer Nährstofflösung gefüllt waren vermessen. Die Substanzen wurden in Dimethylsulfoxid gelöst und in fünf verschiedenen Konzentrationen, welche durch kumulative Zugabe erreicht wurden, vermessen. Die sich fallweise ergebenden Zustandsänderungen wurden über einen Kraftwandler und Verstärker auf einen Flachbettschreiber übertragen, der dann entsprechende Kurven aufzeichnete.

Der Wirkstoff SWS 25a erzielte vor allem an der glatten Muskulatur hochsignifikante Effekte, am Stärksten war dieser an der Aorta ausgeprägt. Es konnte ein EC_{50} von $4,7 \mu\text{mol/l}$ erreicht werden. An der Arteria pulmonalis betrug dieser $9,1 \mu\text{mol/l}$, am terminalen Ileum $6 \mu\text{mol/l}$. Am Atrium dexter und am Musculus papillaris konnten keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden.

Das Screening des Wirkstoffes WHG 58T brachte bei allen Organen keine signifikanten Resultate, die Wirkungen waren zu wenig ausgeprägt. Der stärkste Effekt wurde noch an der Aorta gemessen, er betrug jedoch lediglich – 17,30 Prozent vom Kontrollwert.

Da SWS 25a an der Aorta hochpotente Wirkung zeigte, wurden an diesem Organ auch Versuche hinsichtlich der zugrundeliegenden Wirkmechanismen durchgeführt.

Als Ergebnis konnte eine Beteiligung des NO-Systems sowie von K_{ATP} -Kanälen festgestellt werden. Auch ein gewisser Einfluss auf die sympathische Regulation der Gefäße hinsichtlich Blockade von α -Rezeptoren könnte gegeben sein.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Bansinath M, Arbabha B; Turndorf H; Garg U C (1993) Chronic administration of a nitric oxide synthase inhibitor, N omega-nitro-L-arginine, and drug-induced increase in cerebellar cyclic GMP in vivo. *Neurochem Res* 18:1063–1066.

Cooper DW, Mowbray P (2004) Advantages of using a prophylactic phenylephrine infusion during spinal anaesthesia for caesarean section. *Int J Obst Anest* 13:124–125.

Elsej DJ, Fowkes RC, Baxter GF (2010) Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide (H₂S). *Cell Biochem Funct* 28:95–106.

Estler CJ, Schmidt H (2007) *Pharmakologie und Toxikologie: Für Studium und Praxis*. 6. Auflage, F.K. Verlag GmbH

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 tissue by suprathreshold stimulation. *Science* 129:328-329.

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

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

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

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

Lim JJ, Liu YH, Khin ESW, Bian JS (2008) Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 295:C1261-C1270.

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

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Kortnig M (2008) Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 9. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Muzaffar S, Jeremy JY, Sparatore A, Del Soldato P, Angelini GD, Shukla N (2008) H₂S-donating sildenafil (ACS6) inhibits superoxide formation and gp91phox expression in arterial endothelial cells: role of protein kinases A and G. *Br J Pharmacol* 155:984-994.

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

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

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

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

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

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

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

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

Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder SH, Wang R (2008) H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science* 322:587-590.

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

8. LEBENSLAUF

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 21. März 1984
Geburtsort: Wiener Neustadt
Familienstand: ledig
Staatsbürgerschaft: Österreich
Religionsbekenntnis: Römisch-katholisch

Schulbildung:

1990-1994 Volksschule in Wöllersdorf
1994-1997 Hauptschule in Berndorf
1997-1998 Hauptschule in Pernitz
1998-2003 Handelsakademie Wiener Neustadt
Matura im Mai 2003 mit gutem Erfolg
ab Oktober 2004 Studium der Pharmazie in Wien

Bisherige Arbeitsstellen:

Ferialpraxis „Bahnhof Apotheke“ in 2700 Wiener Neustadt, Juli 2009
Ferialpraxis Apotheke „Zur Madonna“ in 2620 Neunkirchen, September 2009
Tutor für Erste Hilfe am Department für Pharmakologie und Toxikologie 2005-2010

Fähigkeiten und Kenntnisse:

Fremdsprachen: Englisch und Französisch in Wort und Schrift

PC-Kenntnisse: Microsoft Word, Excel, Outlook, Project
Power Point, Access, ECDL-Führerschein 2003