



universität
wien

DIPLOMARBEIT

**BIOLOGISCHE AKTIVITÄT ZWEIER NEU SYNTHETISIERTER WIRKSTOFFE
(SWS 4 HCI und WHG 72 T)
AUF ISOLIERTE ORGANE VON MEERSCHWEINCHEN**

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:	Nicole Chvatlinsky
Matrikelnummer:	0401052
Studienrichtung:	Pharmazie
Betreuer:	Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik

Wien, im Oktober 2009

*Das schönste Glück des denkenden Menschen ist,
das Erforschliche erforscht zu haben und das Unerforschliche zu verehren.*

Johann Wolfgang von Goethe

DANKSAGUNG

Ein ganz besonders großes Dankeschön ist Herrn Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik zuzuschreiben. Durch seine hervorragende und vor allem außerordentlich freundliche Betreuung und Unterstützung war es mir möglich meine Arbeit ohne größere Probleme durchzuführen und zu beenden.

Weiters möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Ao. Univ.-Prof. Dr. Thomas Erker, bei Herrn Mag. pharm. Walter Granig und bei Frau Dr. Gerda Brunhofer für die Bereitstellung der beiden Testsubstanzen bedanken.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei meinen Kollegen und Kolleginnen für die fachkundige Einführung und die ersten Hilfestellungen beim Beginn meiner praktischen Arbeit.

Ein persönliches Anliegen ist es mir mich bei meiner ganzen Familie zu bedanken. Sie boten mir während meiner gesamten Studienzzeit immer eine liebevolle Unterstützung und standen mir in schwierigen Zeiten stets mit motivierenden Worten zur Seite.

Zum Schluss möchte ich noch ein großes Danke meinem Freund widmen, der mich während meines Studiums immer liebevoll unterstützt hat und immer viel Verständnis für mich aufbrachte, vor allem in den harten und zeitintensiven Prüfungsvorbereitungen.

DANKE

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. ZIELSETZUNG	6
3. MATERIAL UND METHODIK	7
3.1. Testsubstanzen	7
3.1.1. SWS 4 HCl	7
3.1.2. WHG 72 T	8
3.2. Versuchstiere	10
3.3. Physiologische Elektrolytlösung	10
3.4. Entnahme und Präparation der Organe	12
3.4.1. Organentnahme	12
3.4.2. Organpräparation	12
3.5. Versuchsanordnung und Apparaturen	19
3.5.1. Apparatur I	20
3.5.2. Apparatur II	22
3.5.3. Der Kraftwandler	24
3.5.4. Die Gasversorgung	24
3.5.5. Das Wasserbad	25
3.6. Die Versuchsabläufe	26
3.6.1. Wirkstärke der Substanzen bei isolierten Meerschweinchenorganen	26
3.6.2. Wirkung der Substanz SWS 4 HCl in Kombination mit Agonisten an der Aorta	30
3.7. Verwendete Agonisten	32
3.7.1. Glibenclamid	32
3.7.2. Nitro-L-Arginin	33
3.7.3. Phenylephrin	34
3.8. Auswertung und Statistik	35
3.8.1. Atrium dexter	35
3.8.2. Musculus papillaris	35
3.8.3. Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum	35
3.8.4. Statistik	36

4. ERGEBNISSE	37
4.1. Ergebnisse der Testsubstanz SWS 4 HCl	37
4.1.1. Wirkung von SWS 4 HCl auf den Vorhof	37
4.1.2. Wirkung von SWS 4 HCl auf den isolierten Papillarmuskel	40
4.1.3. Wirkung von SWS 4 HCl auf die Aorta	43
4.1.4. Wirkung von SWS 4 HCl auf die Arteria pulmonalis	46
4.1.5. Wirkung von SWS 4 HCl auf den Darm	49
4.2. Ergebnisse der Testsubstanz WHG 72 T	52
4.2.1. Wirkung von WHG 72 T auf den Vorhof	52
4.2.2. Wirkung von WHG 72 T auf den Papillarmuskel	55
4.2.3. Wirkung von WHG 72 T auf die Aorta	58
4.2.4. Wirkung von WHG 72 T auf die Arteria pulmonalis	61
4.2.5. Wirkung von WHG 72 T auf den Darm	64
4.3. Untersuchung des Wirkungsmechanismus von SWS 4 HCl auf die Aorta	67
4.3.1. Wirkung von SWS 4 HCl in Kombination mit Nitro-L-Arginin auf die Aorta	67
4.3.2. Wirkung von SWS 4 HCl in Kombination mit Glibenclamid auf die Aorta	71
4.3.3. Wirkung von SWS 4 HCl in Kombination mit Phenylephrin auf die Aorta	76
5. DISKUSSION	80
6. ZUSAMMENFASSUNG	88
7. LITERATURVERZEICHNIS	89
8. CURRICULUM VITAE	92

1. EINLEITUNG

Schwefelwasserstoff (H_2S) wurde lange Zeit ausschließlich als stechendes toxisches Gas angesehen, das nach verfaulten Eiern riecht. (Winder and Winder, 1933; Smith and Gosselin, 1979) Laut der Deutschen Forschungsgemeinschaft, kurz DFG, hat H_2S einen MAK-Wert von 14 mg/m^3 . Der MAK-Wert ist definiert als die höchstzulässige Konzentration eines Arbeitsstoffes als Gas, Dampf oder Schwebstoff in der Luft am Arbeitsplatz, die nach gegenwärtigem Kenntnisstand auch bei wiederholter, täglich 8-stündiger, wöchentlich bis zu 40-stündiger Arbeitszeit im Allgemeinen ohne gesundheitliche Beeinträchtigung und ohne unangenehme Belästigung ertragen wird. (Mutschler et al. 2001)

In niedrigen Konzentrationen ist Schwefelwasserstoff durch seinen charakteristischen Geruch erkennbar, wohingegen er in höheren Konzentrationen leicht süßlich riecht und aufgrund der raschen Lähmung des Geruchssinns nicht mehr wahrgenommen werden kann. Der genaue Wirkungsmechanismus einer H_2S -Vergiftung ist noch nicht geklärt. Die Lähmung wird durch eine Blockade der eisenhaltigen Atmungsenzyme durch Schwefelwasserstoff und durch aus diesem im Körper gebildeten Hydrogensulfid-Ion verursacht. Darüber hinaus ist anzunehmen, dass Schwefelwasserstoff eine Störung des Zellstoffwechsels mit konsekutiver Hypoxie bewirkt. Bei einer langsamen Vergiftung kommt es generell meist zur Reizung der Augen und Atemwege, zu Übelkeit, Erbrechen, Atemnot und Krämpfen. (Mutschler et al. 2001)

Als Behandlung wird primär eine künstliche Beatmung eingesetzt und in weiterer Folge erfolgt die Therapie symptomatisch. Neuerdings wird auch Dimethylaminophenol (Handelsname: 4-DMAP) als Antidot herangezogen.

Trotz der erfolgreichen Therapie können Schäden des Myokards und des Zentralnervensystems zurückbleiben. (Mutschler et al. 2001)

Mittlerweile ist allerdings auch bekannt, dass H₂S ebenfalls ein biologisches Gas ist, welches endogen durch den Cysteinemetabolismus produziert wird. Im Körper wird es hauptsächlich durch zwei Enzyme, Cystathionin-γ-Lyase (CSE) und Cystathionin-β-Synthase (CBS), gebildet. (Stipanuk and Beck 1982, Griffith 1987, Erickson et al. 1990, Swaroop et al. 1992, Hosoki et al. 1997)

Cystathionin-γ-Lyase (CSE) wurde in der Leber, der Niere und auch in geringen Konzentrationen im Gehirn nachgewiesen. Die Cystathionin-β-Synthase (CBS) wurde vor allem im Gehirn gefunden, außerdem ließ sie sich noch in der Leber und der Niere auffinden. (Abe and Kimura 1996)

CSE ist prinzipiell in verschiedenen Gefäßen des vaskulären Systems vorhanden, während CBS im Gehirn stark ausgeprägt ist und in den Blutgefäßen nicht detektierbar ist. (Hosoki et al. 1997, Kimura 2000, Zhao et al. 2001) CBS ist vor allem im Hippokampus und Cerebellum stark expremiert. (Abe and Kimura 1996)

Aufgrund der Ähnlichkeit von Schwefelwasserstoff und anderen endogenen Gasmoleküle, wie Stickstoffmonoxid und Kohlenstoffmonoxid (Wang et al. 1997a,b), kam man zu der Hypothese, dass H₂S eine physiologische Rolle bei der Regulation des kardiovaskulären Systems spielt.

Hosoki et al. (1997) demonstrierten, dass Schwefelwasserstoff in vitro auf die Aorta von Ratten relaxierend wirkt. Weiters fand man heraus, dass H₂S die Vasodilation der Aortaringpräparate von Ratten aufgrund der Aktivierung ATP-abhängigen Kaliumkanäle verursacht wird. (Zhao et al. 2001) Eine aktuellere Studie (Kubo et al. 2007) zeigte, dass der K_{ATP} Kanalblocker Glibenclamid nicht fähig war auf den zusammenziehenden oder relaxierenden Effekt von NaHS bei Aortapräparaten von Mäusen einzugreifen und er nur partiellen Einfluss bei Ratten hatte. Teague et al. 2002 schlugen ebenfalls fehl bei dem Versuch über Glibenclamid die Auswirkung von NaHS zu blockieren. Sie verwendeten bei ihrer Studie nicht vaskuläre Glattmuskelpräparate.

Diese Studien deuten daraufhin, dass die K_{ATP} Kanäle wahrscheinlich nicht die einzigen Wirkungsmechanismen sind, die für die Gefäßdilatation durch Schwefelwasserstoff verantwortlich sind. Vielmehr wurde nun kürzlich gezeigt, dass

H₂S bei der Regulation des intrazellulären pH eine nicht unwesentliche Rolle spielt, wodurch es ebenfalls zu einer Relaxation kommt. (Lee et al. 2007) Weiters fand man unlängst heraus, dass der Effekt von Schwefelwasserstoff auf den Gefäßtonus auch sehr vom Sauerstoff abhängig ist. (Koenitzer et al. 2007)

Der K_{ATP}-Kanal ist ein Heterooctamer einschließlich zweier Untereinheiten. Die eine ist eine porenbildende Einheit, Kir6.x (Kir6.1 oder Kir6.2) und die andere ist eine regulierende Untereinheit, Sulfonylharnstoffrezeptor SUR (SUR1 oder SUR2). (Seino and Miki 2003)

ATP-abhängige Kaliumkanäle werden durch Adenosintriphosphat gesteuert, was bei einem ATP-Anstieg zu einer Schließung der Kanäle führt. (Mutschler et al. 2001) Sie haben verschiedene physiologische und pathophysiologische Bahnen und befinden sich zum Beispiel in den B-Zellen des Pankreas, in glatten Muskelzellen, im Gehirn, im Skelett und in der Leber. (Ashcroft F. 1998, Terzic et al. 1995, Seino and Miki 2003)

H₂S wurde bereits bei vielen entzündlichen, neuralen und kardiovaskulären Krankheiten, wie bei einer akuten Pankreatitis (Bhatia et al. 2005a), beim Down-Syndrom (Kamoun 2001), bei einem septischen Schock (Li et al. 2005) und bei Hypertonie (Yan et al. 2004) angewendet.

Aufgrund der bisherigen Untersuchungen und Forschungsergebnissen könnten Pharmaka, die enzymatisch oder chemisch Schwefelwasserstoff freisetzen, neue Ansätze für Therapiemöglichkeiten darstellen. Vor allem bei der Behandlung der essentiellen Hypertonie wäre dies ein großer Fortschritt.

Als Hypertonie bezeichnet man jede die Norm überschreitende, anhaltende Steigerung des arteriellen Blutdrucks.

Ein normaler Blutdruck liegt bei einem systolischen Wert von < 130 mm Hg und einem diastolischen Wert von < 85 mm Hg vor. (Mutschler et al. 2001)

Infolge des erhöhten Blutdrucks kann es zu einer Arteriosklerose kommen, dessen Folge apoplektische Insulte, koronare Herzkrankheiten, Linksherzhypertrophie sowie Herzinsuffizienz und Niereninsuffizienz sein können.

Nach klinischen und organpathogenetischen Gesichtspunkten unterscheidet man die primäre und die sekundäre Hypertonie. Bei der primären oder auch essentiellen Hypertonie sind die Ursachen noch weitgehend unbekannt, während die sekundäre Hypertonie oft eine Folge pathologischer Organveränderungen ist. Die möglichen auslösenden Faktoren, wie zum Beispiel familiäre Belastung, Bewegungsarmut, häufige Stress-Situationen, Überernährung oder ähnliche, werden noch diskutiert.

Während die endokrine, kardiovaskuläre und neurogene Hypertonie wenigstens teilweise durch eine Behandlung des Primärleidens beeinflusst werden kann, ist bei der häufigsten Hypertonieform, der essentiellen Hypertonie, lediglich eine symptomatische medikamentöse Therapie möglich. (Mutschler et al. 2001)

In mehreren placebokontrollierten Studien wurde nachgewiesen, dass die signifikante Senkung der Sterblichkeit auf die medikamentöse Behandlung zurückzuführen ist. Das Risiko konnte durchschnittlich um 12 – 15 % gesenkt werden. (Collins et al. 1994, Gueyffier et al. 1997)

Prinzipiell sind aber vor beziehungsweise zusätzlich zu der Anwendung von Arzneimitteln bei der Therapie von Bluthochdruck folgende Maßnahmen vorzunehmen:

- Einstellen des Rauchens
- Senkung des Alkoholkonsums auf < 30 g/Tag
- verstärkte körperliche Betätigung und Abbau von Stressfaktoren
- Einschränkung der Kochsalzzufuhr
- Gewichtsreduktion bei Übergewichtigen

Mittel der ersten Wahl sind momentan β -Adrenorezeptorenblocker, ACE-Hemmer, Diuretika und Calciumantagonisten. Die Auswahl des Antihypertonicums sollte der Gesamtsituation des Patienten angepasst werden. (Mutschler et al. 2001)

Bei den β -Blockern kommen hauptsächlich Substanzen aus der Gruppe der β_1 -selektiven Wirkstoffe zum Einsatz. Die β_1 -Rezeptoren sind am Herzen lokalisiert und ihre Hemmung führt zu einer Abnahme der Auswurfleistung des Herzens, wodurch der Blutdruck gesenkt wird. Am Markt befindliche Antihypertonika der Klasse der β -Blocker sind unter anderem Metoprolol, Bisoprolol und Atenolol.

ACE-Hemmer führen zu einer Hemmung des Angiotensin-Konversions-Enzyms, wodurch die Bildung des Angiotensin II, einer der stärksten blutdrucksteigernden Substanzen, unterdrückt wird. Zusätzlich kommt es durch die Abnahme der Angiotensin II Bildung zu einer schwach diuretischen Wirkung. Captopril, Enalapril und Lisinopril sind ein paar der vielen wichtigen Wirksubstanzen.

Diuretika, vor allem vom Thiazid-Typ, bewirken eine vermehrte Flüssigkeitsausscheidung in der Niere, wodurch eine Volumenverminderung im Gefäßsystem verursacht und daraufhin der Blutdruck gesenkt wird.

Calciumkanalantagonisten blockieren den Einstrom von Calciumionen, welche den Kontraktilitätszustand der glatten Gefäßmuskelzellen bestimmen, wodurch eine Vasodilation und damit eine Abnahme des peripheren Widerstands verursacht werden. Dieser Effekt führt zu einer Blutdrucksenkung. Als Antihypertonika fungiert hauptsächlich Nifedipin aus der Gruppe der Calciumantagonisten. (Mutschler et al. 2001)

Abgesehen von diesen Wirkstoffklassen kann eine Blutdrucksenkung auch durch α -Blocker, Kaliumkanalöffner, Vasopeptidase-Hemmer und Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten erzielt werden.

Mittlerweile ist es allgemein anerkannt eine antihypertensive Therapie individuell und nach einem Stufenplan der Deutschen Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdrucks zu gestalten. Aus diesem Grund werden je nach Schweregrad der Erkrankung und nach Erfolg zuerst eine Monotherapie und dann eine Zweierkombination eingesetzt. Bei wiederum nicht ausreichender Wirkung ist eine Dreierkombination indiziert und mit dieser lässt sich in ca. 90-95% der Fälle eine ausreichende Blutdrucksenkung erreichen. (Mutschler et al. 2001)

2. ZIELSETZUNG

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde die Wirkung zweier neu synthetisierter Wirkstoffe, SWS 4 HCl und WHG 72 T (Kapitel 3.1.), auf die isolierten Organe von Meerschweinchen getestet.

Um eine erfolgreiche Durchführung und die Reproduzierbarkeit gewährleisten zu können, musste zu Beginn die exakte Präpariertechnik und die korrekte Handhabung der Apparaturen erlernt werden.

Einerseits wurde die Auswirkung auf die Inotropie und die Chronotropie der Herzmuskelpräparate überprüft, andererseits war das Ziel den Einfluss auf die glatte Muskulatur abzuklären.

Die Wirkung der Substanzen auf die glattmuskulären Organe wurde an isolierten Präparaten der Aorta, der Arteria pulmonalis und des terminalen Ileums durchgeführt.

Der Einfluss dieser chemischen Verbindungen bezüglich der Herzmuskelpräparate, wozu der isolierte Vorhof und der isolierte Papillarmuskel herangezogen wurden, wurde ebenfalls betrachtet.

Bei dem Erreichen einer mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}), das heißt wenn eine Substanz bei einer Konzentration von unter $30 \mu\text{mol/l}$ einen halbmaximalen Effekt auf das Organ erreichen konnte, wurden Versuche mit Agonisten durchgeführt, die einen näheren Einblick in den Wirkungsmechanismus geben sollten.

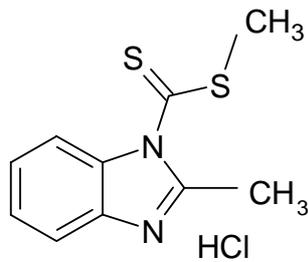
3. MATERIAL UND METHODIK

3.1. Testsubstanzen

Die beiden zu testenden Wirkstoffe stammten vom Department für Medizinische Chemie und Pharmazeutische Chemie, wo sie neu synthetisiert und von Hr. Univ.-Prof. Dr. Thomas Erker zur Verfügung gestellt wurden.

3.1.1. SWS 4 HCl

Abbildung 1: Struktur von SWS 4 HCl

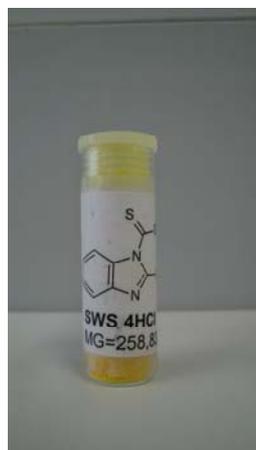


MG = 258,83 g/mol

Nomenklatur:

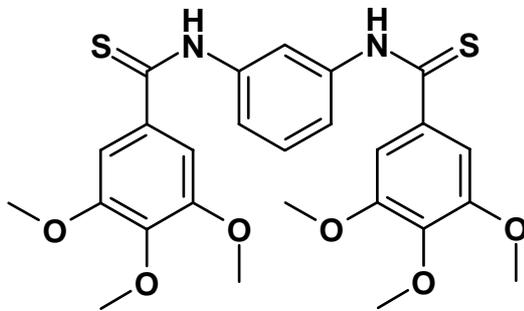
1-(Methyldithiocarbonyl)-2-methylbenzimidazol Hydrochlorid

Abbildung 2: Originalabbildung der Testsubstanz SWS 4 HCl



3.1.2. WHG 72 T

Abbildung 3: Struktur von WHG 72 T

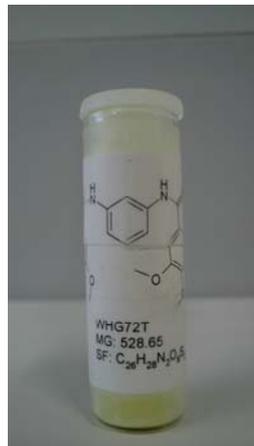


MG = 528,65 g/mol

Nomenklatur:

N1-{3-[(3,4,5-trimethoxybenzothioyl)amino]phenyl}-3,4,5-trimethoxybenzothioamid

Abbildung 4: Originalabbildung der Testsubstanz WHG 72 T



Die Stammlösungen der beiden Substanzen wurden täglich frisch zubereitet, indem die Substanz in 100 µl Lösungsmittel gelöst wurde. Als Lösungsmittel wurde bei den betreffenden Wirkstoffen Dimethylsulfoxid oder auch kurz DMSO genannt verwendet. Die Einwaage der Substanz richtete sich nach dem Volumen des verwendeten Organbades. Es standen ein 8 ml und mehrere 25 ml Organbäder zur Verfügung. Die

Substanzmenge musste so berechnet werden, dass nach kumulativer Zugabe am Ende eine Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ im Gefäß vorherrschte.

Tabelle 1: Stammlösungen

Substanz	Molare Masse	Volumen Organbad in ml	Einwaage der Testsubstanz (100 $\mu\text{mol/l}$)/Organbad
SWS 4 HCl	258,83 g/l	8	0,207 mg
		25	0,647 mg
WHG 72 T	528,65 g/l	8	0,423 mg
		25	1,322 mg

Die Substanzzugabe erfolgte bei den Versuchsreihen immer nach folgendem gleich bleibenden Prinzip. Nachdem das jeweilige Organ eine konstante Kontrollphase aufwies, konnte die erste Substanzmenge, nämlich 1 μl , an Stammlösung mit einer Finnmikropipette zugespritzt werden. Die darauf folgenden Mengen wurden in 45 Minuten Intervallen zugefügt und zwar 2, 7, 10, 20 und 70 μl . Somit erreichte man im Organbad die erwünschte Konzentration von 1, 3, 10, 30 und 100 mmol/l .

Tabelle 2: Vereinfachte Darstellung des Pipettierschemas

Zugefügte Menge	Endkonzentration
1 μl	1 $\mu\text{mol/l}$
2 μl	3 $\mu\text{mol/l}$
7 μl	10 $\mu\text{mol/l}$
20 μl	30 $\mu\text{mol/l}$
70 μl	100 $\mu\text{mol/l}$

3.2. Versuchstiere

Als Versuchstiere für die entsprechenden Experimente wurden Meerschweinchen verwendet, da sie in ihrer Charakteristik der Organe dem Menschen sehr ähnlich sind. Es handelte sich um Meerschweinchen vom Stamm DH (Inzucht, Albinos), welche vom Institut für Toxikologie und Labortierzucht in Dobrá Voda, Universität Bratislava, stammten. Diese waren ausschließlich weiblichen Geschlechtes und lediglich zwischen vier und acht Wochen alt. Ihr Gewicht betrug im Durchschnitt zwischen 300 g und 600 g.

Die Meerschweinchen wurden am jeweiligen Versuchstag durch einen gezielten Genickschlag, ausschließlich durch ein qualifiziertes Fachpersonal, getötet. Dadurch war ein schneller und schmerzfreier Tod gewährleistet. Anschließend wurde der Thorax und das Abdomen mit einer Schere geöffnet und das schlagende Herz inklusive Lunge entnommen. Als nächstes wurden das Ileum und zuletzt die Aorta entfernt. Alle Organe wurden sofort in eine begaste Nährlösung (Kapitel 3.3) überführt und bis zur weiteren Präparation dort belassen.

3.3. Physiologische Elektrolytlösung

Die in Kapitel 3.2. bereits erwähnten Organe wurden unmittelbar nach der Entnahme in eine physiologische Nährlösung, allgemein Tyrode bezeichnet, eingebracht und mit einem Sauerstoffgemisch versetzt, um eine optimale Versorgung garantieren zu können.

Diese Nährlösung wurde nach den Vorschriften von Reiter (1967) hergestellt und entsprach einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung.

Die Organe mussten sowohl während der Dauer der Lagerung, der Bearbeitung, als auch während der Versuche mit ausreichender Nährlösung versehen werden.

Für die vollständige Sauerstoffversorgung wurde ein Gemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂, namens Oxymix oder Carbogen, verwendet.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Tyrode

Substanz	Molare Masse	Stocklösung	ml Stocklösung/ l Tyrode	mmol/l
NaCl	58,442 g/mol	1000,25 g/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/250ml	1,18	2,15
CaCl ₂	110,98 g/mol	34 g/250ml	3,20	3,92
Glucose	180,16 g/mol	Reinsubstanz	1,98	

Die Tyrode wurde jeden Tag in der Früh frisch zubereitet, indem die erforderlichen Mengen an NaCl, KCl, NaHCO₃, MgSO₄ und KH₂PO₄, wie in Tabelle 3 angeführt, in einem 2 l Messkolben vermischt wurden. Daraufhin wurde die Glucose hinzugefügt und es wurde der Kolben mit destilliertem Wasser cirka dreiviertel voll gefüllt. Nach vollständigem Lösen der Glucose wurde diese Mischung 20 Minuten mit Carbogen begast. Anschließend konnte man vorsichtig die vorgeschriebene Menge an CaCl₂ tropfenweise hinzugeben, wobei darauf zu achten war, dass es zu keiner Bildung schwer löslicher Calciumsalze kam, was an einer Trübung der Lösung zu erkennen gewesen wäre. Abschließend wurde der 2 Liter-Kolben bis zur Markierung mit destilliertem Wasser befüllt.

3.4. Entnahme und Präparation der Organe

Für die Untersuchungen der Wirkstoffe mussten das Herz, ein Teil des Darms und die Aorta isoliert und weiter bearbeitet werden.

3.4.1. Organentnahme

Die Organentnahme erfolgte in der schon in Kapitel 3.2. erwähnten Reihenfolge und diese Organe werden auch der Entnahme entsprechend gereiht.

Abbildung 5: Sezierbesteck



3.4.2. Organpräparation

Nachdem die Organe entnommen waren und in der entsprechenden Nährlösung mit dem Gasgemisch versetzt wurden, konnte man zur Präparation der einzelnen gewünschten Organsegmente übergehen.

Dafür wurden zu Beginn Petrischalen mit einem Korkboden ausgelegt und diese mit einem Schlauch fixiert. Darin füllte man ebenfalls die Nährlösung und begaste dies mit Oxymix. Die Präparation der Organe erfolgte unter der Betrachtung eines Auflichtmikroskops. Als Präparierbesteck dienten Pinzetten, Federgriffscheren und Präpariernadeln zur Befestigung der Organe.

Abbildung 6: Präparierbesteck und Mikroskop

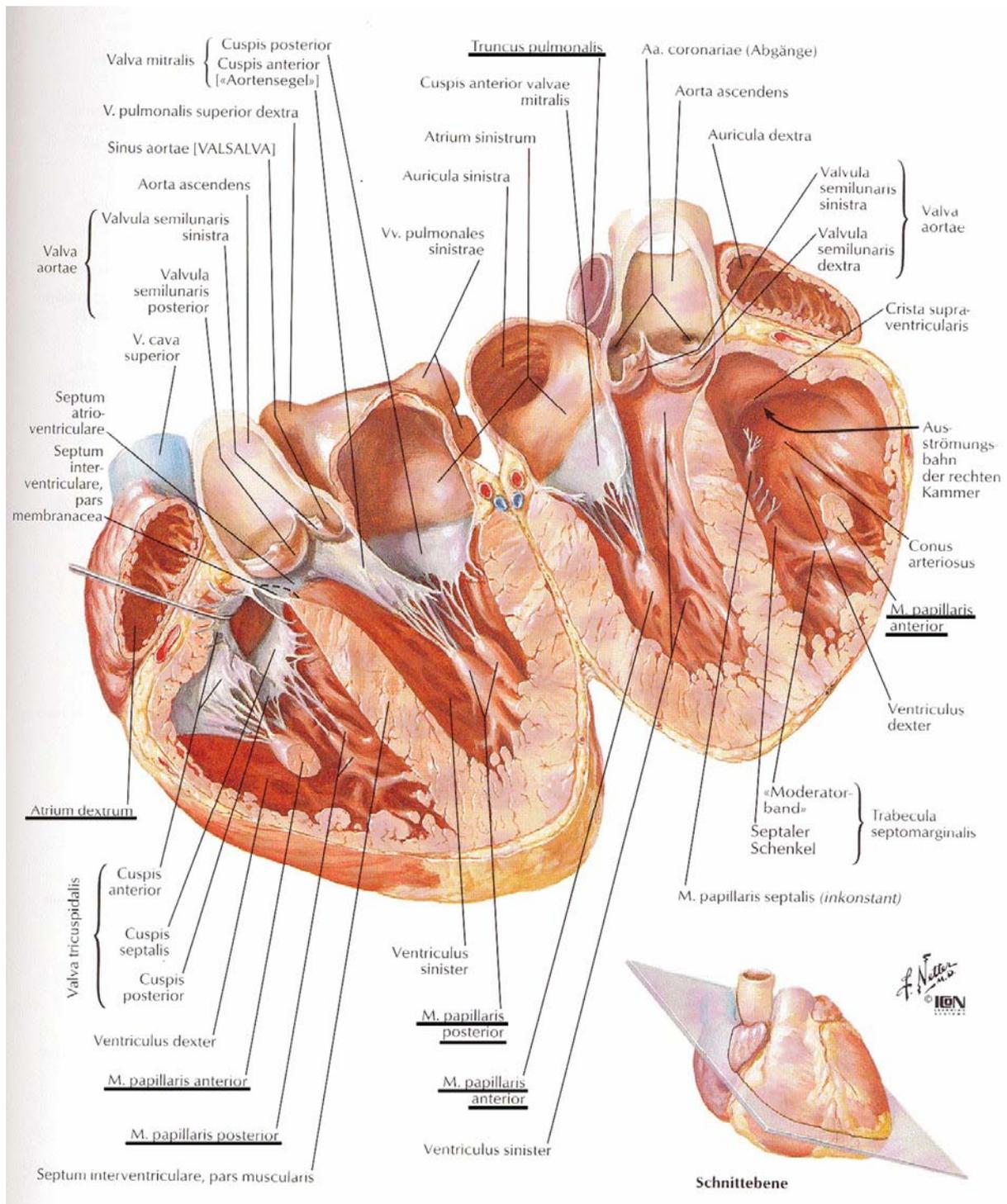


3.4.2.1. Der Rechte Vorhof (Atrium cordis dexter)

Zu allererst musste das Herz mit einer Schere von dem umliegenden Fettgewebe sowie der Lunge beziehungsweise noch anhaftenden Lungenfragmenten befreit werden. Dann wurde das Herz mit zwei Präpariernadeln an der Basis und an der Spitze auf der Korkunterlage befestigt und daraufhin konnte man vorsichtig den rechten Vorhof mit dem darauf befindlichen Sinusknoten isolieren. Hier musste darauf geachtet werden, dass man den Vorhof nicht überdehnt beziehungsweise in irgendeiner Art verletzt, wie zum Beispiel durch unvorsichtiges Abbinden. Ein abruptes Ende des autonomen Schlagens könnte ansonsten die Folge sein. Das eventuell noch vorhandene Fettgewebe oder ein vorhandenes Blutgerinnsel musste mit extremer Sorgfalt entfernt werden, da der Sinusknoten innerhalb des rechten Vorhofs nur schwer oder kaum exakt zu lokalisieren ist.

Anschließend wurden zwei unterschiedlich gefärbte Bindfäden am Vorhof befestigt. Dies erfolgte in der Weise, dass man das Ende und die Spitze des Vorhofes mit einer Nadel fixierte und dann einen Faden unter diesen fixierten Teil legte. Nun konnte man einen Knoten machen, indem man ein Silberhäkchen einfädelt und zur Sicherheit zog man daraufhin darüber noch einen zweiten Knoten fest. Dies erledigte man in beiden Fällen auf dieselbe Art und Weise und nach Vollendung wurde das Organ wieder in ein mit Oxymix durchperletes, Nährlösung enthaltendes Gefäß gefügt.

Abbildung 7: Querschnitt des Herzens (Netter FH 2003)



3.4.2.2. Lungenarterie (Arteria pulmonalis)

Um zur Pulmonalarterie zu gelangen, musste das bereits für den Vorhof herangezogene Herz noch von dem restlichen Fettgewebe befreit werden. Für unsere Versuchsreihen wurde nur der Truncus pulmonalis verwendet, das heißt derjenige Teil der Pulmonalarterie, der direkt aus der rechten Herzkammer hervorgeht.

Im Gegensatz zur Aorta, bei der man meist ein cirka 2-3 cm langes Stück herauspräparieren konnte, hatte man hier meist nur einen maximal 1 cm langen Abschnitt. Aus diesem Teil wurden ganz knapp am Herzen ringförmige Präparate von etwa zwei bis drei Millimeter Breite abgeschnitten. Falls an den Pulmonalisingen noch überschüssiges Fett- oder Muskelgewebe anhaftete, musste dies ebenfalls feinsäuberlich entfernt werden. Die Aufbewahrung der Ringe der Pulmonalarterie bis zur Einspannung in die entsprechenden Geräte entsprach der des Vorhofes.

3.4.2.3. Papillarmuskel (Musculus papillaris)

Nach der Isolierung des Vorhofes und der Pulmonalarterie wurden die Papillarmuskeln herauspräpariert. Dafür musste man über die Arteria pulmonalis entlang des Septums den rechten Ventrikel öffnen und diesen aufklappen. In dieser Position wurde das Herz erneut mit Präpariernadeln fixiert und man konnte am Ansatz der Papillarmuskelsehne wieder einen Silberhaken mit zur Hilfenahme eines Bindfadens befestigen. Danach wurde der Muskel aus der Herzwand herausgeschnitten. Eventuell vorhandene Purkinje-Fasern musste man allerdings noch entfernen, da sie durch ihre Aufgabe als letzter Teil des Erregungsleitungssystems eine Spontanaktivität aufweisen und den Versuchsablauf negativ beeinflussen würden. Nach Präparation der Papillarmuskel aus der rechten Herzkammer, konnte man noch zur weiteren Papillarmuskelentnahme den linken Ventrikel heranziehen. Die isolierten Fragmente wurden in einem Becherglas mit Elektrolytlösung unter Begasung aufbewahrt.

3.4.2.4. Der Darm (Terminales Ileum)

Nachdem man das Herz entnommen hatte, wurde der Bauchraum des Tieres sorgsam mit einer OP-Schere weiter geöffnet. Nun konnte man den Darm mit der Hand herausziehen, dabei sollte man erneut darauf achten, dass man das Gewebe nicht überdehnt oder sogar verletzt. Man verwendete für die Versuche den terminalen Teil des Ileums, dafür musste man den Darm in der Nähe des Caecum trennen und den jejunalen Teil mit einem Bindfaden abbinden. Dadurch war der Darm gleich für die spätere Weiterbearbeitung markiert, um die Enden nicht zu

verwechseln. Die Sauerstoffversorgung des Darms war hier besonders wichtig und sollte deswegen extra hervorgehoben werden.

Von dem etwa 25 cm langen Ileum wurde dann ein cirka ein Zentimeter großes Stück abgeschnitten, wobei die Enden schräg sein sollten. Die Spitzen dieser wurden vorsichtig mit einer Präpariernadel am Korkboden fest gemacht, wodurch das Einrollen der Darmwand weitgehend verhindert werden konnte. In Folge dessen konnte man in gleicher Weise wie bei dem Vorhofpräparat (Kapitel 3.4.1.1) ein Silberhäkchen mit farblich unterschiedlichen Bindfäden fixieren. Hier herrschte große Vorsicht, da man die Wand des Präparates nicht zu sehr verletzen durfte und das Darmloch nach Anbringen der Haken nach wie vor durchgängig sein musste. Dies sollte man noch überprüfen, indem man eine Pasteurpipette an eine Öffnung ansetzte und mit ein wenig Nährlösung durchspülte. Durch diesen Vorgang wurden auch noch restliche Teile des Chymus entfernt und im darauf folgenden Versuchsablauf konnte somit auch die Substanzlösung durch das Darmrohr zirkulieren.

Abbildung 8: Präparat des terminalen Ileums

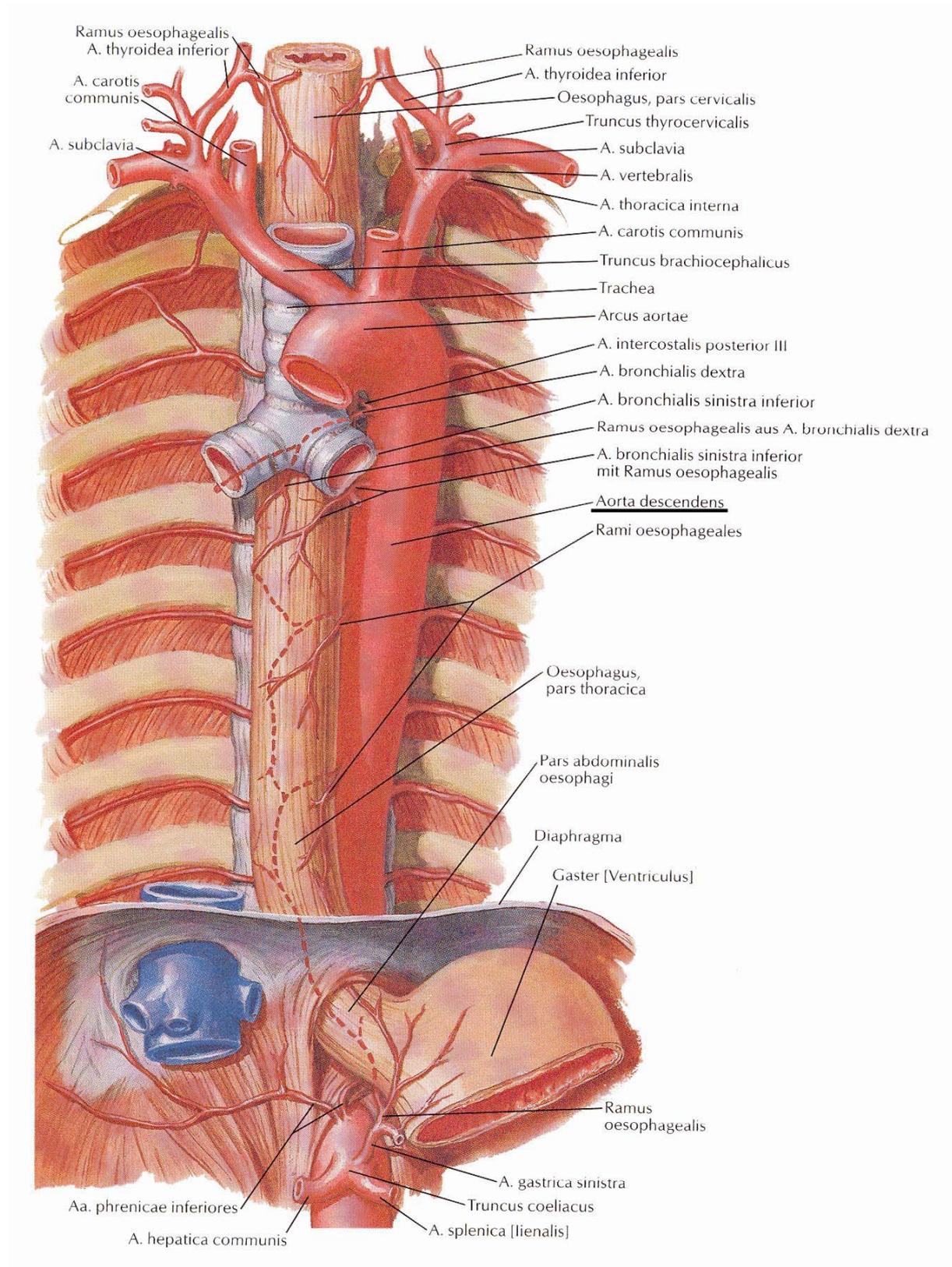


3.4.2.5. Die Aorta (Aorta descendens)

Als letztes wurde aus dem Tier die Aorta isoliert. Dafür musste der Thorax nun vollständig geöffnet werden und die Wirbelsäule durchgebogen werden, um zu dem oberhalb des Herzens gelegenen Teil der Aorta zu gelangen. Man musste zuerst die Aorta am oberen Ende durchtrennen, um sie anschließend am Rückrand entlang ausschneiden zu können. Dafür konnte man die Aorta möglichst sanft und locker mit einer Pinzette am oberen Teil halten und parallel zur Wirbelsäule mit einer Schere

vorsichtig die angewachsene Aorta abtrennen. Hierbei musste man darauf achten die Aorta weder zu stark zu dehnen, noch mit Löchern zu versehen.

Abbildung 9: Verlauf der Aorta entlang des Rückgrates (Netter FH 2003)



Nach der vollständigen Entnahme wurde dieses Aortateilstück in einer bereits vorbereiteten Petrischale mit Päpariernadeln an beiden Enden befestigt. Nun konnte man mit einer Federschere das noch vorhandene Gewebe entfernen und dann wurde die Aorta in cirka 2 Millimeter dicke Ringe geschnitten. Dabei sollten perforierte Teile rückstandslos beseitigt werden.

Abbildung 10: Originalabbildung der Aorta und fertig präparierten Aortaringe

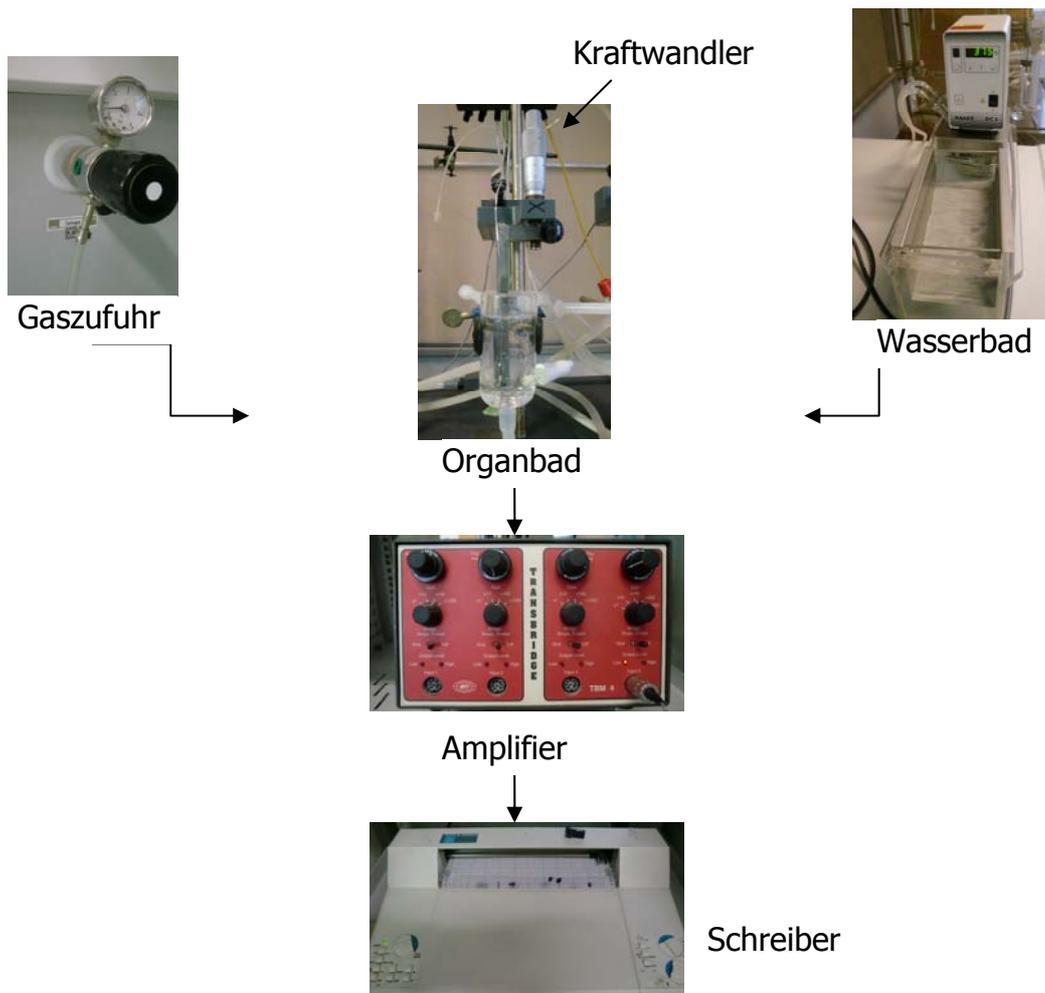


3.5. Versuchsanordnung und Apparaturen

Zur Untersuchung der Testsubstanz an den verschiedenen Organen des Meerschweinchens standen zwei unterschiedliche Apparaturen zur Verfügung. In die Apparatur I (Abbildung 12) wurde der Papillarmuskel eingespannt und die Apparatur II (Abbildung 14) wurde für die Aorta, die Pulmonalis, den Darm und für den Vorhof verwendet. Das jeweilige Organ war über einen Draht an einem Kraftwandler fixiert, welcher einen elektrischen Impuls an den Amplifier weitergab. Dieser hatte die Aufgabe das Signal zu verstärken, wodurch es dann durch Verbindung mit einem Schreiber zur Aufzeichnung auf ein Millimeterpapier kam.

Die Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse hatte oberste Priorität, weshalb die physiologische Bedingungen, wie die konstante Sauerstoffversorgung, Temperatur und pH, unbedingt gleich bleiben mussten.

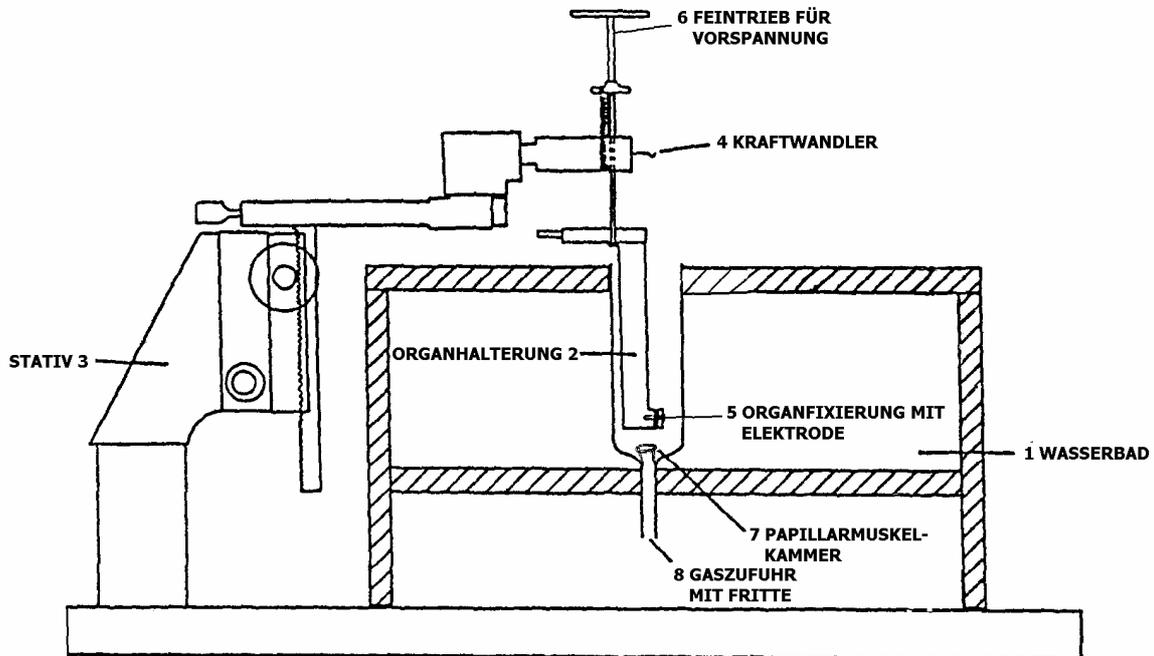
Abbildung 11: Versuchsanordnung



3.5.1. Apparatur I

Hier wird zunächst einmal die Skizze der Apparatur abgebildet.

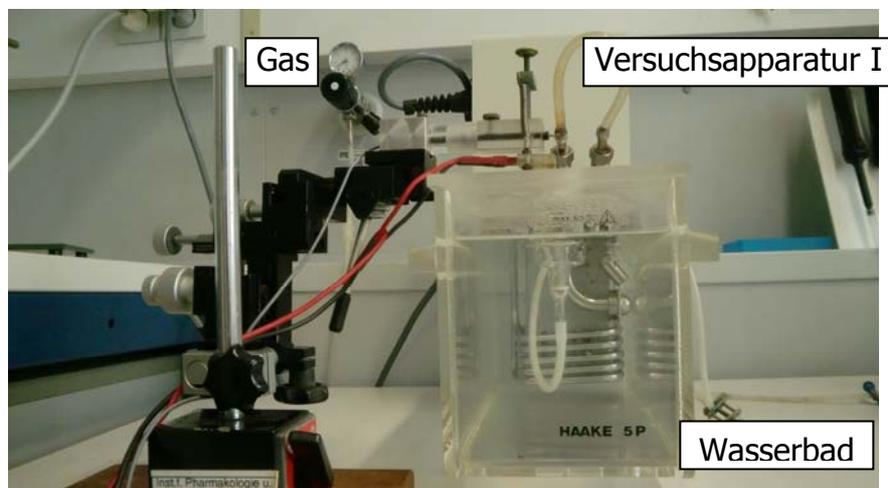
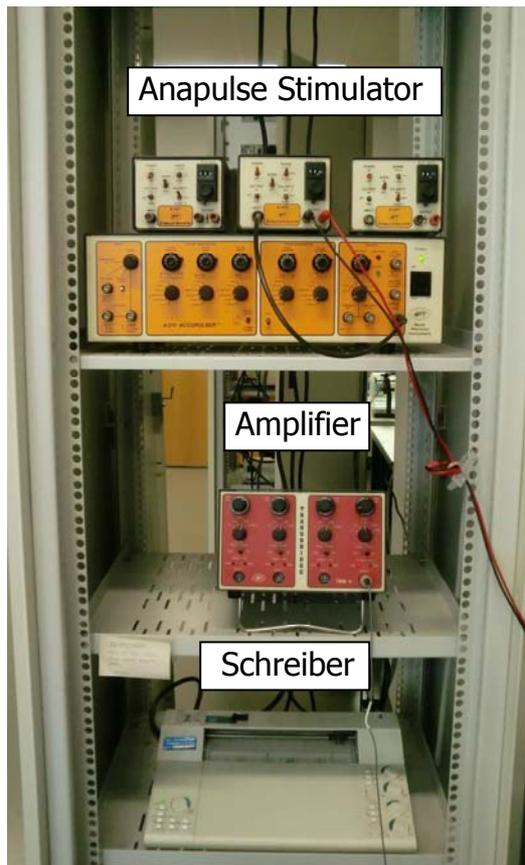
Abbildung 12:



Das verwendete Gerät setzte sich grob aus einer aus Acrylglas bestehenden Wasserbadwanne, in die eine Muskelkammer hineinragte, und einem Stativ zusammen. Die Temperatur des Wasserbades wurde über ein Thermostat geregelt und sollte konstant $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ betragen. Diese Apparatur wurde nur für die Papillarmuskelpräparate verwendet. Die Muskelkammer wurde mit 25 ml physiologischer Elektrolytlösung gefüllt und über die Glasfritte permanent mit Carbogen begast. Diese Lösung musste mindestens 10 Minuten im Wasserbad verweilen bevor man das Organ hinzufügen konnte, damit die Tyrode die jeweilige Temperatur erreichte. Der Papillarmuskel wurde wie in Kapitel 3.4.2.3 erwähnt vorbereitet und anschließend auf einen Silberdraht gehängt, der mit dem Kraftwandler verbunden war. Die Spitze des Muskels wurde zwischen der Elektrode und einer Plexiglasscheibe eingeklemmt, dabei war es wichtig, dass dieser flach an der Elektrode anlag. Über den Draht konnte dann die Kontraktion des Muskels auf den Kraftwandler übertragen und in elektrische Signale umgewandelt werden. Da der Papillarmuskel von selbst keine Regung zeigt, musste dieser elektrisch stimuliert

werden. Die Reizung wurde über einen Anapulse Stimulator (Model Isostim 301T, WPI, Hamden, CT, USA) erzielt. Nach vollständiger Einspannung des Organs konnte die Organhalterung mit Hilfe des Stativs in die Muskelkammer abgesenkt werden, sodass dieses komplett mit Nährlösung umspült wurde.

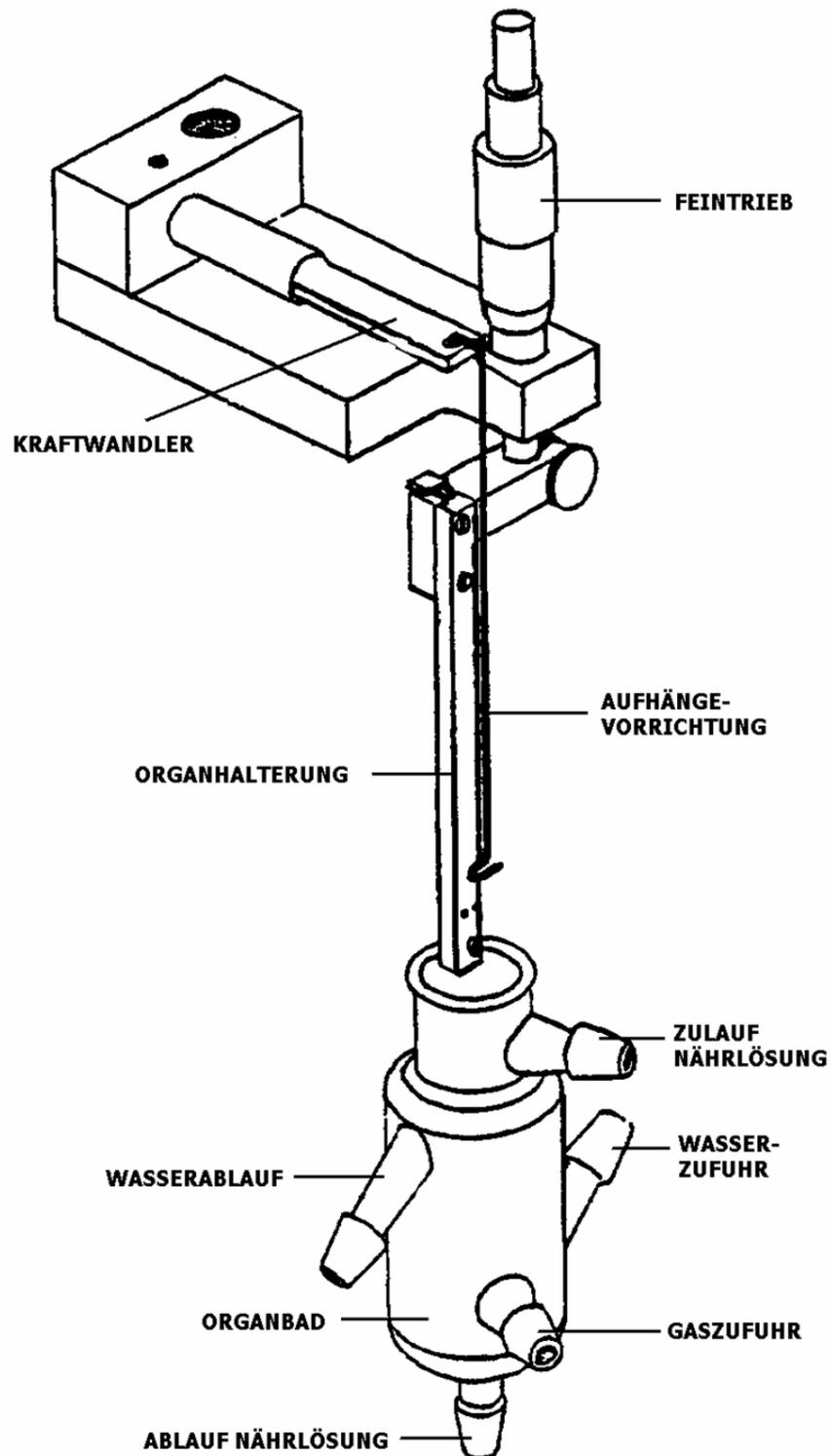
Abbildung 13: Originalabbildung der Versuchsanordnung I



3.5.2. Apparatur II

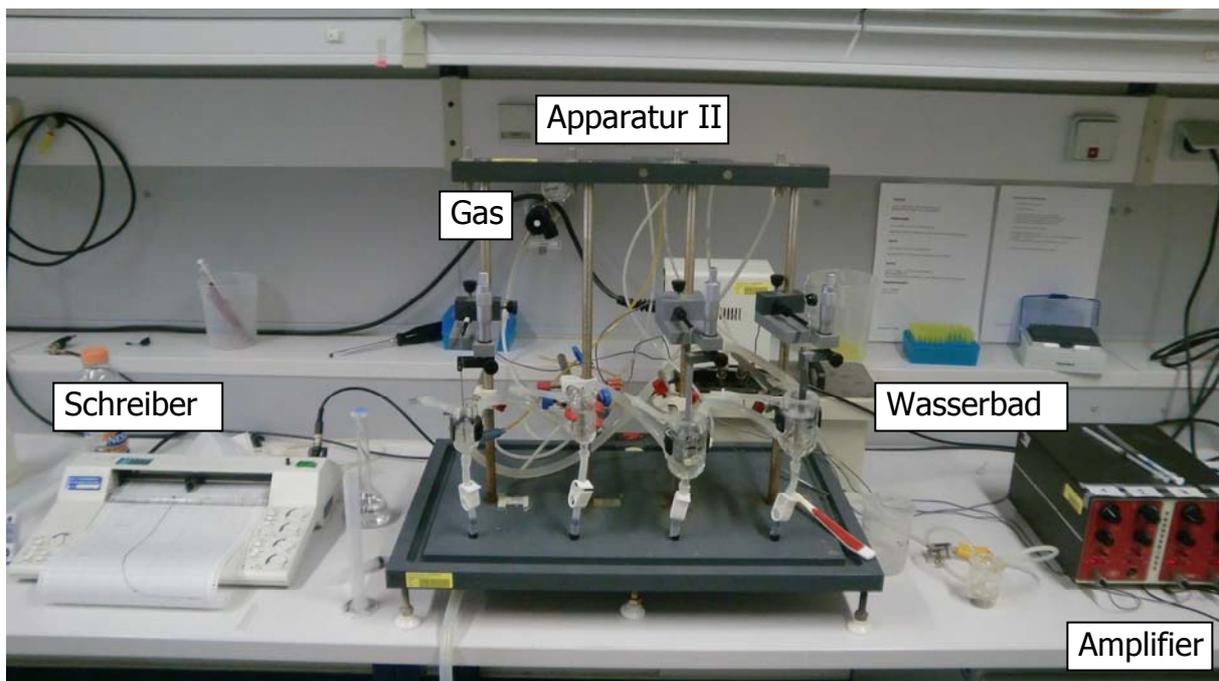
Die Apparatur II diente für die Versuchsreihen an Aorta, Arteria pulmonalis, terminalem Ileum und rechten Vorhof.

Abbildung 14:



In dieser Apparatur wurde das Organ durch zwei Silberdrähte befestigt, in die es eingehängt wurde. Bei den Vorhof- und Darmpräparaten fungierten zwei angebrachte Haken, wie in Kapitel 3.4.2.1 und 3.4.2.4 beschrieben, als Hilfsmittel für ein problemloses Einspannen in das Gerät. Hingegen wurde bei der Aorta und Arteria pulmonalis das Organ direkt durch Einfädeln der beiden Drähte in die ringförmigen Stücke eingespannt. Nun konnten die jeweiligen Organe in die bereits mit Tyrode befüllten und temperierten Organbäder abgesenkt werden und wurden durch das Gasmisch sehr schnell wieder optimal versorgt. Durch den Feintrieb konnte die notwendige Vorspannung der Organe vorgenommen werden und auch hier wurde die Kontraktion in Stromimpulse transformiert und an den Schreiber weitergeleitet.

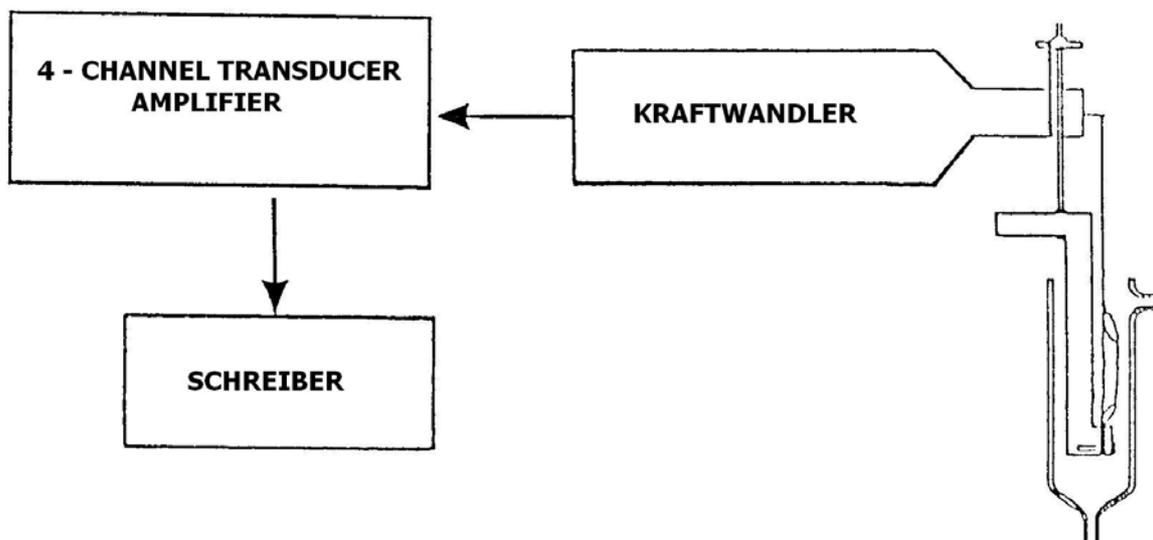
Abbildung 15: Originalabbildung der Versuchsapparatur II



3.5.3. Der Kraftwandler

Der Kraftwandler war das sogenannte Herzstück der Versuche. Er hatte die Funktion einen mechanischen Vorgang in eine elektrische, messbare Größe zu überführen. Dies wurde in unserem Fall über einen Widerstandswandler vollzogen, der eine Änderung der Dehnung wahrnahm und dadurch kam es zu einer Veränderung des Widerstandes im Dehnungssteifes, wodurch ebenfalls der Stromfluss beeinflusst wurde. Die Kontraktionsänderung wurde über den Kraftwandler zu einem Verstärker (4-Channel Transducer Amplifier, Firma WPI) gebracht und dieser war mit einem Schreiber der Firma Kipp & Zonen (Flatbed Recorder Modell BD 112) verbunden, der die erhaltenen Impulse auf das Millimeterpapier übertrug.

Abbildung 16: Schematische Darstellung des Kraftwandlers



3.5.4. Die Gasversorgung

Wie schon in vorigen Kapiteln erwähnt war die Versorgung der Organe mit dem Sauerstoff/ Kohlendioxid – Gemisch unabdinglich. Während der Versuchsabläufe wurden diese ohne Unterbrechung über Schläuche, die mit den Apparaturen verbunden waren, versorgt. Über die entsprechenden Ventile konnte die Gaszufuhr grob geregelt werden. Die Schläuche hatten am Ende jeweils eine Glasfritte, welche als eine Art Filter fungierte und auch eine zusätzliche Regelmöglichkeit der Carbogenversorgung darstellte, wodurch eine feine Zerstäubung erzielt wurde. Zusätzlich waren an den Zufuhrschläuchen sogenannte Schraubklemmen angebracht, welche eine weitere feinere Veränderung der Gasversorgung ermöglichte.

Die Begasung mit Oxymix durfte auf keinen Fall Lücken aufweisen und musste stets aufrechterhalten werden. Nur so war es möglich eine ausreichende Sauerstoffversorgung, einen konstanten physiologischen pH-Wert von ungefähr 7,2 bis 7,4 und eine gleichmäßige Verteilung der Wirkstoffe in den Organbädern zu gewährleisten.

3.5.5. Das Wasserbad

Genauso wichtig wie eine optimale Gasversorgung war es eine Temperaturkonstanz vorweisen zu können. Dies wurde durch die entsprechenden Wasserbäder mit einem Thermostat ermöglicht.

Die Temperatur des Bades bei Apparatur I, welches wie in Kapitel 3.5.1 angeführt, nur für die Papillarmuskelpräparate verwendet wurde, sollte stets $35 \pm 1^\circ\text{C}$ aufweisen. Bei allen anderen Versuchen sollte die Temperatur $37 \pm 1^\circ\text{C}$ betragen, um optimale Versuchsbedingungen zu erhalten.

3.6. Die Versuchsabläufe

In diesem Kapitel wird auf die genaue Durchführung der Versuche eingegangen. In allen Fällen musste vor Versuchsbeginn sichergestellt werden, dass keine Verunreinigungen der Gefäße vorlagen. Dabei musste man die Organbäder mit Aqua destillata reinigen und mit der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung durchspülen. Zum Schluss füllte man noch die Nährlösung in die Gefäße und erreichte die entsprechende Temperatur durch die aktivierten Wasserbäder.

3.6.1. Wirkstärke der Substanzen bei isolierten Meerschweinchenorganen

3.6.1.1. Atrium dexter

Der rechte Vorhof wurde wie in Kapitel 3.4.2.1 näher beschrieben nach der Entnahme des Herzens isoliert und für den weiteren Versuch mit Häkchen versehen. Dann wurde dieser mit gewisser Sorgfalt in die Apparatur II eingehängt. Dabei sollte er nicht zu gespannt werden, sondern eher locker befestigt sein. Anschließend wurde die Organhalterung mit dem fixierten Präparat in die exakt 25 ml begaste Nährlösung getaucht. Dieser Vorgang sollte relativ schnell vor sich gehen, damit es zu keiner möglichen Beeinflussung der Schlagfähigkeit des Vorhofes kommt. Der Vorhof musste somit nicht elektrisch gereizt werden, sondern er schlug spontan.

Nun konnte man den Schreiber einschalten und mit den erforderlichen Einstellungen beginnen. Als erstes musste der Schreiber auf 5 mV und auf Speed 5 mm/sec gestellt werden und mit einem Zero-Drehrad auf den Nullpunkt gestellt werden. Danach wurde der Amplifier in Betrieb genommen und es musste mit diesem der Nullpunkt nachjustiert werden. Daraufhin wurde mit dem Feintrieb die Vorspannung des Organs auf 10,4 mN vorgenommen, um während des Versuches eine maximale Kontraktionskraft zu ermöglichen. Die Vorspannung wurde aufgrund der Plastizität der Organe durchgeführt und hatte den Zweck immer die gleichen Ausgangsbedingungen zu schaffen. Nach einer cirka 30 bis 45 minütigen Anpassungsphase konnte mit der Kontrollmessung begonnen werden. Dafür wurde alle fünf Minuten der Schreiber mit Pen Down abgesetzt und über 12 sec, das entsprach auf dem Millimeterpapier 6 Kästchen (= 6 cm), die Schläge aufgezeichnet. Die Anzahl der Schläge musste über mindestens vier Messungen konstant bleiben

und dann konnte man mit dem eigentlichen Versuch beginnen. Es wurde die erste Konzentration an Testsubstanz zugegeben und alle fünf Minuten die Schlagfrequenz aufgezeichnet. Dies erfolgte über eine Dauer von fünfundvierzig Minuten und dann wurde die nächst höhere Konzentration eingebracht bis man zur endgültigen Maximalkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ im Organbad kam.

Bei der Zugabe der Substanz mit der Finnmikropipette in die Organbadlösung war darauf zu achten, dass man sowohl die Silberdrähte, als auch den Kraftwandler nicht berührte, da das ansonsten zu einer veränderten Aufzeichnung geführt hätte.

3.6.1.2. Musculus papillaris

Der bereits präparierte Papillarmuskel wurde in Appatur I (siehe Kapitel 3.5.1) eingespannt und in die temperierte und mit 25 ml Elektrolytlösung befüllte Muskelkammer abgesenkt. Daraufhin wurde eine Spannung des Organs von 3,92 mN vollzogen. Diese musste während des gesamten Versuchsablauf konstant bleiben und mit dem Feintrieb stets nachjustiert, um eine Abnahme der Kontraktionskraft durch eine verringerte Ausgangsspannung zu verhindern (Reiter M 1967). Im Gegensatz zum spontan-schlagenden Vorhof musste der Muskel elektrischen Reizen ausgesetzt werden, die mithilfe des Reizgerätes Accupulser A310 (World Precision Instrument Hamden, FL, USA) erzeugt und über die Silberchloridelektroden übertragen wurden. Dadurch kam es auch beim Papillarmuskel zur Kontraktion. Wenn man jedoch auch eine Kontraktion ohne Reizung feststellen konnte, so war dies meist ein Hinweis auf noch vorhandene und nicht vollständig entfernte Purkinje Faser. Diese mussten vor dem weiteren Ablauf entfernt werden. Nach einer kurzen Anpassungszeit wurde der Papillarmuskel mit Rechteckimpulsen von 10 ms^{-1} Länge bei einer Frequenz von 1 Hertz zur Stimulation gebracht. Die eingebrachte Stromstärke wurde über die Isolation Unit geregelt und lag ungefähr 10% über der minimalen Reizschwelle. Dies war vor allem aus dem Grund wichtig, da es bei einer zu hohen Stromstärke zu einer Ausschüttung der Catecholaminspeicher kommt und in weiterer Folge zu einer Verfälschung der Versuchsergebnisse führt. (Furchgott R. F. et al. 1959) Diese veränderten Ergebnisse würden sich vor allem in einem sogenannten „run down“ zu erkennen geben, das heißt die Amplitude des sich kontrahierenden Papillarmuskels würde von selbst abnehmen.

Die Kontrollphase und die Einstellung am Schreiber ähnelt der des rechten Vorhofes (Kapitel 3.6.1.1). Der einzige Unterschied war, dass die Aufzeichnung nicht über eine Distanz von sechs Zentimeter durchgeführt wurde, sondern ausschließlich von der Anzahl der Amplituden abhing. Es wurden immer sieben bis neun Amplituden aufgezeichnet. Nach vollendeter Kontrolle wurde die Substanzzugabe nach dem kumulativen Schema in Tabelle 2 im zeitlichen Abstand von 45 min begonnen. Am Ende jedes Konzentrationsintervalls wurde die letzte Messung mit Speed 20 mm/sec vorgenommen, da dadurch ein genaueres Vermessen ermöglicht wurde.

3.6.1.3. Terminales Ileum

Mit Hilfe der zwei angebrachten Silberhaken wurde das isolierte und präparierte Ileumstück in die Organhalterung eingespannt, sodass der im Tier jejunal zugewandte Abschnitt oben war. Durch die farbigen Fäden an beiden Enden war ein Verwechseln der jejunalen und der caecalen Seite ausgeschlossen. Hier musste wiederum darauf geachtet werden, den Darm behutsam zu behandeln und nicht zu überdehnen. Nach dem Absenken in das temperierte Nährlösungsbad war der erste Schritt erneut die Geräteaktivierung, wie schon in Kapitel 3.6.1.1 ausführlich erklärt. Die Vorspannung betrug allerdings 4,92 mN bei 5 mV. Nach der vorgeschriebenen Akklimatisierungsphase des Organs über eine Dauer von zwanzig Minuten musste eine eventuelle Verschiebung des Nullpunktes mit der Stellschraube (= Feintrieb) nachjustiert werden. Diese Anpassung war meist aufgrund der Peristaltik des Darms notwendig. Darauf folgend wurde der Schreiber des Kipp & Zonen Gerätes abgesenkt und die Tyrode über eine am Ablaufschlauch angebrachte Klammer abgelassen und exakt 25 ml einer 60 mmolaren Kaliumchlorid-Lösung eingefüllt. Diese Lösung wurde ebenfalls täglich neu bereitet, durch Einwaage von 0,45 g KCl und auffüllen mit Tyrode bis zur Markierung des 100 ml Messkolben. Durch die Zugabe hat man eine sofortige Kontraktion des Organs erreicht, die mit dem Flatbad-Recorder aufgezeichnet wurde. Die Kontraktion unterscheidet sich sehr eindeutig von der der Aorta oder der Arteria pulmonalis. Nach einem sehr starken Beginn der Kontraktion, fiel diese allerdings auch wieder bis nahezu der Hälfte ab und pendelte sich erst langsam auf eine konstante Kontraktion ein. Nach etwa 45 – 60 min konnte man dann mit einer Plateauphase rechnen, welche eine gleich bleibende Kontraktion

anzeigte. Ein Indiz für ein nicht zu verwendendes Darmpräparat war, eine konstante permanente Abnahme der Kontraktion, nach lediglich einem kurzen oder kaum vorhandenen Plateau.

Die Testsubstanz wurde dann wieder nach der Kontrollzeit in 45 min Intervallen zugefügt.

3.6.1.4. Die Aorta

Die ringförmigen Aortapräparate wurden ohne Beschädigung durch die Enden der Drähte in die Aufhängevorrichtung der Apparatur II eingehängt und durften noch nicht gespannt werden. Die Halterung inklusive Organ wurde in das Bad abgelassen, sodass die Aorta mindestens 1 cm unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche saß. Der Schreiber und Amplifier wurde eingeschaltet und aktiviert. Dann musste man das Organ bei 10 mV auf 10 cm vorspannen, das entsprach einem Zug von 19,6 mN. Nach einer 20 minütigen Gewöhnungsphase wurde das Gerät auf 5 mV umgestellt und der wieder verschobene Nullpunkt am Millimeterpapier mit dem Feintrieb korrigiert. Die Aufzeichnung wurde gestartet und die Tyrode wurde gegen eine Kaliumchloridlösung wie in 3.6.1.3 ausgetauscht. Diese Kaliumchloridlösung unterscheidet sich in ihrer Konzentration von der des Ileums. Hier beträgt diese 90 mmol und wird durch Lösen von 0,67 g KCl in 100 ml Nährlösung hergestellt. Die KCl-Lösung bewirkte eine unmittelbare Kontraktion, die in den ersten Minuten sehr rasch passiert und sich dann in den nächsten 45 Minuten langsam auf einem konstanten Niveau einfindet. Diese Höhe der Kontraktionskraft wurde als Ausgangsbeziehungsweise Referenzwert angesehen. Von da an konnte mit der Substanzzugabe nach dem angegebenen Pipettierschema begonnen werden.

3.6.1.5. Die Arteria pulmonalis

Der Versuchsvorgang der Arteria pulmonalis entsprach jenem der Aorta (3.6.1.4). Die Vorspannung wurde hingegen bei 5 mV vorgenommen und war einer Kraft von 9,81 mN gleichzusetzen. Eine Abnahme der chemisch herbeigeführten Kontraktion durch eine Testsubstanz wurde durch einen Art Kurvenverlauf auf dem Millimeterpapier sichtbar gemacht.

3.6.2. Wirkung der Substanz SWS 4 HCl in Kombination mit Agonisten an der Aorta

3.6.2.1. Versuchsablauf mit Glibenclamid und Nitro-L-Arginin

Die Aortateilstücke wurden wie in Kapitel 3.4.2.5 isoliert und präpariert und in die Apparatur II (Kapitel 3.5.2) eingehängt. Die Vorspannung betrug auch hier 19,6 mN bei 10 mV. Nach der Akklimatisierungsphase des Organs an die Umgebung wurde der Flatbad Recorder auf 5 mV umgestellt, eine etwaige Verschiebung des Nullpunktes durch die Stellschraube reguliert und vor dem Zufügen der 9 mmolaren Kaliumchloridlösung die Aufzeichnung begonnen. Das Erreichen der maximalen Kontraktion und der steady state Phase war auch hier das Ziel. Anschließend konnte man den Agonisten zufügen.

Bei den Glibenclamidversuchen wurden einerseits Versuchsreihen mit 30 µmol/l als auch mit 100 µmol/l durchgeführt. Anders war dies bei Nitro-L-Arginin, wo lediglich mit einer Konzentration von 100 µmol/l gearbeitet wurde. Nachdem 45 min mit der jeweiligen Konzentration vergangen waren, wurde von der Testsubstanz SWS 4 HCl eine Konzentration von 25 µmol/l ergänzt und nach weiteren 45 min war man am Ende des Versuches angelangt. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.8.3 näher erklärt.

3.6.2.2. Versuchsablauf mit Phenylephrin

Zu Beginn war es notwendig eine Verdünnungsreihe zu erstellen, um in den entsprechenden Erlenmeyerkolben eine Konzentration von 0,1; 0,3; 1; 3; und 10 µmol/l zu erhalten.

Daraufhin wurde ein Aortaring in die Apparatur II eingespannt und in ein 18 ml begastes Nährlösungsbad abgesenkt. Zuvor wurde die Höhe des 18 ml Füllstandes auf dem durchsichtigen Organbad markiert. Die notwendigen Einwaagen mussten ebenfalls auf das 18 ml Organbad berechnet werden. Nach einer rund 20 minütigen Gewöhnungszeit wurde zunächst 0,67 ml der höchsten Konzentration der Verdünnungsreihe mit einer Injektionsspritze in das Bad eingebracht und mit dem Schreiber über etwa 40 Sekunden aufgenommen. Dann musste man innerhalb von rund acht Minuten zwei Mal mit frischer Tyrodelösung spülen und wieder auf das

erforderliche Volumen auffüllen, um schließlich mit der nächst kleineren Konzentration fortführen zu können. Diesen Vorgang wiederholte man mit der gesamten Verdünnungsreihe. Die Versuchsreihe mit dem reinen Agonisten galt als Kontrolle im Vergleich zu dem Versuch mit der Testsubstanz.

Für den Versuchsablauf mit der Wirksubstanz wurde die EC_{50} Konzentration von SWS 4 HCl der Tyrode zugesetzt und mit dieser Lösung wurde der vorhergehende Kontrollversuch weitergeführt, indem zu allererst eine Einwirkzeit von 45 Minuten in der 18 ml Wirkstoff-Tyrode eingehalten wurde. Anschließend erfolgte die Zugabe der verschiedenen Konzentrationen der Agonisten erneut. Dieses Mal wurde aber immer mit der Tyrode inklusive 25 $\mu\text{mol/l}$ Wirkstoffkonzentration gespült, um eine gleich bleibende Konzentration des Wirkstoffes an der Aorta zu gewährleisten.

Der Versuchsablauf setzte sich also aus drei wesentlichen Abschnitten zusammen:

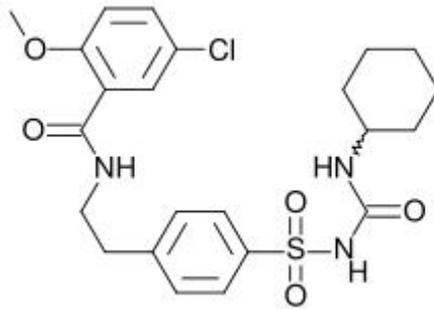
- die Kontrollphase
- die Einwirkphase mit der Nährstofflösung und dem Agonisten
- die Auswaschphase

Dieser Zyklus musste zeitlich genau eingehalten werden, wodurch man für den 10 Minuten Rhythmus eine Stoppuhr zur Hand nahm. Weiters war es besonders wichtig möglichst gleichmäßig, an derselben Stelle und ziemlich nahe an dem Organ die unterschiedlichen Konzentrationen einzuspritzen.

3.7. Verwendete Agonisten

3.7.1. Glibenclamid

Abbildung 17: Glibenclamid (MG = 494,0 g/mol)



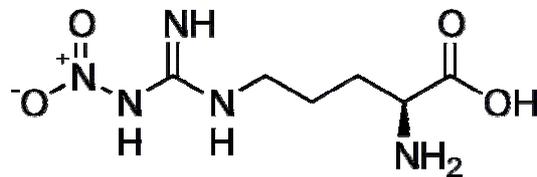
Glibenclamid zählt zu den Sulfonylharnstoff-Derivaten und wird aufgrund seiner blutdrucksenkenden Wirkung als orales Antidiabetikum eingesetzt.

Es blockiert die Kaliumkanäle von B-Zellen, wodurch es zu einer Abnahme der Kaliumpermeabilität und des Membranruhepotentials kommt. In Folge dessen werden dann spannungsabhängige Calciumkanäle geöffnet. Die Steigerung der intrazellulären Calciumionenkonzentration führt hiermit zu einer gesteigerten Exozytose von Insulin.

Als Nebenwirkungen sind vor allem gastrointestinale Beschwerden sowie allergische Reaktionen bekannt. In seltenen Fällen kann es auch zu Leukopenie und Thrombozytopenie kommen. Besonders die Gabe von Glibenclamid, welches zu den stark und lang wirkenden Präparaten zählt, kann zu schweren hypoglykämischen Zuständen führen. (Mutschler et al. 2001)

3.7.2. Nitro-L-Arginin

Abbildung 18: Nitro-L-Arginin (MG = 219,20 g/mol)



Nitro-L-Arginin ist ein kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase und zählt somit zu den NO-Antagonisten. (Ishii et al. 1990)

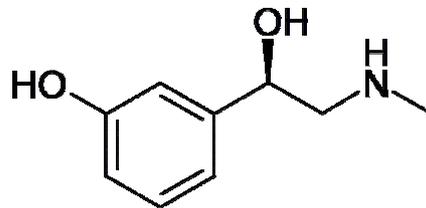
Stickstoffmonoxid (NO), früher auch als „Endothelium-derived relaxing factor“ bezeichnet (Mutschler et al. 2001), ist der endogene Stimulator der Guanylatcyclase und durch diese Aktivierung steigt das intrazelluläre cyclische Guanosinmonophosphat an. Infolgedessen wird vermehrt Calcium aus dem endoplasmatischem Retikulum freigesetzt, was zu Relaxation der glatten Muskulatur führt. (Rosemann 2002)

Wenn hingegen Nitro-L-Arginin diese Kaskade blockiert, kommt es zu keiner Dilatation der Gefäße.

In verschiedenen Versuchsreihen wurde bereits der Effekt von Nitro-L-Arginin nachgewiesen, wodurch zum Beispiel die Kontraktilität des Darms deutlich erhöht wurde. (Rosemann 2002)

3.7.3. Phenylephrin

Abbildung 19: Phenylephrin (MG = 167,21 g/mol)



Phenylephrin ist ein α – Adrenozeptor-Agonist (α -Sympathomimetika) und erregt sympathische α -Rezeptoren. Sie werden zur systemischen oder lokalen Vasokonstriktion eingesetzt. (Mutschler et al. 2001)

Zur systemischen Anwendung werden vor allem Substanzen des Typs Phenylethanolamin-Derivate verwendet, die zur Behandlung hypotoner Blutdruckstörungen dienen.

Phenylephrin wird hauptsächlich zur lokalen Schleimhautabschwellung bei unspezifischer und allergischer Konjunktivitis, Sinusitis und Nasopharyngitis verwendet. (Mutschler et al. 2001)

Bei Säuglingen und Kleinkindern muss vor allem auf die Dosierung und die Darreichungsform geachtet werden, da es womöglich sonst zu Atemstörungen und komatösen Zuständen infolge Resorption kommen kann. Weiters ist auch bei empfindlichen Patienten (z.B. Hyperthyreotikern und Hypertonikern) eine vorsichtige Dosierung zu wählen, da die Gefahr systemischer Nebenwirkungen besteht. Als Nebenwirkungen können hier ventrikuläre Rhythmusstörungen, Herzklopfen oder Miktionsstörungen auftreten. (Mutschler et al. 2001)

3.8. Auswertung und Statistik

3.8.1. Atrium dexter

Bei den Versuchen am rechten Vorhof wurde die Chronotropie, das heißt die Schlagfrequenz (Schläge/Minute), festgestellt. Durch Zugabe einer Substanz konnte man nach der vollendeten Kontrollphase die Veränderung bezüglich der Anzahl Herzschläge beobachten. Die Messung wurde wie in Kapitel 3.6.1.1 im fünf Minuten Rhythmus über eine Länge von sechs Zentimetern durchgeführt. Diese Ausschläge des Schreibers in dem aufgezeichneten Bereich wurden dann gezählt und mit fünf multipliziert, wodurch man somit die Schlagfrequenz pro Minute erhielt. Durch die kumulative Zugabe des Wirkstoffes konnte man einen positiven oder negativen chronotropen Effekt auf den Vorhof nachweisen.

3.8.2. Musculus papillaris

Die Papillarmuskelexperimente waren für die Ermittlung der Kontraktionskraft in mN ausgelegt. Während der Versuchsreihen wurden alle fünf Minuten die Amplituden mit einem Lineal vermessen und die Durchschnittswerte in Zentimeter Angaben notiert. Diesen Wert musste man anschließend mit dem Eichfaktor des Kraftwandlers multiplizieren, um die tatsächliche Größe der Kontraktion zu erhalten. Der zu Beginn ermittelte Kontrollwert stellte 0% dar und somit konnte jegliche Inotropieveränderung registriert werden.

3.8.3. Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum

Durch die Versuche an der Aorta, Arteria pulmonalis und am terminalem Ileum wurde eine mögliche dilatierende Wirkung der Testsubstanz ersichtlich. Die, nach Zugabe einer Kaliumchloridlösung, erreichten maximalen Kontraktion des Organs, zeigte nach gewisser Zeit eine Plateauphase, auch steady state genannt, auf. Für die Auswertung war es dann entscheidend, das darauf folgende Einspritzen der unterschiedlichen Substanzkonzentration zu kennzeichnen. Die Abstände zur Nulllinie wurden an diesen Punkten in Zentimeter ermittelt und wiederum mit dem Eichfaktor, der von der Einstellung der mV Einstellung am Schreiber abhing, multipliziert. Bei einer Messung bei 5 mV war 1 cm mit 0,98 mN gleichzusetzen, wohingegen dieser

Wert noch bei 2 mV mit 0,2 und bei 10 mV mit 2 multipliziert wurde. Die Markierung der Konzentrationsänderung auf der Kontraktionskurve fungierte als Hilfsmittel für die weitere Auswertung, da immer der Zeitpunkt der nächsten Einspritzung als Endergebnis der vorhergehenden angesehen wurde. Wenn man also den Kontrollwert (0 %) in cm ermitteln wollte, musste man das Lineal bei dem Punkt der gekennzeichneten ersten Zugabe des Wirkstoffes (1 μ l) anlegen.

3.8.4. Statistik

Bevor man die Werte zu genauen statistischen Angaben heranziehen konnte, wurde in simultanen Versuchen die Auswirkung des Lösungsmittels (DMSO) ermittelt. Diese Ergebnisse wurden anschließend von den Werten mit der Testsubstanz abgezogen, um eine Verfälschung durch eine bei manchen Organen beachtliche Eigenwirkung des Dimethylsulfoxid ausschließen zu können.

Die Schlagfrequenz (f) und die Kontraktionskraft (f_c) wurde sowohl in mN beziehungsweise in Schläge/min, als auch in Prozent angegeben.

Aus den Messdaten wurden daraufhin der arithmetische Mittelwert und der Standardfehler errechnet, wobei hierfür nur die mN Werte verwendet wurden, um eine zusätzliche Streuung der Ergebnisse oder eine höhere Signifikanz zu vermeiden. Mithilfe des Programms „Sigma Plot 8.0“ wurden ein wenig vereinfacht weitere statistische Berechnungen durchgeführt und der EC_{50} Wert ermittelt. Dieser stellt jene Konzentration in mmol/l dar, bei der die Kontraktionskraft oder die Schlagfrequenz die Hälfte ihres Kontrollwertes beträgt. Dafür wurde eine graphische Darstellung einer Konzentrations-Wirkungskurve erstellt, wodurch man den EC_{50} Wert sehr gut ablesen konnte.

Weiters wurden die Ergebnisse mit dem „Student-T-Test“ für gepaarte Beobachtungen beurteilt, wonach die Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit P von $< 5\%$ ($P < 0,05$) bzw. $< 1\%$ ($P < 0,01$) als signifikant anzusehen waren. Wohingegen eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als $0,1\%$ ($P < 0,001$) hochsignifikant war.

4. ERGEBNISSE

4.1. Ergebnisse der Testsubstanz SWS 4 HCl

4.1.1. Wirkung von SWS 4 HCl auf den Vorhof

Der Einfluss der Testsubstanz auf die Schlagfrequenz des Atrium cordis dexter wurde in fünf Versuchen ermittelt. Die Versuche wurden wie unter Punkt 3.6.1.1 durchgeführt und nach Berechnung des arithmetischen Mittels ein Kontrollwert (\triangleq 0%) von $218 \pm 10,56$ Schläge pro Minute erreicht.

Der Wirkstoff zeigte bei Konzentrationen, die über $30 \mu\text{mol/l}$ lagen eine immer deutlich werdende negativ chronotrope Wirkung, wodurch ein EC_{50} von $55,97 \mu\text{mol/l}$ erreicht wurde. Bei drei von fünf Versuchen setzte das Vorhofpräparat bei der maximalen Konzentration ($\triangleq 100 \mu\text{mol/l}$) seine autonome Aktivität aus und die Schlagfrequenz sank auf 0.

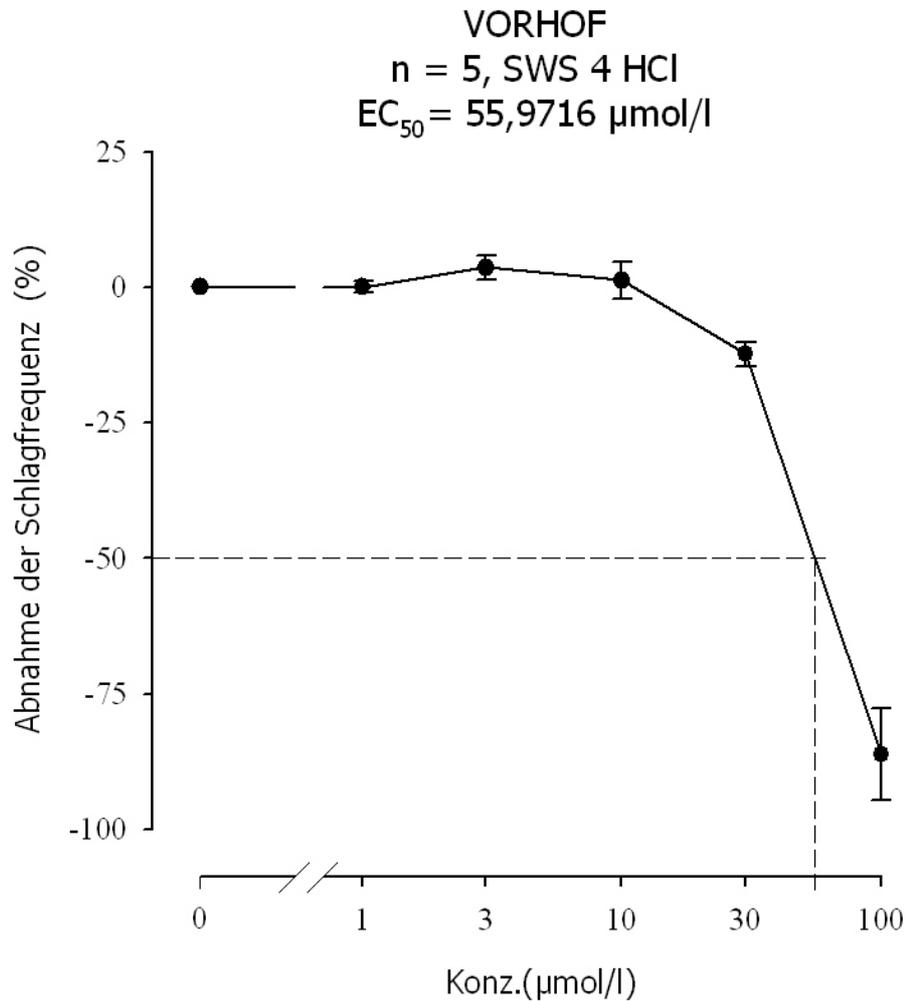
Tabelle 4: Wirkung von SWS 4 HCl auf das Atrium dexter

SWS 4 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	f \pm SEM (x/min)	f \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$218 \pm 10,56$	0 ± 0	5	-
1	$218 \pm 10,56$	$0,01 \pm 1,03$	5	n.s.
3	$226 \pm 12,39$	$3,63 \pm 2,28$	5	n.s.
10	$221 \pm 13,64$	$1,29 \pm 3,44$	5	n.s.
30	$191 \pm 9,27$	$- 12,30 \pm 2,26$	5	0,005
100	$30 \pm 18,44$	$- 86,19 \pm 8,46$	5	0,001

Legende zu Tabelle 4:

Die Tabelle enthält die aus fünf Versuchen errechneten arithmetischen Mittelwerte, sowohl in Anzahl/min als auch in Prozent, und deren Standardfehler, f wird hier als Schlagfrequenz/Minute angesehen.

Diagramm 1: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS 4 HCl am rechten Vorhof

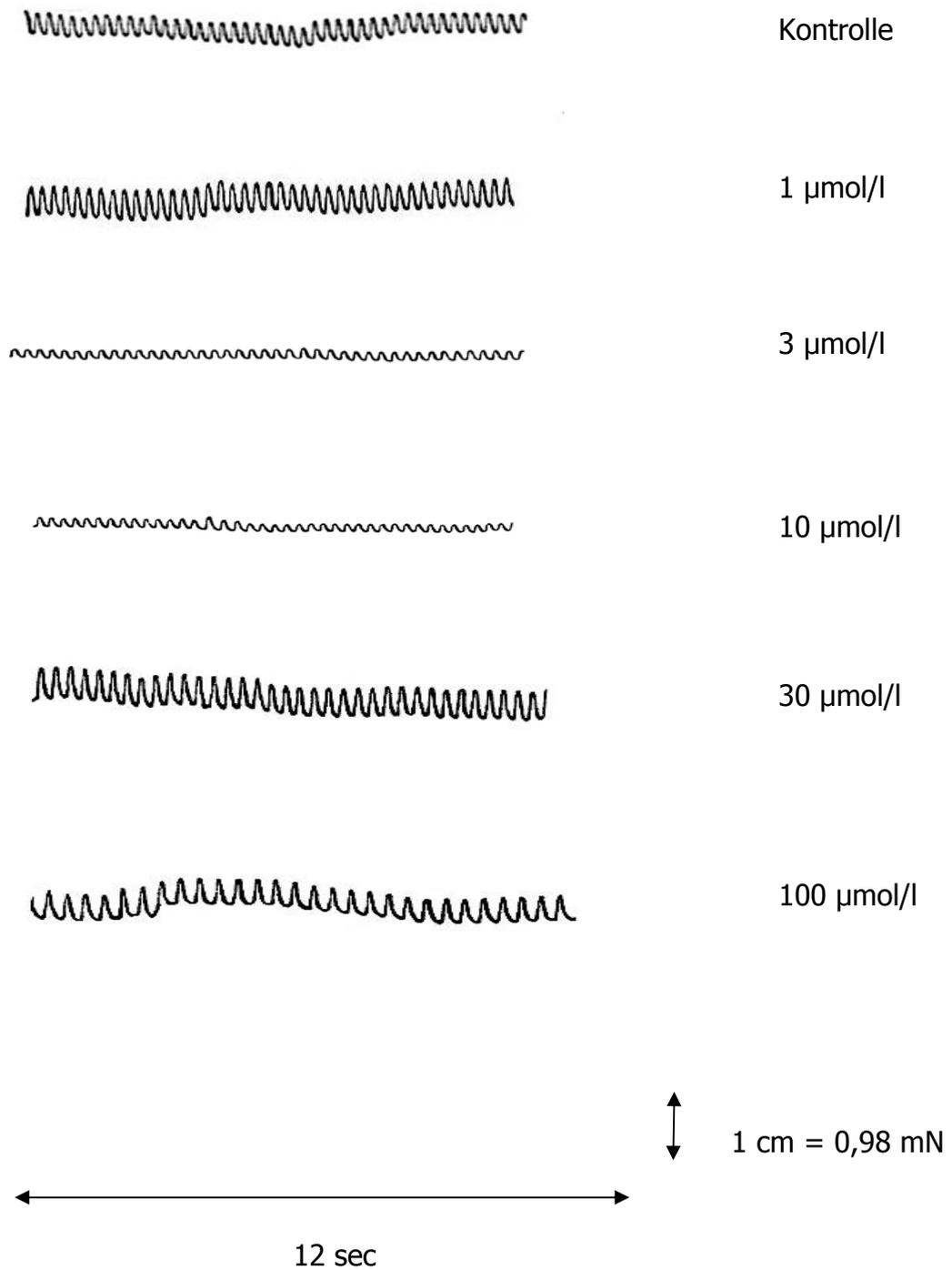


Legende zu Diagramm 1:

Die Kurve zeigt den Einfluss der Substanz SWS 4 HCl auf die Frequenz der Schläge und deren Abnahme. Die Abszisse zeigt die Konzentration des Wirkstoffes in µmol/l und die Ordinate stellt die Abnahme der Schlagfrequenz in Prozent dar.

Die Punkte symbolisieren die arithmetischen Mittelwerte und dessen Balken kennzeichnen ihre Standardfehler. Der EC₅₀ wird mittels strichlierter Linie von der 50 %igen Abnahme der Schlagfrequenz aus zur Kurve ermittelt.

Abbildung 20: Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS 4 HCl auf den rechten Vorhof



Legende zur Abbildung 20:

Die Originalabbildung zeigt die Abnahme der Schlagfrequenz eines rechten Vorhofes nach kumulativen Zugabe der Substanz SWS 4 HCl.

4.1.2. Wirkung von SWS 4 HCl auf den isolierten Papillarmuskel

Für die Untersuchung der Wirkung von SWS 4 HCl auf den Papillarmuskel wurden fünf Versuche durchgeführt. Nach Erreichen einer konstanten Kontraktionskraft des Muskels wurden die erforderlichen Mengen an Testsubstanz nach dem Pipettierschema hinzugefügt.

Der Wirkstoff SWS 4 HCl wies eine leicht negativ inotrope Wirkung auf, welche ab einer Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ signifikant war. Ein EC_{50} Wert konnte jedoch nicht erreicht werden. Nach der durch Zugabe von 1 μl erzielten Abnahme der Kontraktionskraft kam es durch neuerliches Erhöhen der Substanzkonzentration auf 3 $\mu\text{mol/l}$ zu einer weiteren Verringerung der Inotropie. Diese verlief aber anschließend nicht linear, sondern blieb zunächst bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ auf dem gleichen Niveau und stieg bei 30 $\mu\text{mol/l}$ sogar leicht an. Bei der abschließenden Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ nahm die Kontraktionskraft noch einmal deutlich ab und erreichte einen Wert von $-40,66 \pm 4,60$ % des Kontrollwertes.

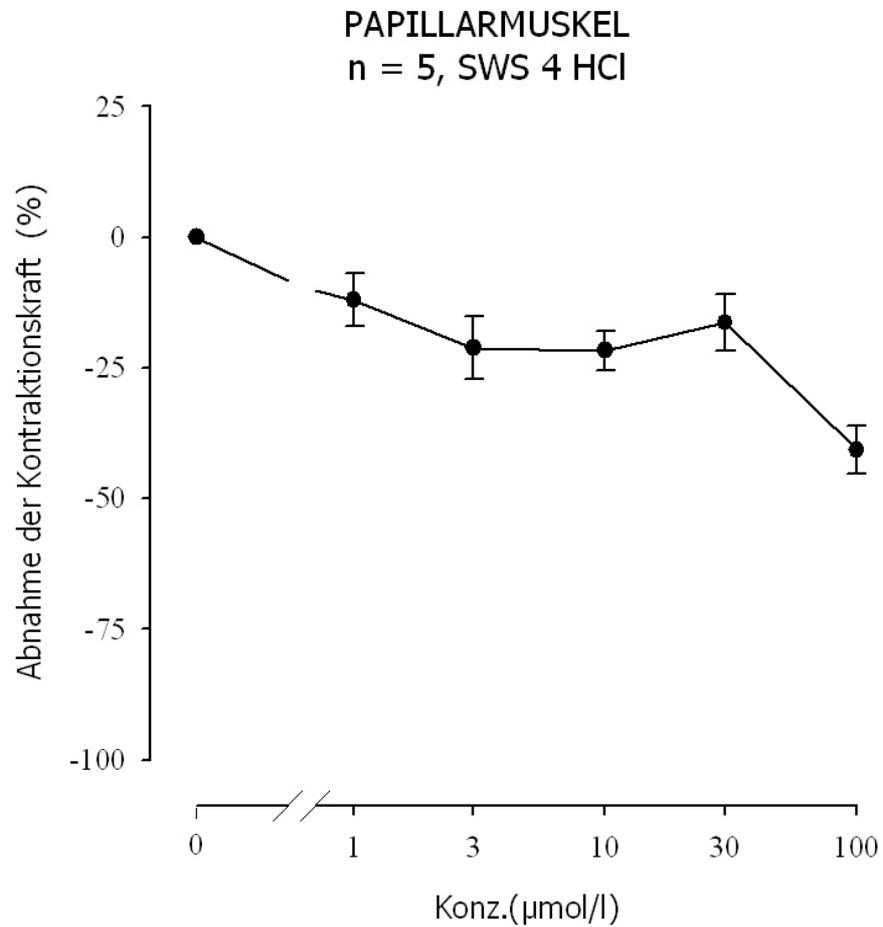
Tabelle 5: Wirkung von SWS 4 HCl auf den Musculus papillaris

SWS 4 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums-Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$2,07 \pm 0,69$	0 ± 0	5	-
1	$1,92 \pm 0,77$	$-11,99 \pm 5,03$	5	n.s.
3	$1,76 \pm 0,73$	$-21,15 \pm 5,93$	5	0,01
10	$1,71 \pm 0,65$	$-21,67 \pm 3,78$	5	0,001
30	$1,62 \pm 0,45$	$-16,35 \pm 5,42$	5	0,05
100	$1,26 \pm 0,43$	$-40,66 \pm 4,60$	5	0,001

Legende zu Tabelle 5:

Darstellung der arithmetischen Mittelwerte und ihre Standardfehler aus fünf Versuchen, wobei die Werte stets auf die Kontrollmessung bezogen werden.

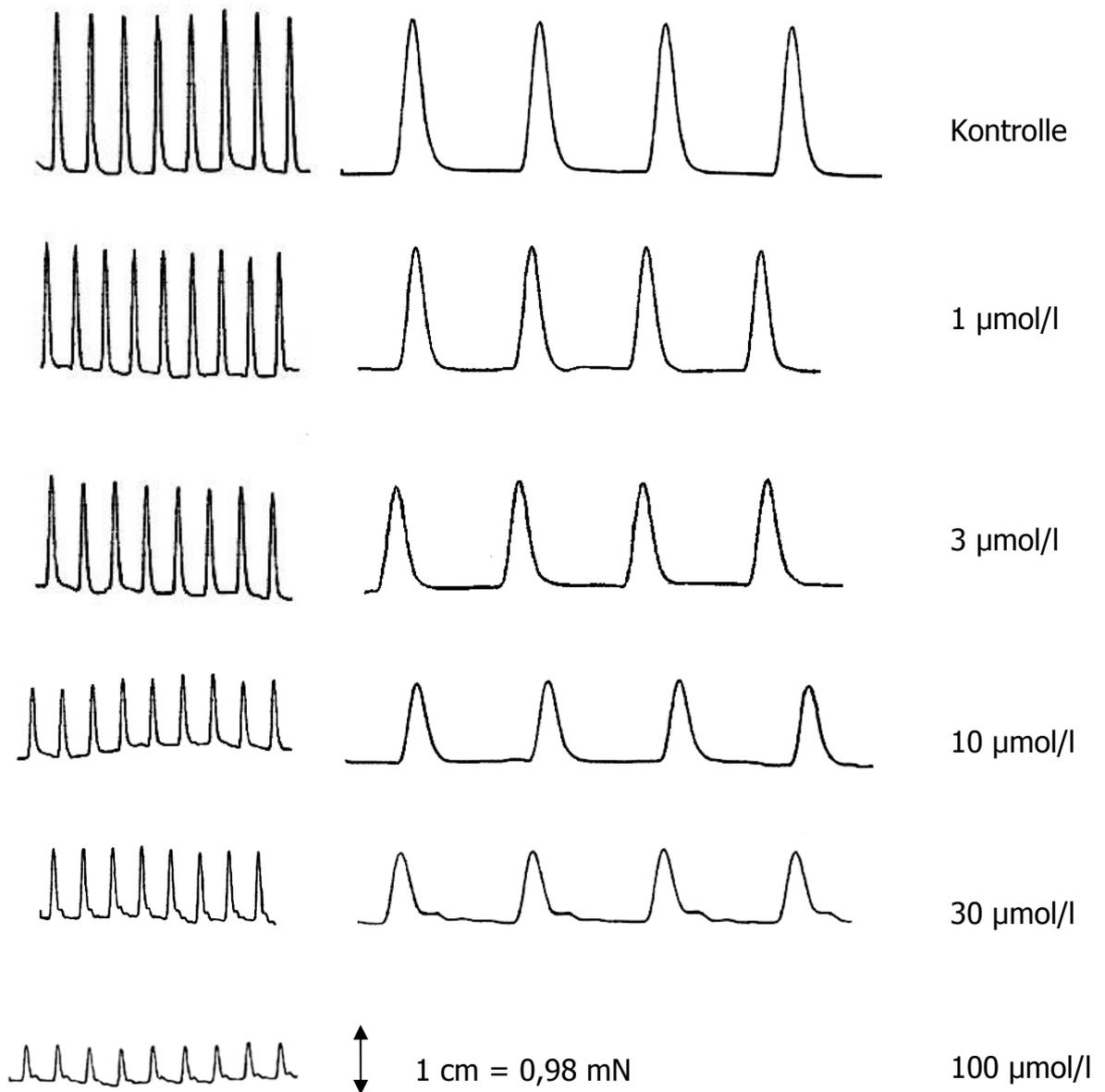
Diagramm 2: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS 4 HCl am Papillarmuskel



Legende zu Diagramm 2:

Der Effekt von SWS 4 HCl wird in dieser Konzentrations-Wirkungskurve verdeutlicht. Die x-Achse steht hier für die Konzentration der Substanz in µmol/l, wohingegen auf die y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent aufgetragen wurde.

Abbildung 21: Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS 4 HCl auf den Papillarmuskel



Legende zu Abbildung 21:

Die Originalabbildung des Versuches am Papillarmuskel zeigt die Verkleinerung der Amplitude durch kumulative Zugabe der Testsubstanz. Dies erfolgte in 45 Minuten Abständen in den Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 µmol/l.

4.1.3. Wirkung von SWS 4 HCl auf die Aorta

An der Aorta wurde in fünf Versuchen getestet, welchen bedeutenden Einfluss die Substanz SWS 4 HCl auf das Organ einnimmt. Die Durchführung war genauso wie in 3.6.1.4 angeführt. Der Kontrollwert lag bei $11,04 \pm 2,00$ mN und entsprach 0 %. Bei den Konzentrationen von 1 und 3 $\mu\text{mol/l}$ sah man noch keine deutliche Veränderung in Bezug auf die Kontraktionskraft. Erst ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ in den Organbädern kam es zu einer leichten dilatierenden Wirkung, die bei 30 $\mu\text{mol/l}$ bereits sehr deutlich ersichtlich war. Die maximale Vorkontraktion der Aorta durch eine 90 mmolare KCl-Lösung wurde bei 100 $\mu\text{mol/l}$ an SWS 4 HCl vollständig dilatiert. Ein EC_{50} Wert wurde bei einer Konzentration von 22,78 $\mu\text{mol/l}$ erreicht.

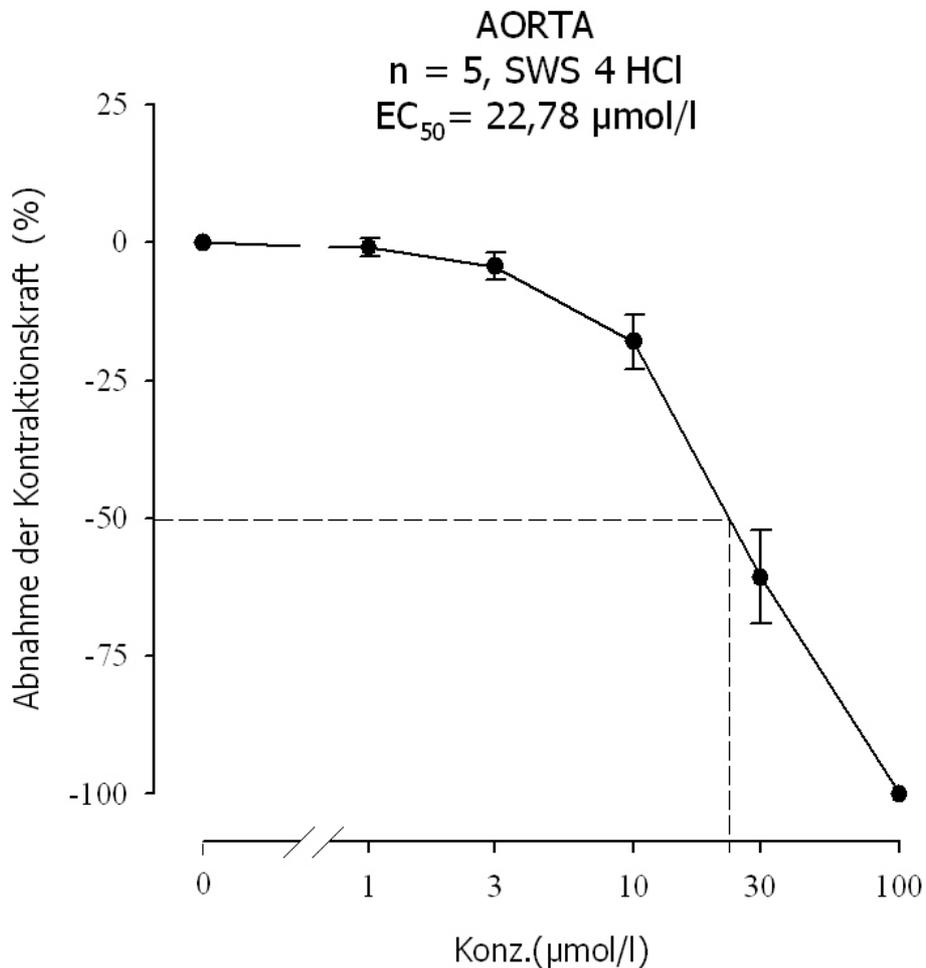
Tabelle 6: Wirkung von SWS 4 HCl auf die Aorta

SWS 4 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$11,04 \pm 2,00$	0 ± 0	5	-
1	$10,85 \pm 1,84$	$- 0,92 \pm 1,66$	5	n.s.
3	$10,43 \pm 1,73$	$- 4,29 \pm 2,39$	5	n.s.
10	$8,83 \pm 1,44$	$- 18,02 \pm 4,93$	5	0,01
30	$4,19 \pm 1,24$	$- 60,76 \pm 8,47$	5	0,001
100	0	- 100	5	0,001

Legende zu Tabelle 6:

In der Tabelle sind die durch fünf Versuche ermittelten arithmetischen Mittelwerte und Standardfehler ablesbar. f_c steht für die Kontraktionskraft und wird sowohl in mN als auch in Prozent angegeben.

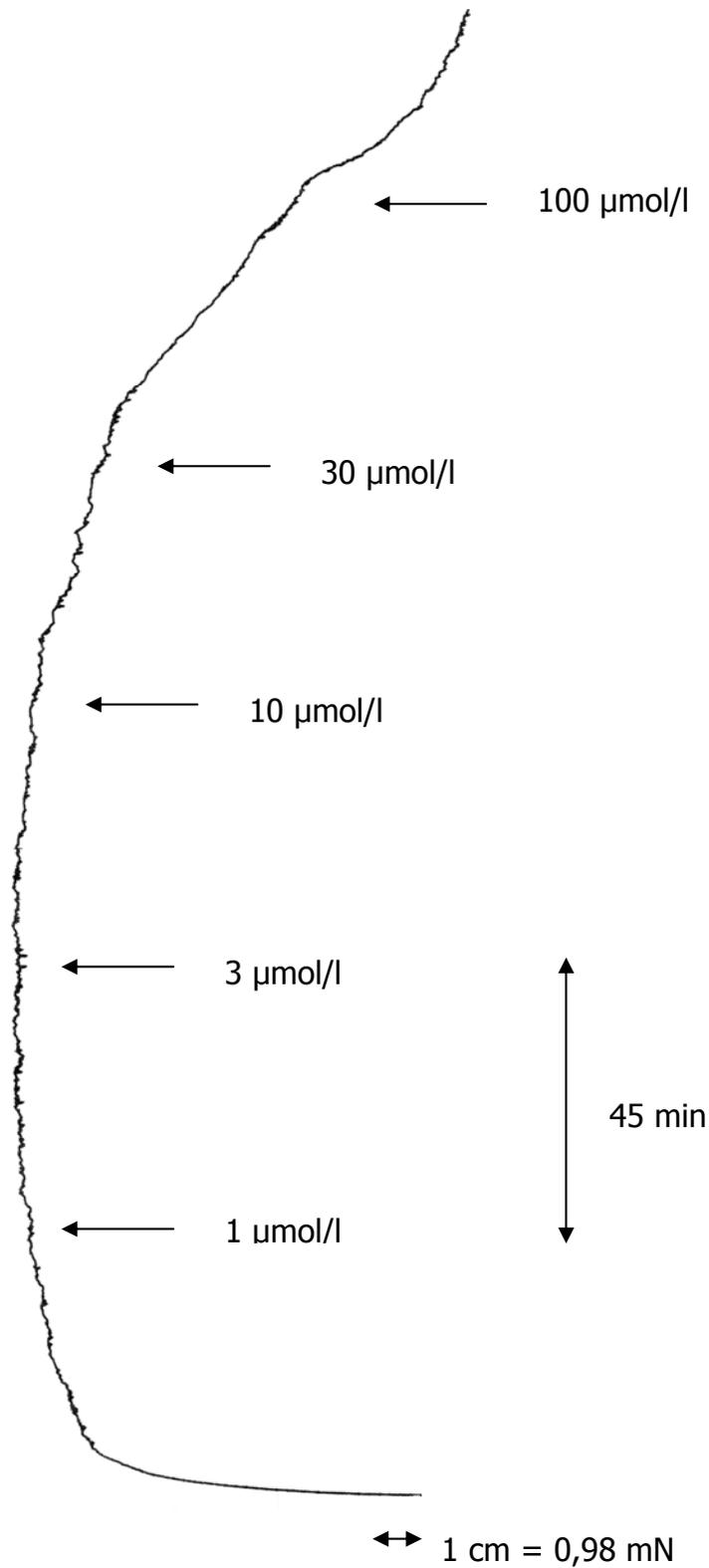
Diagramm 3: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS 4 HCl bei der Aorta



Legende zu Diagramm 3:

Die Abnahme der Kontraktionskraft mit steigender Konzentration ist in dieser Graphik sehr gut erkennbar. Die verschiedenen Konzentrationen in µmol/l sind auf der Abszisse aufgetragen und die dilatierende Wirkung auf das Organ ist über die Ordinate in Prozent angegeben. Der EC₅₀ Wert bei 22,78 µmol/l wird durch die strichlinierte Linie sichtbar.

Abbildung 22: Originalaufzeichnung der Wirkung der Testsubstanz auf die Aorta



Legende zu Abbildung 22:

Die Originalaufzeichnung zeigt die vasodilatierende Wirkung der Substanz auf die Aorta. Das Intervall der Konzentrationsänderung betrug 45 Minuten.

4.1.4. Wirkung von SWS 4 HCl auf die Arteria pulmonalis

Um eine Vasodilatation durch SWS 4 HCl auf die Arteria pulmonalis feststellen zu können, wurden fünf Präparate untersucht. Die Substanzzugabe erfolgte in den Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ alle fünfundvierzig Minuten. Der Kontrollwert wurde aus allen fünf Versuchen mit $13,78 \pm 2,15$ mN gemessen und galt als der 0%-Wert. Die Abnahme der Kontraktion an der Pulmonalis verlief ähnlich der der Aorta (4.1.3), wobei es zu keiner vollständigen Dilation bei 100 $\mu\text{mol/l}$ kam. Der EC_{50} Wert ist bei der Arteria pulmonalis ein wenig höher als bei der Aorta und liegt bei einer Konzentration von 25,06 $\mu\text{mol/l}$.

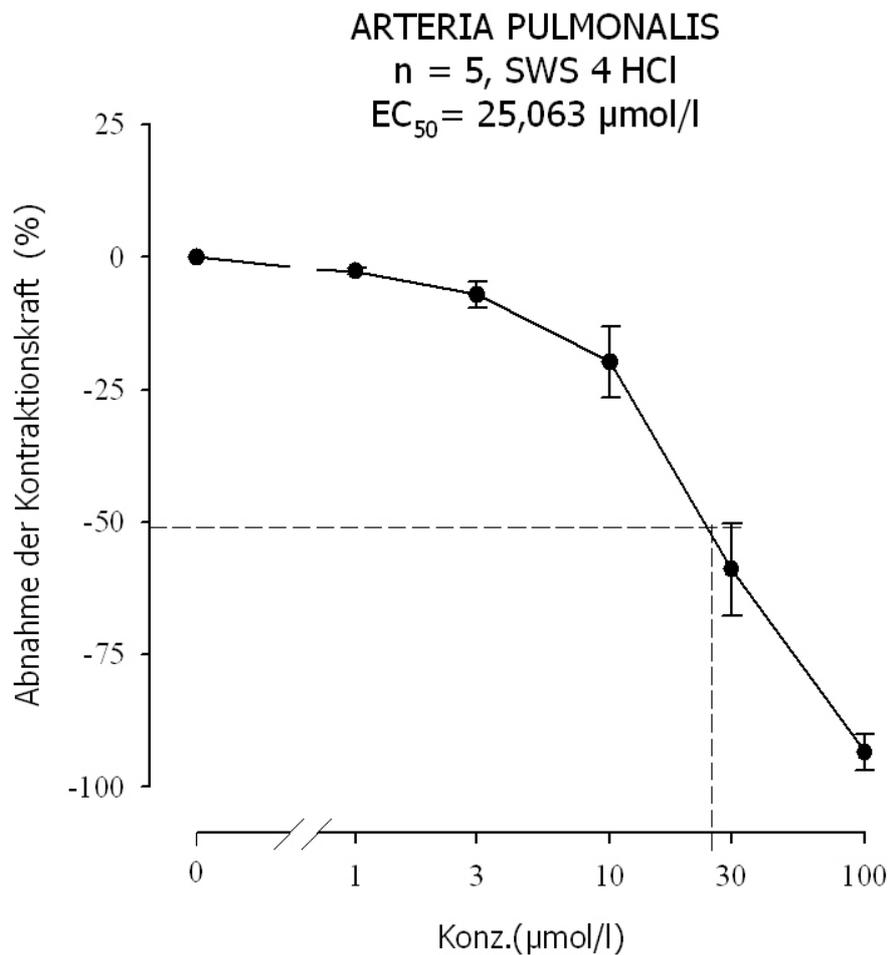
Tabelle 7: Wirkung von SWS 4 HCl auf die Pulmonalarterie

SWS 4 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$13,78 \pm 2,15$	0 ± 0	5	-
1	$13,44 \pm 2,14$	$- 2,67 \pm 0,59$	5	0,01
3	$12,91 \pm 2,15$	$- 7,10 \pm 2,51$	5	0,05
10	$11,33 \pm 2,20$	$- 19,74 \pm 6,71$	5	0,05
30	$6,01 \pm 1,74$	$- 58,94 \pm 8,79$	5	0,001
100	$1,11 \pm 0,59$	$- 93,38 \pm 3,47$	5	0,001

Legende zu Tabelle 7:

Arithmetische Mittelwerte der Änderung der Kontraktionskraft und deren Standardfehler (SEM) aus fünf Versuchen, jeweils in mN und Prozent angeführt.

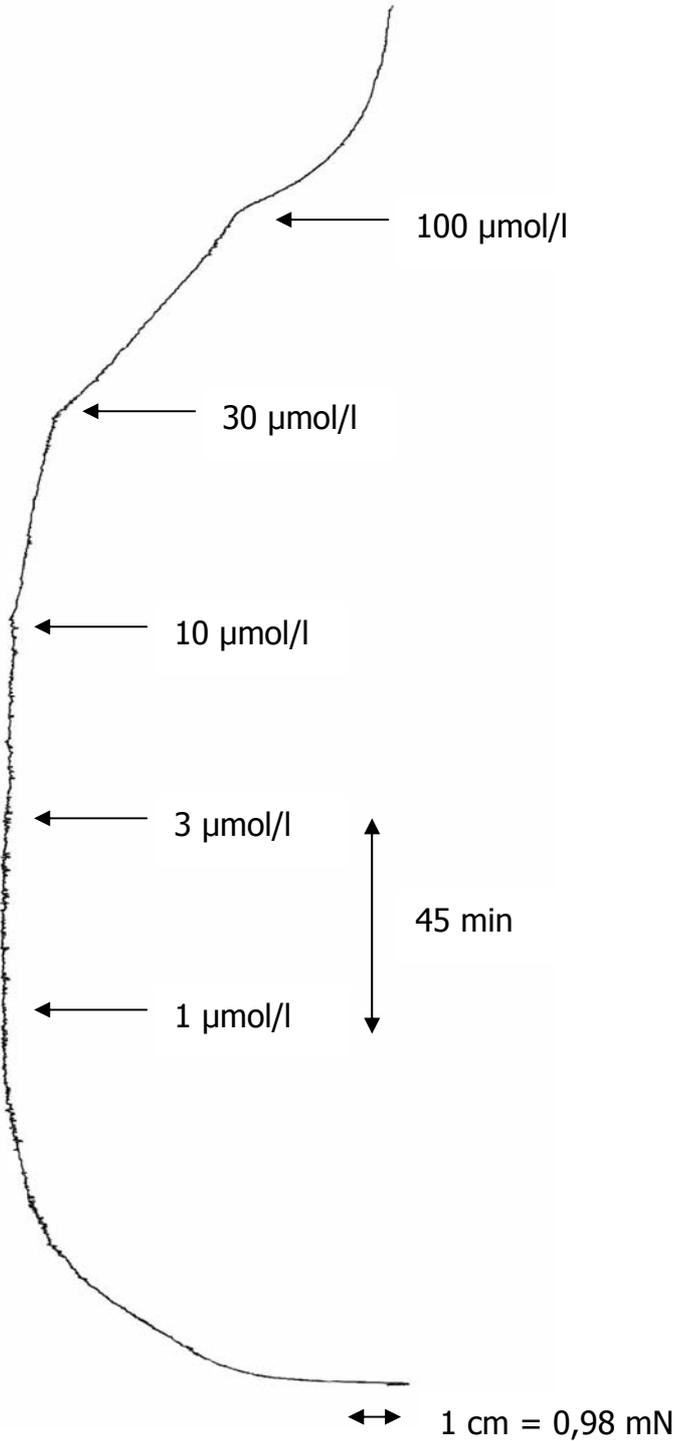
Diagramm 4: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS 4 HCl bei der Arteria pulmonalis



Legende zu Diagramm 4:

Die Konzentrations-Wirkungskurve zeigt den Effekt von SWS 4 HCl auf die Arteria pulmonalis. Dabei wurden die unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz auf die Abszisse und die Abnahme der Kontraktionskraft auf die Ordinate aufgetragen. Die Punkte symbolisieren die errechneten arithmetischen Mittelwerte und die Balken stellen deren Standardfehler dar.

Abbildung 23: Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS 4 HCl auf die Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 23:

Die Kurve des Detektors zeigt die vasodilatierende Wirkung von SWS 4 HCl auf die Arteria pulmonalis. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der Substanzzugabe.

4.1.5. Wirkung von SWS 4 HCl auf den Darm

Acht Versuchsabläufe wurden gemacht um die dilatierende Wirkung von SWS 4 HCl auf das terminale Ileum beurteilen zu können. Der Nullprozentwert ergab sich aus den Mittelwerten und lag bei $10,17 \pm 1,29$ mN.

Bei einer Konzentration von $1 \mu\text{mol/l}$ nahm die Kontraktion kaum merklich ab. Hingegen erzielte man bei $3 \mu\text{mol/l}$ bereits eine sichtbar anfangende Vasodilation, die ab $10 \mu\text{mol/l}$ stark zunahm und bei $100 \mu\text{mol/l}$ war nur mehr $- 85,00 \pm 4,56$ % des Kontrollwertes der Kontraktion zu verzeichnen. Der EC_{50} Wert liegt bei $25,59 \mu\text{mol/l}$.

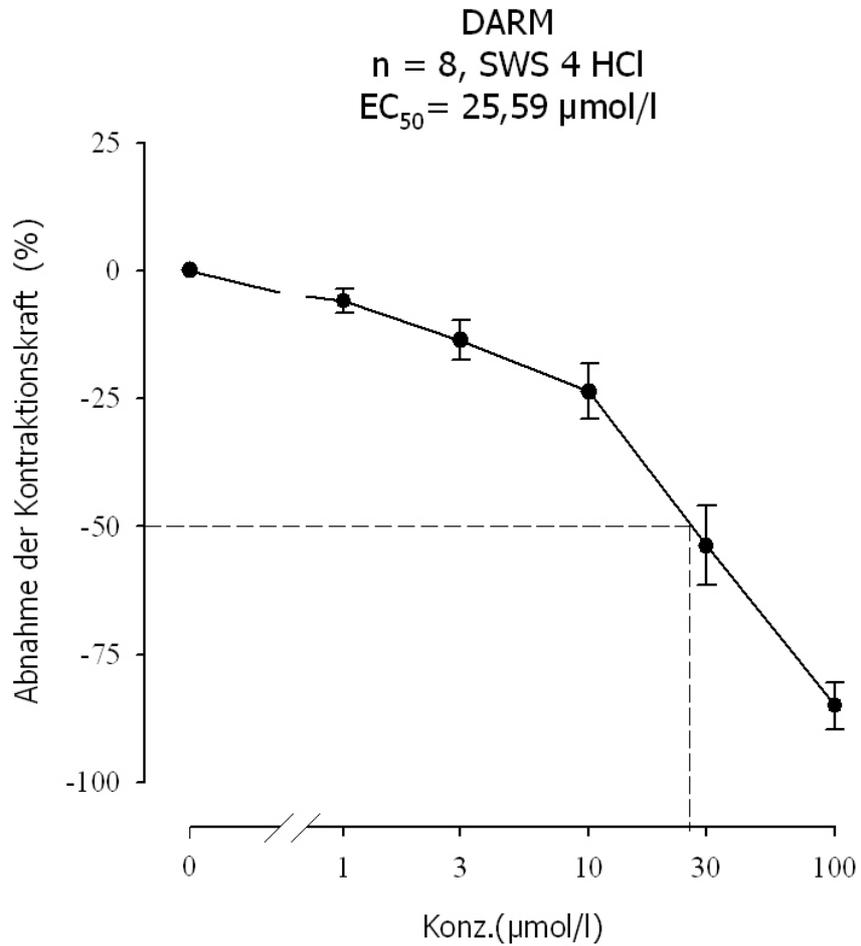
Tabelle 8: Wirkung von SWS 4 HCl auf das terminale Ileum

SWS 4 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$10,17 \pm 1,29$	0 ± 0	8	-
1	$9,58 \pm 1,22$	$- 5,97 \pm 2,29$	8	0,05
3	$8,84 \pm 1,22$	$- 13,61 \pm 3,87$	8	0,01
10	$7,89 \pm 1,19$	$- 23,65 \pm 5,37$	8	0,001
30	$4,97 \pm 1,07$	$-53,78 \pm 7,73$	8	0,001
100	$1,51 \pm 0,47$	$- 85,00 \pm 4,56$	8	0,001

Legende zu Tabelle 8:

Die Tabelle enthält die aus acht Versuchen ermittelten Mittelwerte und die dazugehörigen Standardfehler. Die Werte der verschiedenen Konzentrationen beziehen sich immer auf die Kontrolle und sind in mN und in Prozent angegeben.

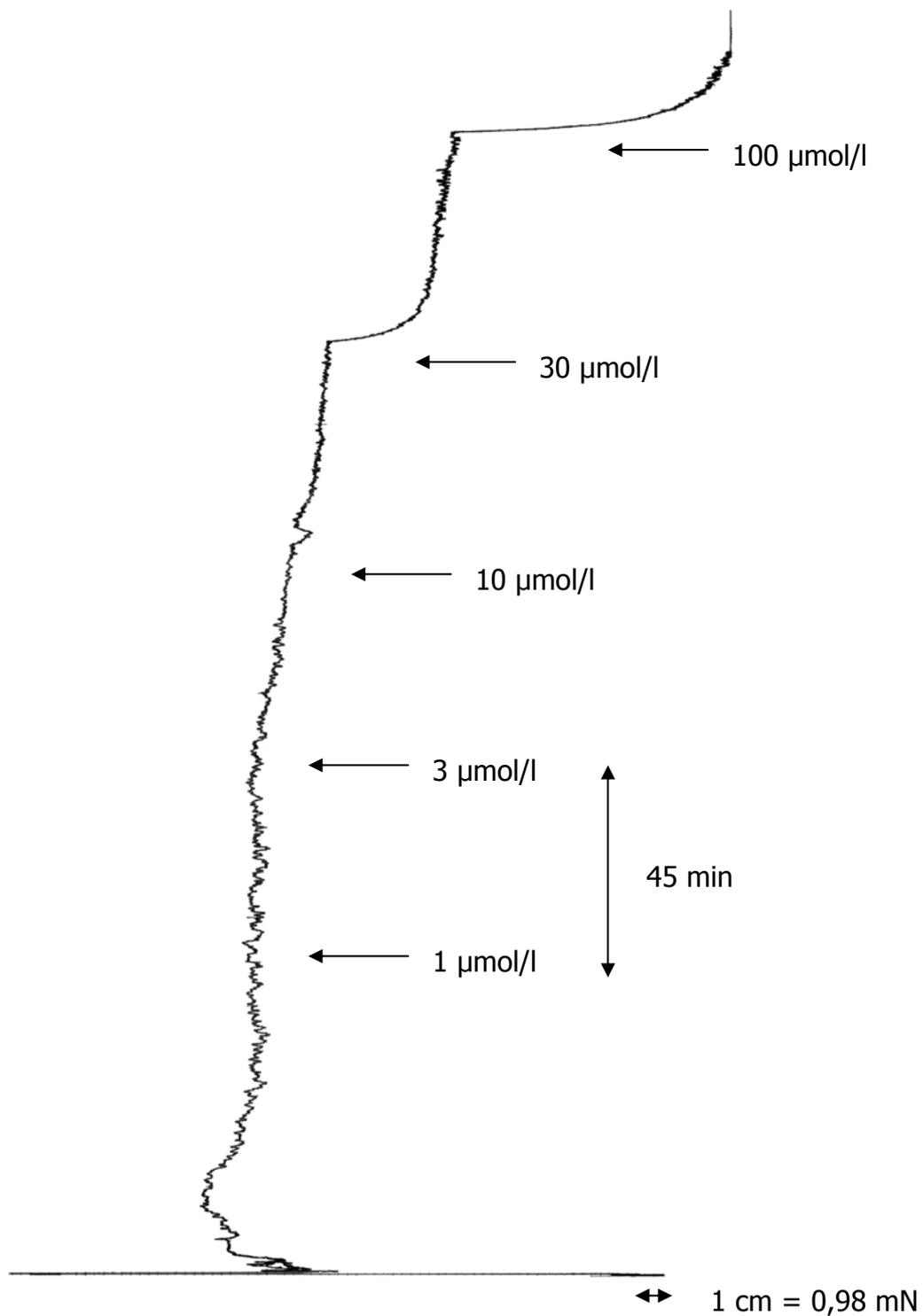
Diagramm 5: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS 4 HCl beim terminalen Ileum



Legende zu Diagramm 5:

Graphische Darstellung der Änderung der Kontraktionskraft auf das terminale Ileum nach kumulativer Zugabe der Testsubstanz. Die x-Achse stellt die Konzentrationen in µmol/l dar und die y-Achse zeigt die Kontraktionsabnahme in Prozent an.

Abbildung 24: Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS 4 HCl auf den Darm



Legende zur Abbildung 24:

Anhand der Originalaufzeichnung des Detektors wird die Vasodilatation ebenfalls sehr gut ersichtlich. Hier wird auch die unmittelbar nach der Zugabe starke Abnahme der Kontraktion bei der Konzentration von 30 und 100 µmol/l erkennbar. Durch die Pfeile werden die Positionen des Substanzeinspritzens markiert.

4.2. Ergebnisse der Testsubstanz WHG 72 T

4.2.1. Wirkung von WHG 72 T auf den Vorhof

Einem möglichen Einfluss der Substanz WHG 72 T auf das Atrium cordis dexter wurde durch fünf Versuche nachgegangen. Der Kontrollwert wurde durch Errechnung der Mittelwerte bei $195 \pm 16,81$ Schläge pro Minute festgesetzt. Nach intervallartiger Zugabe der Testsubstanz in den Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ wurde eine sehr schwache aber nicht signifikante Abnahme der Schlagfrequenz festgestellt. Für das Erreichen eines EC_{50} Wertes war die Wirkung von WHG 72 T viel zu gering.

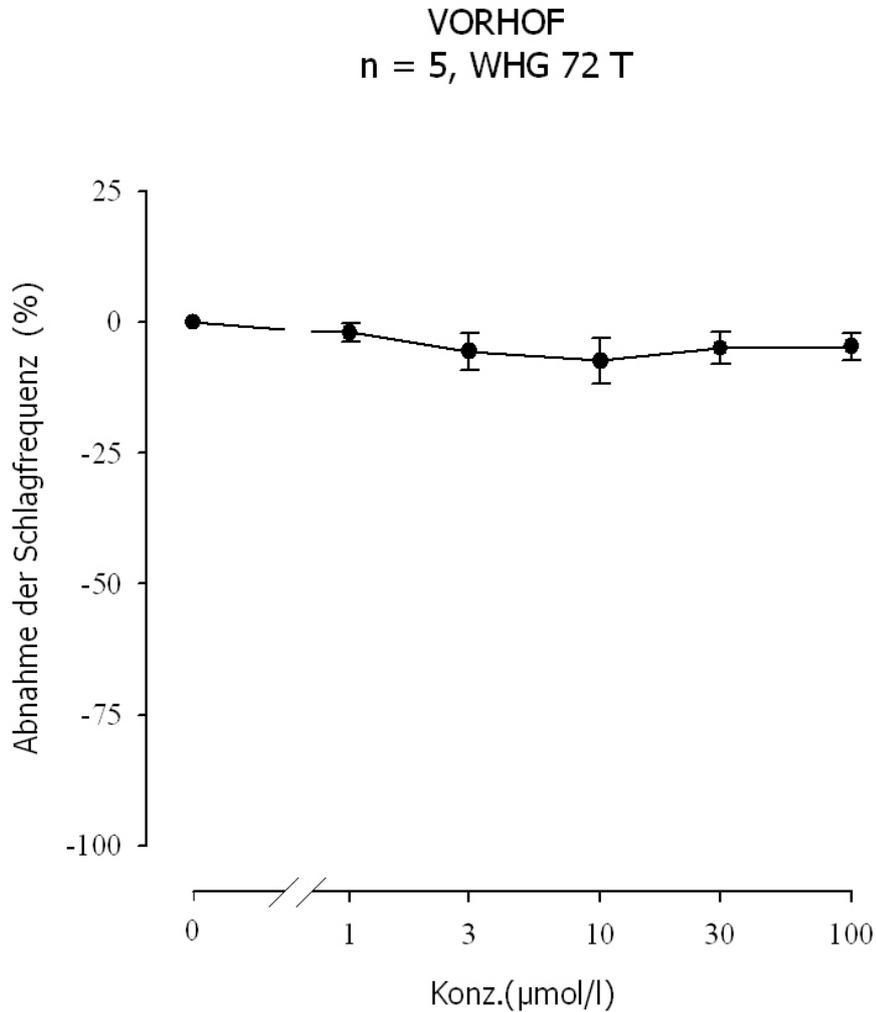
Tabelle 9: Wirkung von WHG 72 T auf das Atrium dexter

WHG 72 T ($\mu\text{mol/l}$)	$f \pm \text{SEM}$ (x/min)	$f \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$195 \pm 16,81$	0 ± 0	5	-
1	$192 \pm 18,75$	$- 1,95 \pm 1,72$	5	n.s.
3	$185 \pm 19,81$	$- 5,62 \pm 3,52$	5	n.s.
10	$183 \pm 21,71$	$- 7,09 \pm 4,34$	5	n.s.
30	$187 \pm 20,65$	$-4,94 \pm 3,01$	5	n.s.
100	$187 \pm 19,66$	$-4,67 \pm 2,65$	5	n.s.

Legende zur Tabelle 9:

Tabellarische Darstellung des arithmetischen Mittelwertes (f) der Schlagfrequenz in mN und in Prozent und deren Standardfehler.

Diagramm 6: Konzentrations-Wirkungskurve von WHG 72 T des Atrium dexter

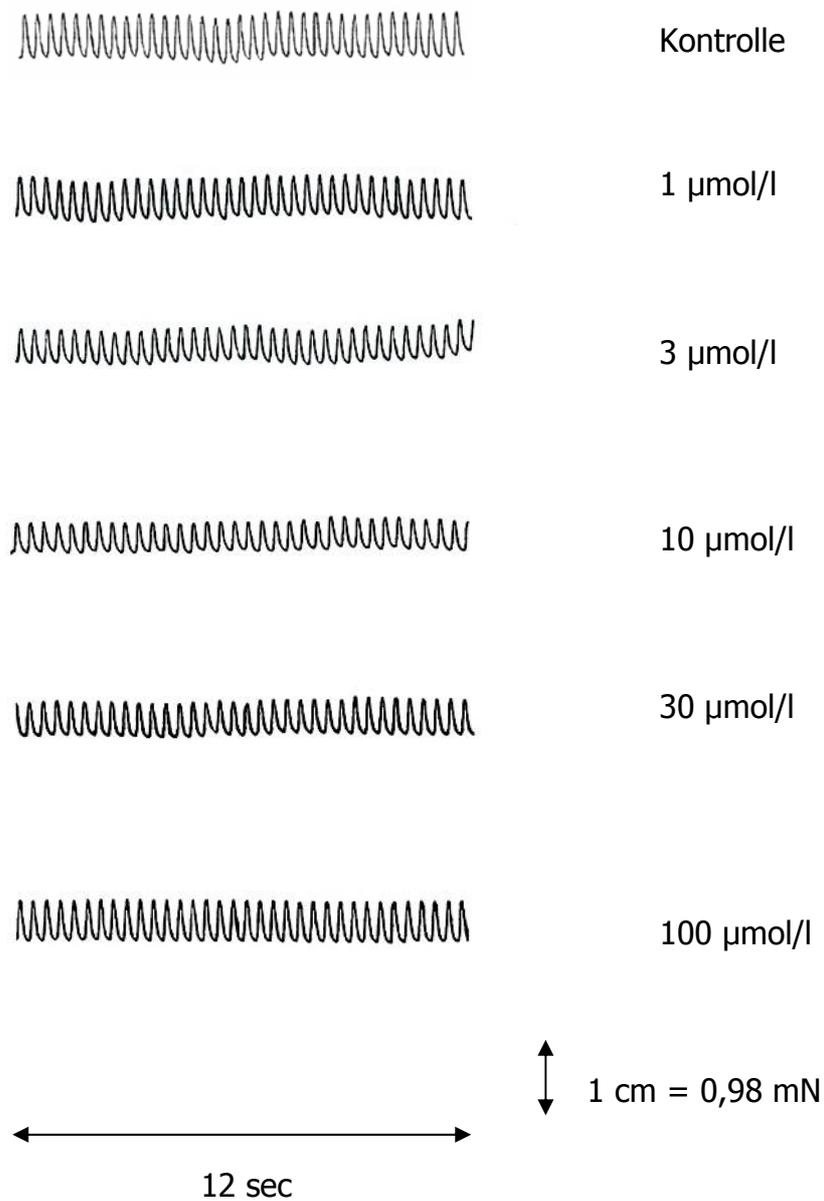


Legende zu Diagramm 6:

In dieser Abbildung wird der geringe Effekt von WHG 72 T auf die Schlagfrequenz verdeutlicht. Auf die Abszisse wird die Konzentration der Testsubstanz in µmol/l und auf die Ordinate die Abnahme der Chronotropie aufgetragen.

Die Punkte zeigen die errechneten Mittelwerte bei den jeweiligen Konzentrationen und durch die Balken wird deren Standardfehler angezeigt.

Abbildung 25: Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG 72 T auf den Atrium cordis dexter



Legende zur Abbildung 25:

Die Abbildung 25 zeigt die Aufzeichnung der Wirkung während der Versuche mit dem Schreiber. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.8.1 und 3.8.4 näher beschrieben.

4.2.2. Wirkung von WHG 72 T auf den Papillarmuskel

Um eine Wirkung der Substanz auf den Musculus papillaris nachweisen zu können, mussten fünf Versuche durchgeführt werden. Der Versuchsablauf erfolgte wie in 3.6.1.2 und aus den vorhandenen Versuchsergebnissen ergab sich $1,41 \pm 0,29$ mN als Kontrollwert. Von diesem ausgehend wurde die Veränderung der Kontraktionskraft auf den Papillarmuskel errechnet. Bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ war eine leichte Abnahme der Amplitude feststellbar, die bei 3 $\mu\text{mol/l}$ noch kleiner wurde und aber bei 10 $\mu\text{mol/l}$ wieder nahezu auf dem Wert der Kontraktionskraft wie bei 1 $\mu\text{mol/l}$ angelangte. Bei 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ erreichte man sogar wieder die Kontraktionskraft der Kontrolle. Ein EC_{50} Wert wurde somit nicht erreicht.

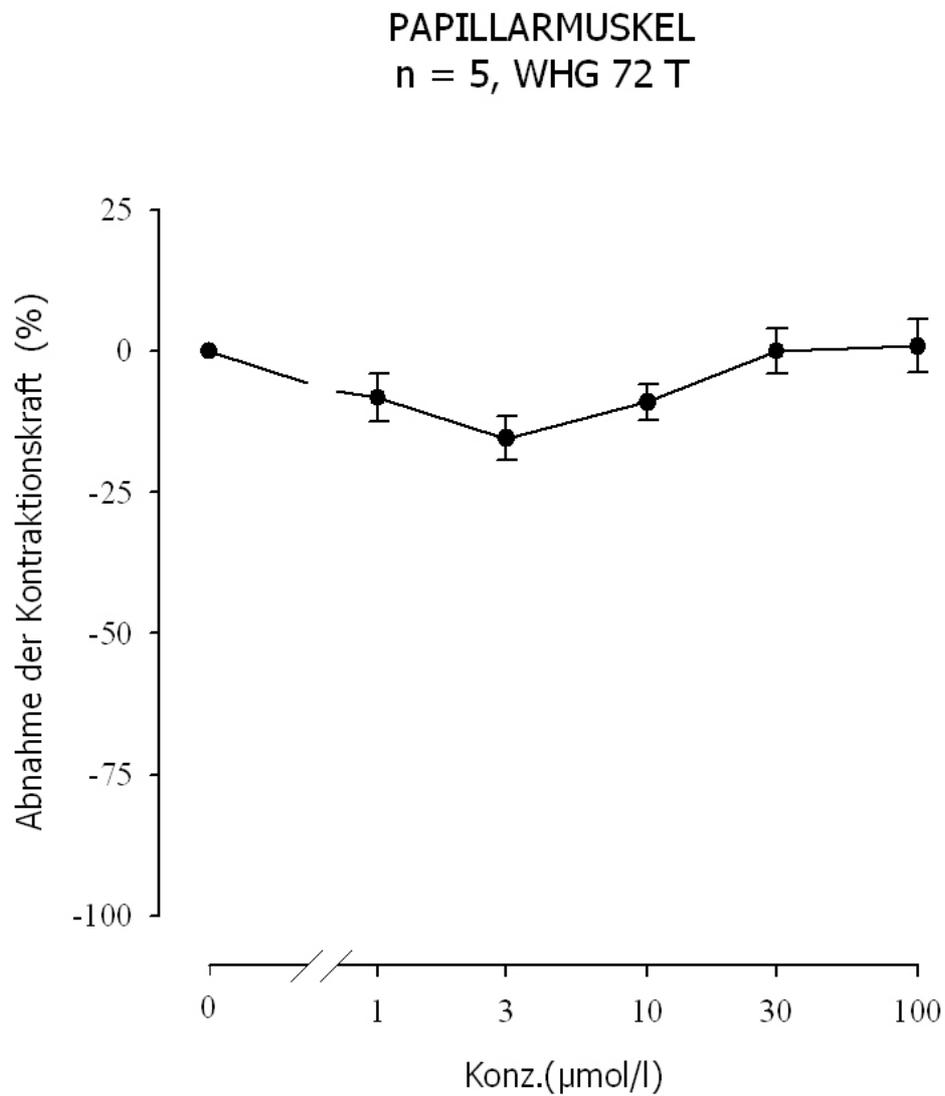
Tabelle 10: Wirkung von WHG 72 T auf den Musculus papillaris

WHG 72 T ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$1,41 \pm 0,29$	0 ± 0	5	-
1	$1,26 \pm 0,20$	$- 8,24 \pm 4,33$	5	n.s.
3	$1,16 \pm 0,18$	$- 15,42 \pm 3,92$	5	0,01
10	$1,28 \pm 0,24$	$- 8,94 \pm 3,15$	5	0,05
30	$1,41 \pm 0,30$	$- 0,02 \pm 3,99$	5	n.s.
100	$1,44 \pm 0,33$	$0,88 \pm 4,68$	5	n.s.

Legende zu Tabelle 10:

Arithmetischer Mittelwert und deren Standardfehler tabellarisch dargestellt, errechnet aus fünf Versuchen. Die Werte werden einerseits in mN, andererseits in Prozent angegeben.

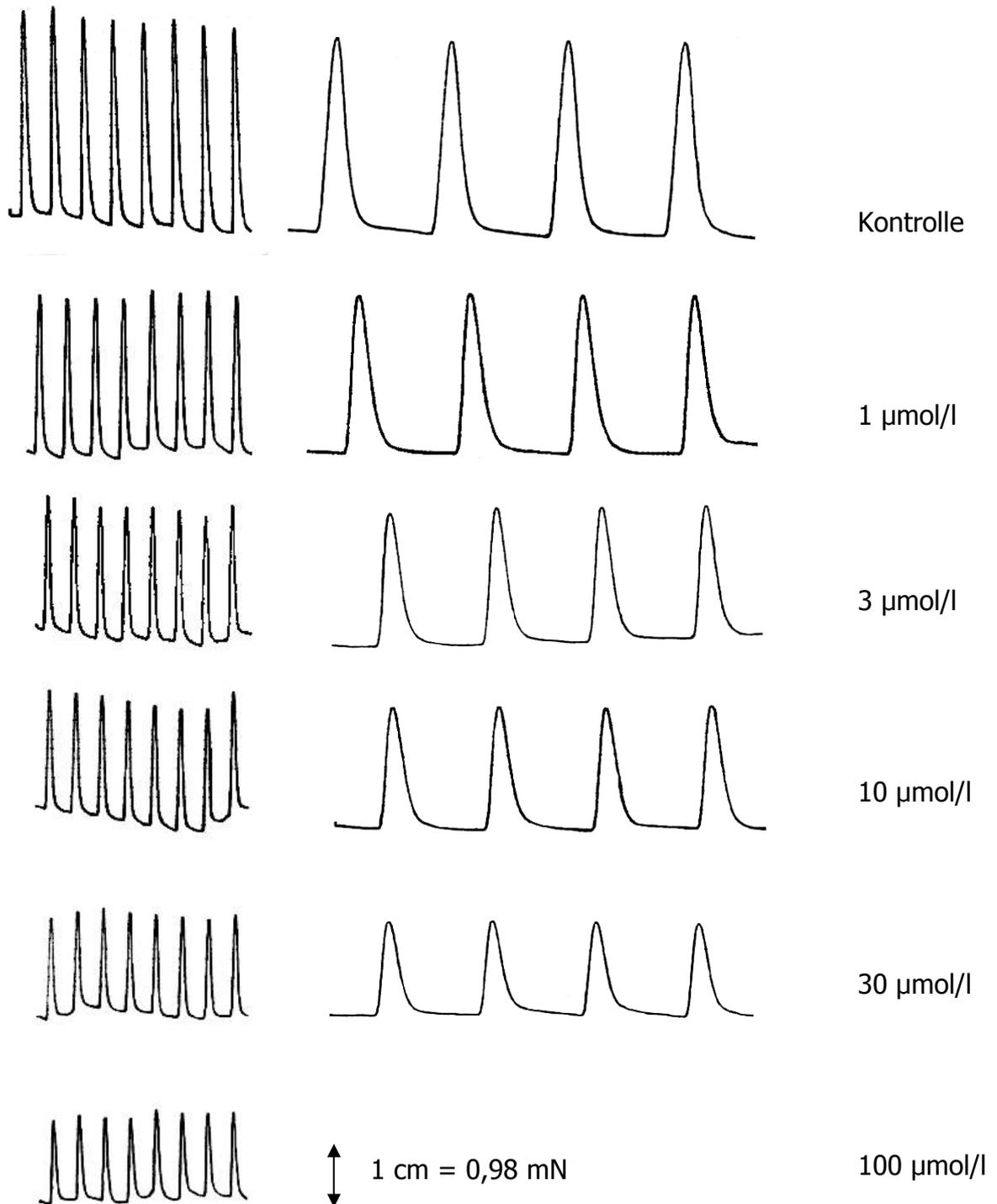
Diagramm 7: Konzentrations-Wirkungskurve von WHG 72 T beim Papillarmuskel



Legende zu Diagramm 7:

Der Effekt von WHG 7 T wird hier in einer Konzentrations-Wirkungskurve verbildlicht. Die x-Achse steht für die Konzentrationen von der Substanz und die y-Achse zeigt die Abnahme der Kontraktionskraft.

Abbildung 26: Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG 72 T beim Musculus papillaris



Legende zu Abbildung 26:

Originalaufzeichnung des Schreibers der Wirkung von WHG 72 T auf den Papillarmuskel.

4.2.3. Wirkung von WHG 72 T auf die Aorta

Nach erfolgreicher Durchführung der Versuche und anschließender Auswertung der Werte kam man zu dem Ergebnis, dass WHG 72 T bis zu einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ eine statistisch nicht signifikante Wirkung auf die Aortapräparate aufweist. Es kam zwar zu einer kontinuierlichen Abnahme der Kontraktion der Aorta durch steigende Konzentration des Wirkstoffes, aber ein EC_{50} Wert wurde nicht erreicht. Aus den fünf durchgeführten Versuchen erhielt man einen Kontrollwert von $7,71 \pm 0,82$ mN. Von dem ausgehend wurde die Wirkung der Testsubstanz auf das Organ errechnet.

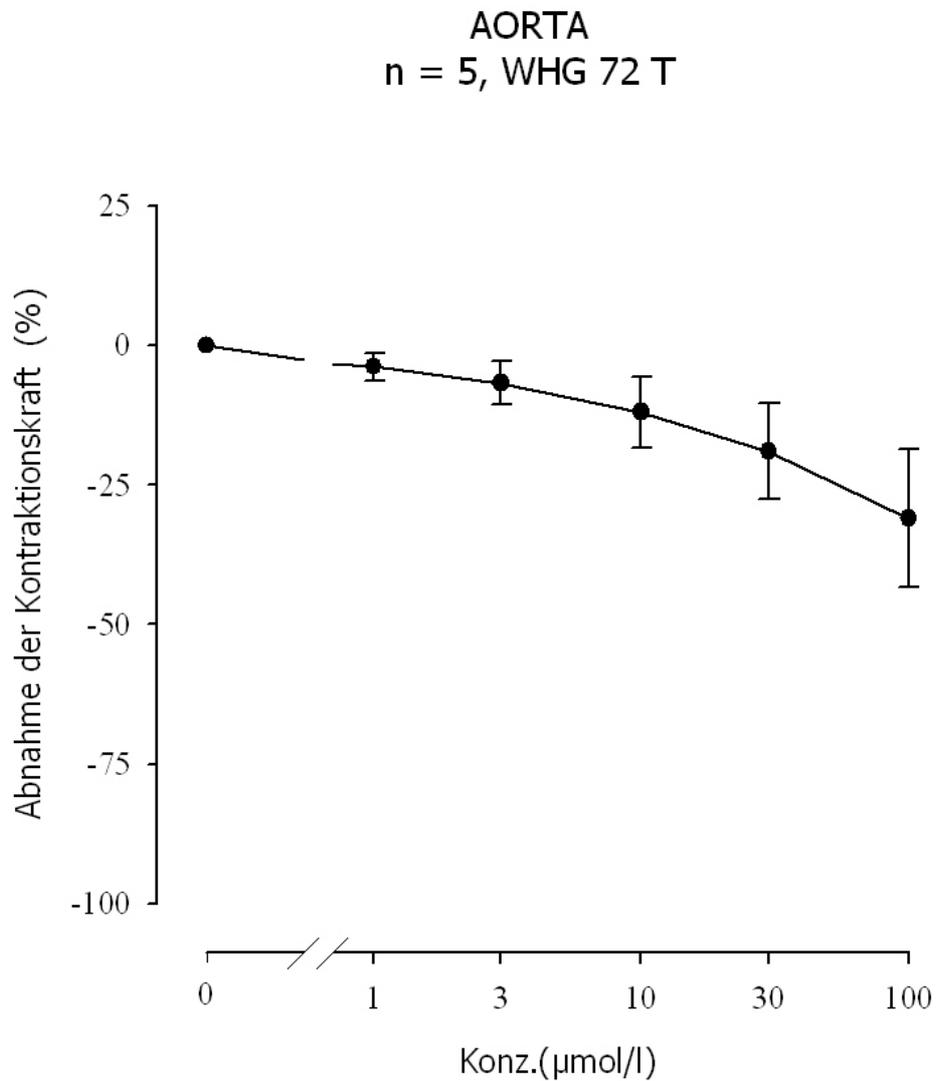
Tabelle 11: Wirkung von WHG 72 T auf Aorta

WHG 72 T ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$7,71 \pm 0,82$	0 ± 0	5	-
1	$7,37 \pm 0,66$	$- 3,80 \pm 2,51$	5	n.s.
3	$7,21 \pm 0,78$	$- 6,72 \pm 3,86$	5	n.s.
10	$6,84 \pm 0,85$	$- 11,91 \pm 6,33$	5	n.s.
30	$6,30 \pm 0,89$	$- 18,94 \pm 8,66$	5	n.s.
100	$5,39 \pm 1,05$	$- 31,00 \pm 12,36$	5	0,05

Legende zur Tabelle 11:

Tabellarische Darstellung der arithmetischen Mittelwerte und deren Standardabweichung, sowohl in mN als auch in Prozent angegeben.

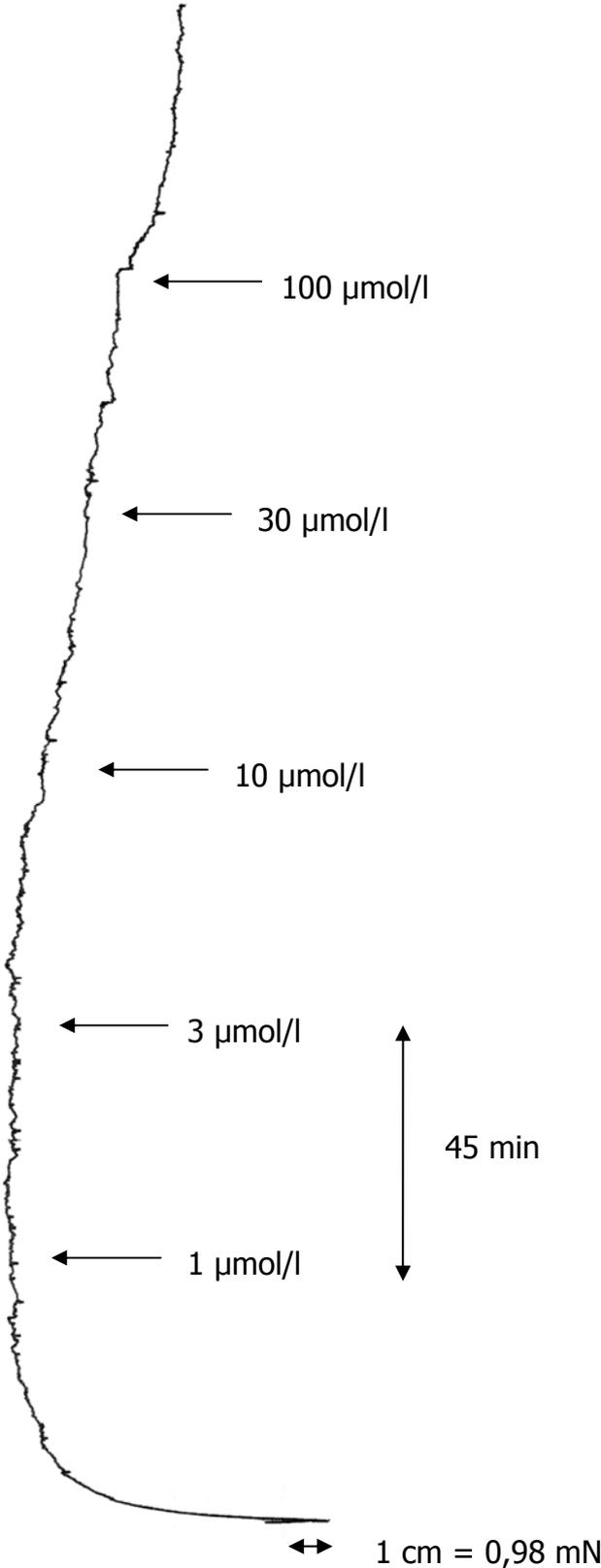
Diagramm 8: Konzentrations-Wirkungskurve von WHG 72 T an der Aorta



Legende zu Diagramm 8:

In dieser Abbildung werden die Mittelwerte als Punkte und somit die Wirkung von WHG 72 T dargestellt. Die Balken symbolisieren die Standardfehler. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von WHG 72 T in µmol/l und auf der y-Achse wurde die Abnahme der Kontraktion in Prozent aufgetragen.

Abbildung 27: Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG 72 T auf die Aorta



Legende zu Abbildung 27:

Originalzeichnung von der Auswirkung der Testsubstanz WHG 72 T auf die Aorta.

4.2.4. Wirkung von WHG 72 T auf die Arteria pulmonalis

Aus vier Versuchen mit der Testsubstanz konnte eine Wirkung auf die Pulmonalarterie ausgeschlossen werden. Nach kumulativer Zugabe des Wirkstoffes war sogar bei der höchsten Konzentration keine Abnahme der Kontraktion zu verzeichnen. Aus den Mittelwerten der Versuche wurde ein Kontrollwert von $15,93 \pm 2,53$ mN errechnet.

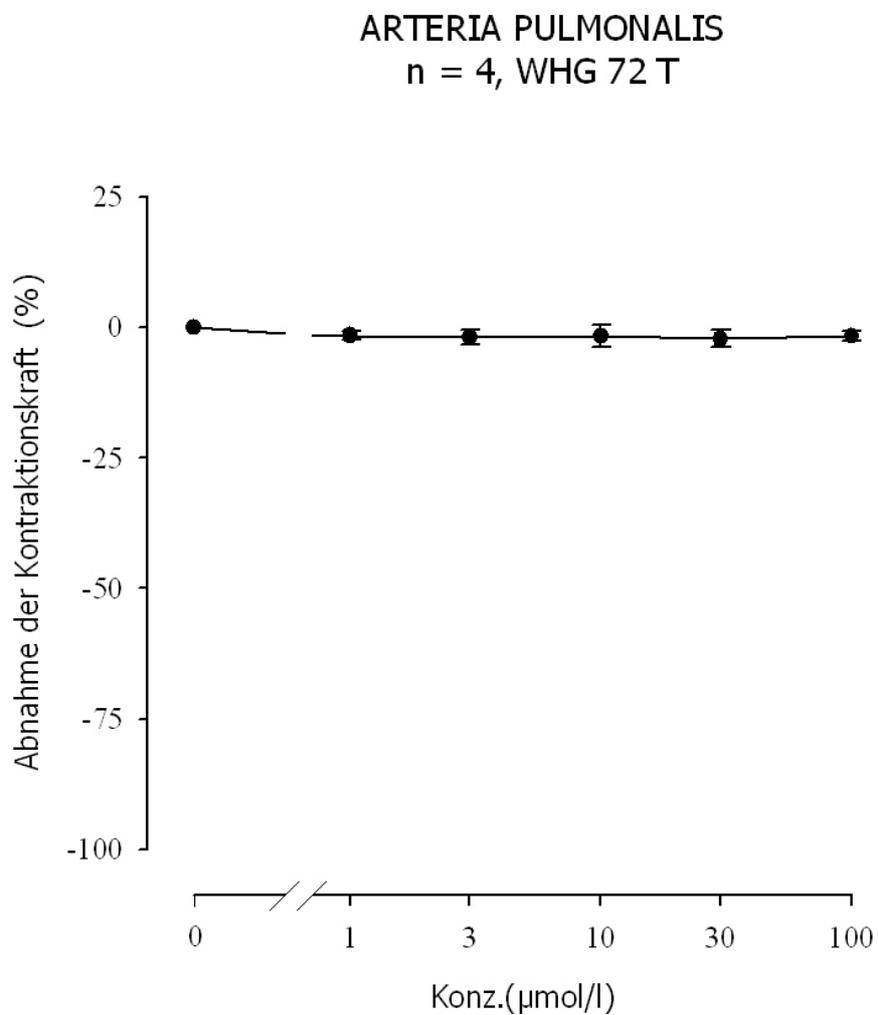
Tabelle 12: Wirkung von WHG 72 T auf die Pulmonalarterie

WHG 72 T ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$15,93 \pm 2,53$	0 ± 0	4	-
1	$15,64 \pm 2,40$	$- 1,55 \pm 0,82$	4	n.s.
3	$15,53 \pm 2,26$	$- 1,85 \pm 1,41$	4	n.s.
10	$15,55 \pm 2,27$	$- 1,65 \pm 2,20$	4	n.s.
30	$15,49 \pm 2,30$	$- 2,17 \pm 1,61$	4	n.s.
100	$15,60 \pm 2,33$	$- 1,65 \pm 0,87$	4	n.s.

Legende zu Tabelle 12:

Die Tabelle 12 zeigt die Auswirkung von WHG 72 T auf die Arteria pulmonalis. Die Mittelwerte aus vier Versuchen werden in mN und in Prozent angegeben einschließlich ihrer Standardfehler.

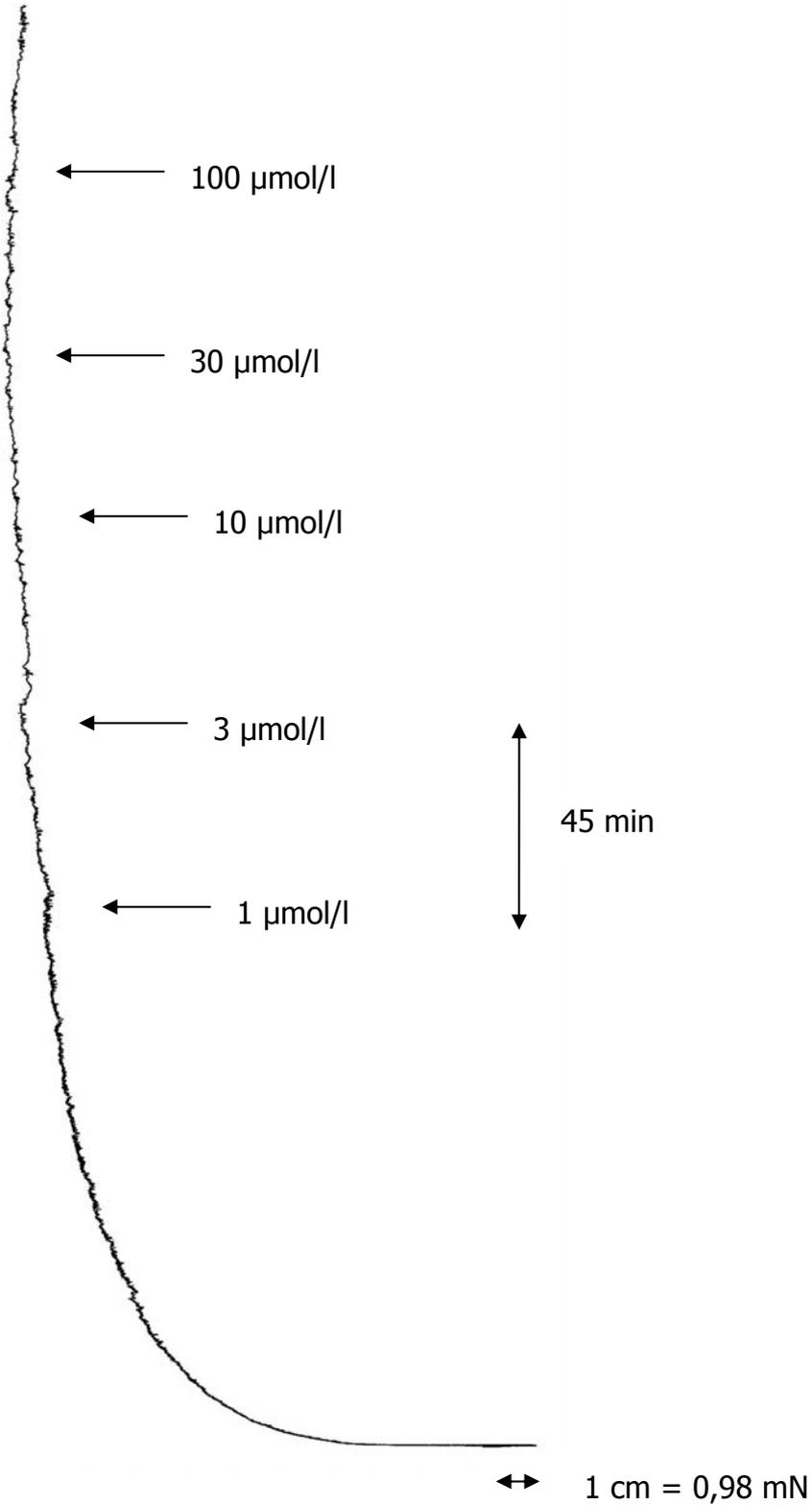
Diagramm 9: Konzentrations-Wirkungskurve von WHG 72 T bei der Arteria pulmonalis



Legende zu Diagramm 9:

Diagramm 9 zeigt die nicht vorhandene Dilatation der Pulmonalarterie durch den Wirkstoff WHG 72 T. Die Kontraktion des Organs bleibt während der steigenden Wirkstoffkonzentration nahezu vollständig auf demselben Wert.

Abbildung 28: Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG 72 T auf die Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 28:
Originalaufzeichnung des Einflusses von WHG 72 T auf die Arteria pulmonalis.

4.2.5. Wirkung von WHG 72 T auf den Darm

Um die Dilatation des terminalen Ileums feststellen zu können wurden sechs Versuche durchgeführt, wodurch man einen EC_{50} Wert von $20,458 \mu\text{mol/l}$ erhielt. Der Nullprozentwert lag bei $7,02 \pm 0,38 \text{ mN}$. Bei einer Konzentration von 1 und $3 \mu\text{mol/l}$ konnte man eine Abnahme der Kontraktion von 10 bis 20% verzeichnen, die ab einer Konzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ noch deutlicher sichtbar war. Bei der endgültigen Maximalkonzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ war nur mehr $-87,95 \pm 6,77 \%$ der Ausgangskontraktion übrig. Somit konnte eine nicht unwesentliche Wirkung auf den Darm festgestellt werden.

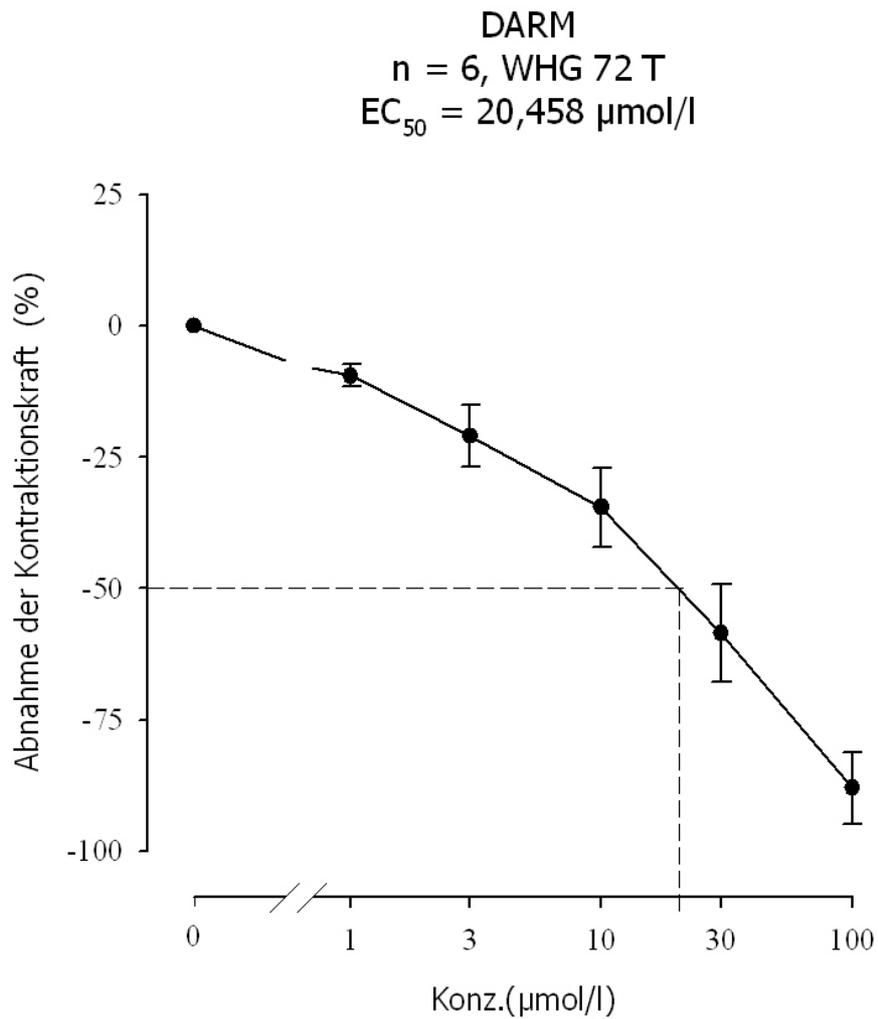
Tabelle 13: Wirkung von WHG 72 T auf das terminale Ileum

WHG 72 T ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$7,02 \pm 0,38$	0 ± 0	6	-
1	$6,33 \pm 0,42$	$- 9,50 \pm 2,15$	6	0,01
3	$5,60 \pm 0,56$	$- 20,96 \pm 5,80$	6	0,01
10	$4,63 \pm 0,61$	$- 34,56 \pm 7,44$	6	0,001
30	$2,93 \pm 0,69$	$- 58,49 \pm 9,38$	6	0,001
100	$0,86 \pm 0,48$	$- 87,95 \pm 6,77$	6	0,001

Legende zu Abbildung 13:

In dieser Abbildung werden die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardfehler in mN und in Prozent angeführt. f_c steht für die Kontraktionskraft und SEM für den Standardfehler.

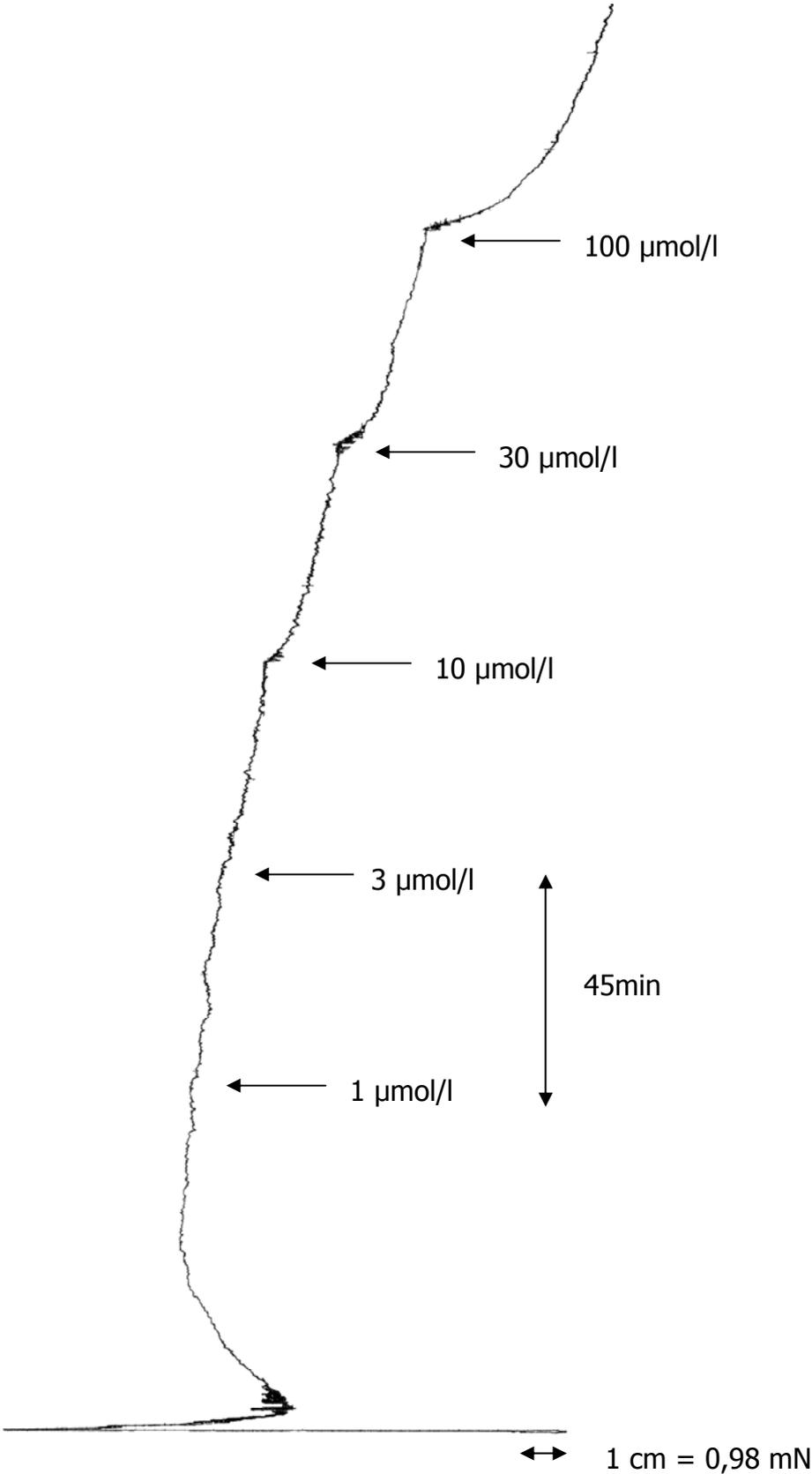
Diagramm 10: Konzentrations-Wirkungskurve von WHG 72 T beim terminalem Ileum



Legende zu Diagramm 10:

Die Konzentrations-Wirkungskurve verdeutlicht die Wirkung von WHG 72 T auf das terminale Ileum. Der EC₅₀ Wert wird durch die strichlinierte Linie symbolisiert.

Abbildung 29: Originalaufzeichnung der Wirkung von WHG 72 T auf den Darm



Legende zu Abbildung 29:

Originalaufzeichnung des Schreibers von der Wirkung der Testsubstanz.

4.3. Untersuchung des Wirkungsmechanismus von SWS 4 HCl auf die Aorta

Um die Wirkung der getesteten Substanz auf die Aorta besser beurteilen zu können, wurden in weiterer Folge einige Versuche mit drei verschiedenen Agonisten durchgeführt. Hierzu kamen die Agonisten Nitro-L-Arginin, Glibenclamid und Phenylephrin zum Einsatz.

4.3.1. Wirkung von SWS 4 HCl in Kombination mit Nitro-L-Arginin auf die Aorta

Der Versuch mit Nitro-L-Arginin wurde wie in Kapitel 3.6.1 durchgeführt. Durch Zugabe der Kaliumchloridlösung wurde ein Erreichen der maximalen Kontraktionskraft ermöglicht und die Kontrollphase betrug $10,09 \pm 2,07$ mN. In einem Abstand von fünfundvierzig Minuten wurde zuerst 100 µl Nitro-L-Arginin und dann die Substanz SWS 4 HCl in einer Konzentration von 25 µmol/l zugesetzt. Bei der Konzentration von 100 µmol/l an Nitro-L-Arginin im Organbad wurde eine leichte Zunahme der Kontraktionskraft ($10,44 \pm 2,20$ mN) ersichtlich, die sich allerdings nicht als signifikant erwies. Ab dem Zeitpunkt der Substanzzugabe konnte man jedoch eine deutliche Abnahme der Kontraktionskraft des Organs verzeichnen, und zwar auf einen Wert von $7,80 \pm 2,42$ mN. Der kombinierte Versuch mit Nitro-L-Arginin sollte Aufschluss darüber geben, ob die vasodilatierende Wirkung von SWS 4 HCl über das NO-System erzielt wurde.

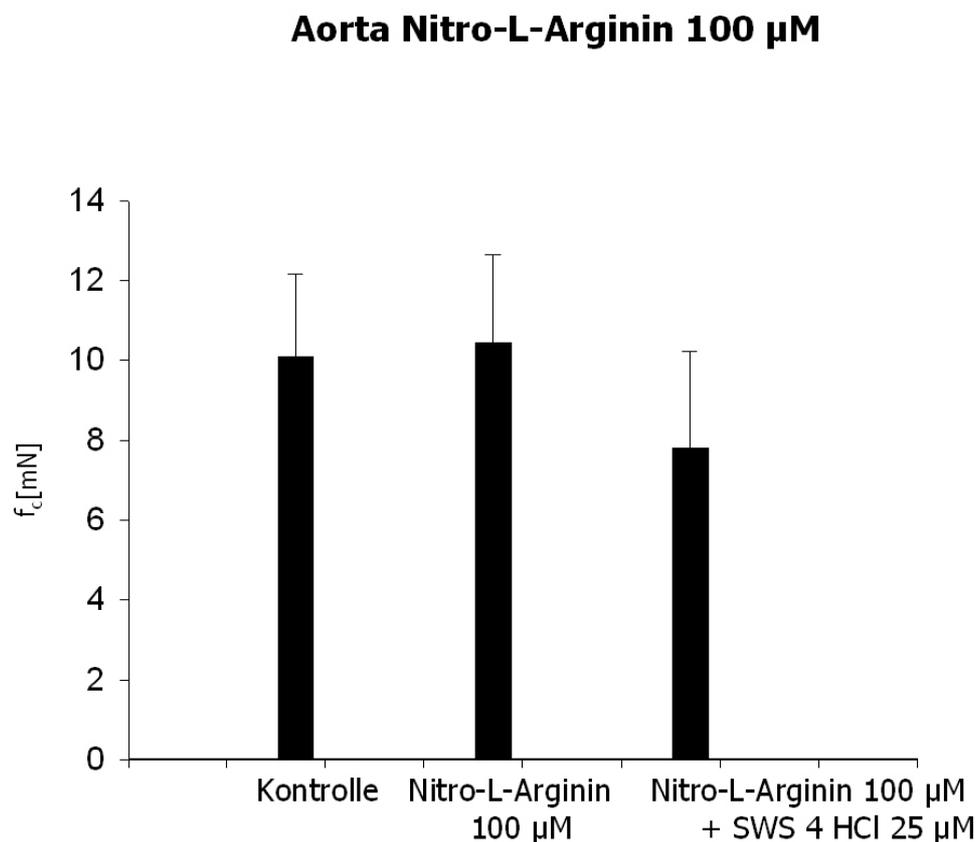
Tabelle 14: Wirkung von SWS 4 HCl mit Nitro-L-Arginin auf die Kontraktionskraft der Aorta

Konz. ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche N	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	10,09 \pm 2,07	4	-
100 μM Nitro-L-Arginin	10,44 \pm 2,20	4	n.s.
+ 25 μM SWS 4 HCl	7,80 \pm 2,42	4	0,05

Legende zu Tabelle 14:

Die Tabelle zeigt den arithmetischen Mittelwert und dessen Standardfehler jeweils von der Kontrollphase, von der Phase mit Nitro-L-Arginin in der Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ und die Phase nach weiterer Zugabe der Substanz SWS 4 HCl.

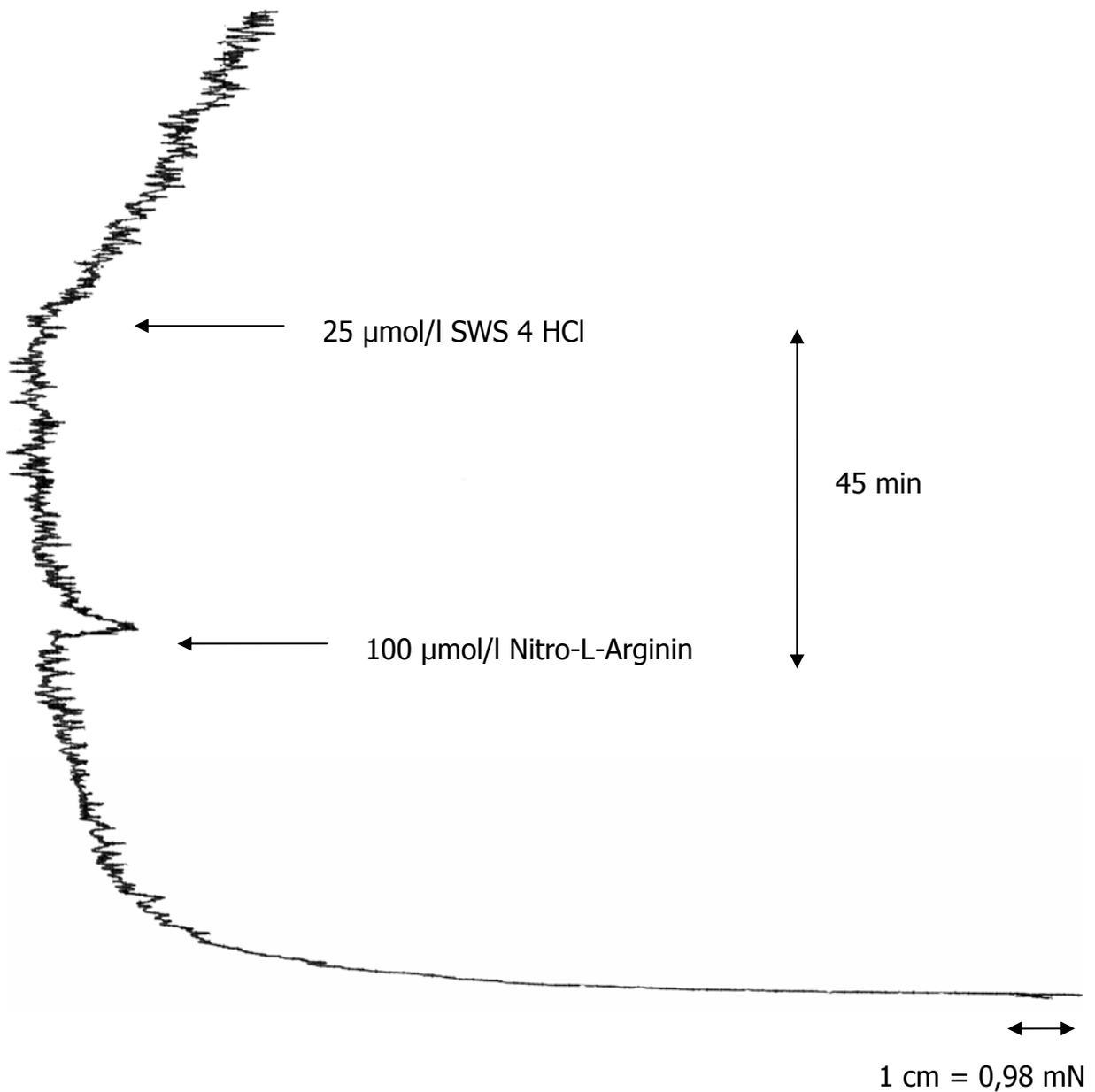
Diagramm 11: Graphische Darstellung der alleinigen Wirkung von Nitro-L-Arginin auf die Kontraktionskraft der Aorta und darauf folgend in Kombination mit SWS 4 HCl.



Legende zu Diagramm 11:

Der Graph stellt die Kontraktionskraft in mN mit der Konzentration der Testsubstanzen in $\mu\text{mol/l}$ gegenüber. Die arithmetischen Mittelwerte aus vier Versuchen werden als Balken dargestellt und deren Standardfehler als strichförmige Verlängerungen. Die schwarzen Balken stehen für den Kontrollwert der maximalen Kontraktion, den Effekt der durch Zugabe von Nitro-L-Arginin erzielt wird und die Reaktion der Aorta nach dem Hinzufügen der Substanz.

Abbildung 30: Originalaufzeichnung der Wirkung auf die Aorta im Zuge des Versuchsablaufs.



Legende zu Abbildung 30:

Die Originalaufzeichnung des Graphen zeigt die vorübergehend kurze Zunahme der Kontraktion während der Nitro-L-Argininphase und die anschließende eindeutige Abnahme dieser nach weiterer Zugabe der Testsubstanz. Die Pfeile symbolisieren den Zeitpunkt der Substanzzugabe.

4.3.2. Wirkung von SWS 4 HCl in Kombination mit Glibenclamid auf die Aorta

Die Versuchsreihen mit Glibenclamid wurden in zwei verschiedenen Konzentrationen, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$, durchgeführt. Hiermit sollte nachgewiesen werden, ob die Wirkung der Substanz SWS 4 HCl durch eine Öffnung der Kaliumkanäle zustande kommt. Fünfundvierzig Minuten nach dem Einspritzen von Glibenclamid wurden 25 $\mu\text{mol/l}$ Testsubstanz SWS 4 HCl hinzugefügt und die Veränderung bezüglich der Kontraktilität des Organs mit dem Schreiber aufgezeichnet.

Tabelle 15 + 16: Wirkung auf die Aorta bei 30 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamidzugabe und in Kombination mit 25 $\mu\text{mol/l}$ SWS 4 HCl

Konz. ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	7,25 \pm 0,64	3	-
30 μM Glibenclamid	7,29 \pm 1,10	3	n.s.
+ 25 μM SWS 4 HCl	4,70 \pm 1,56	3	0,05

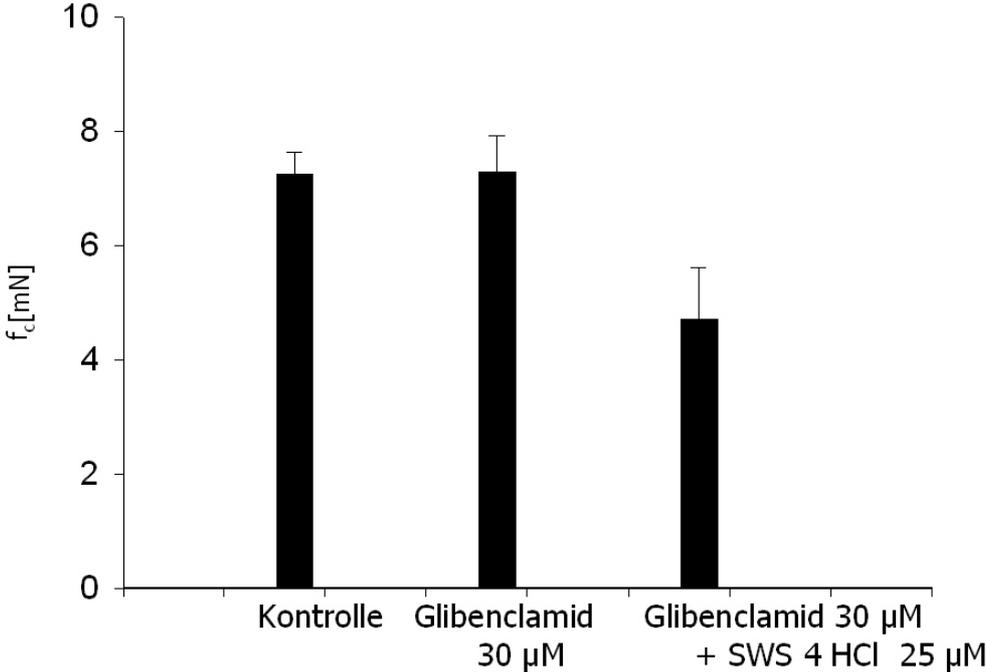
Konz. ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	9,51 \pm 0,89	4	-
100 μM Glibenclamid	7,19 \pm 1,59	4	0,05
+ 25 μM SWS 4 HCl	2,75 \pm 3,19	4	0,05

Legende zu Tabelle 15 + 16:

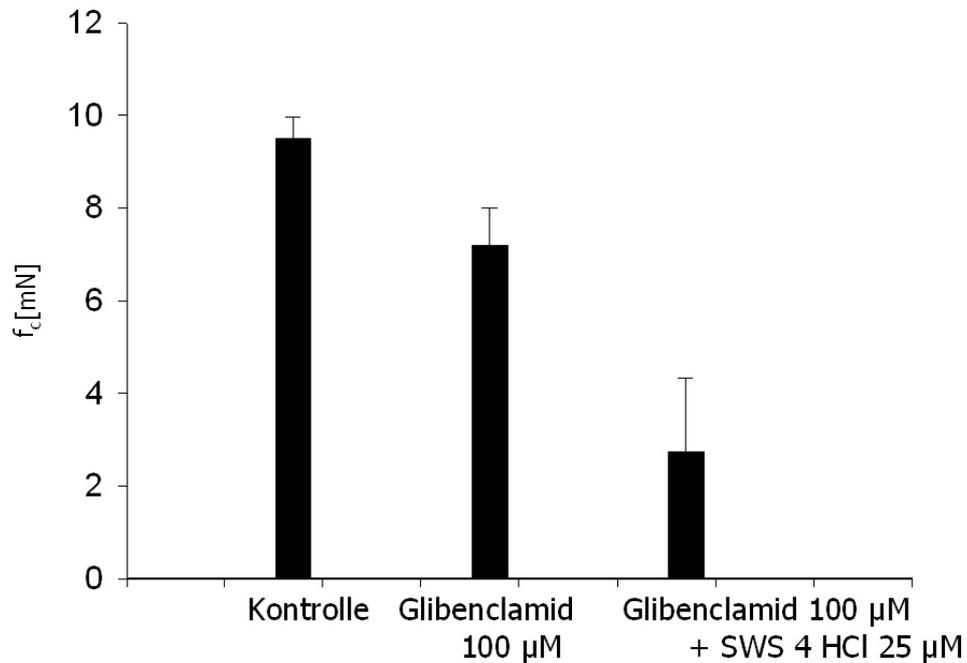
Tabellarische Darstellung der arithmetischen Mittelwerte (f_c) und deren Standardfehler (SEM).

Diagramm 12: Graphische Darstellung der Auswirkung der Zugabe von 30 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid bzw. in Kombination mit 25 $\mu\text{mol/l}$ SWS 4 HCl auf die Aorta.

Aorta GLIBENCLAMID 30 μM



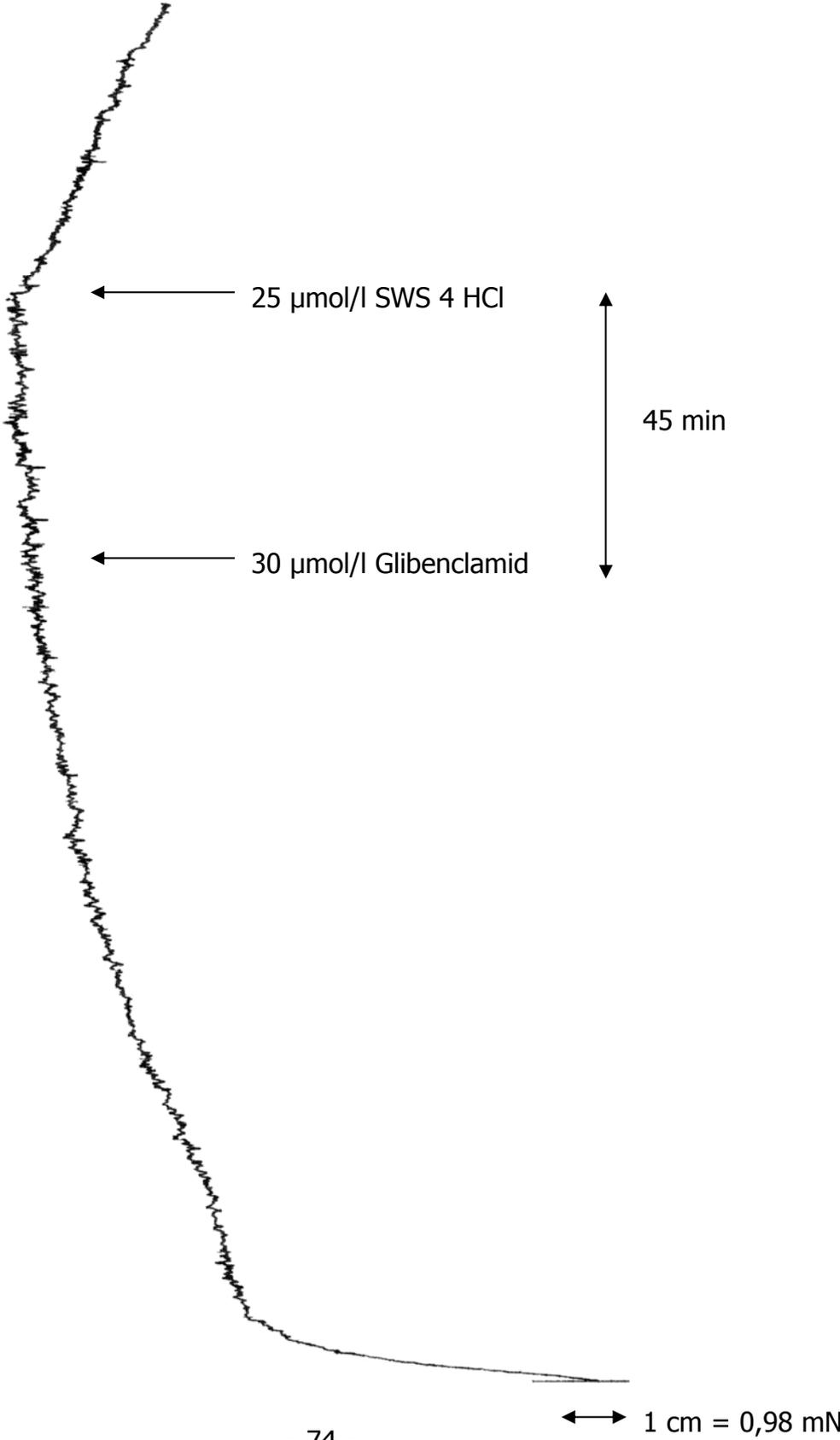
Aorta GLIBENCLAMID 100 μM

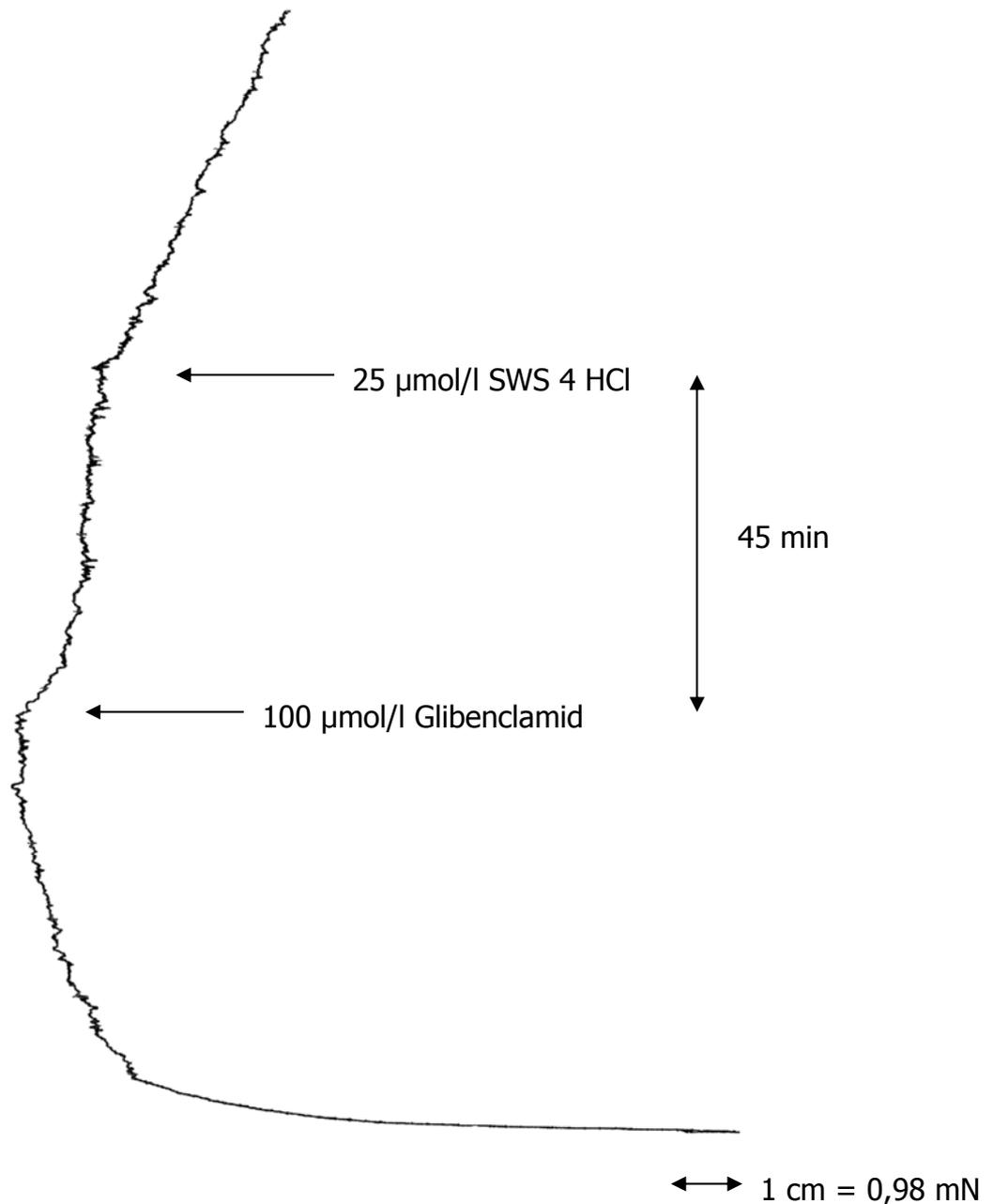


Legende zu Diagramm 12:

In diesem Diagramm wird die Veränderung der Kontraktilität der Aorta nach Zugabe von 30 bzw. 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid dargestellt und daneben wird die Auswirkung beim zusätzlichen Zufügen der Testsubstanz SWS 4 HCl auf die Aortapräparate ersichtlich gemacht. Auf der Abszisse sind die Konzentrationen der einzelnen Substanzen in $\mu\text{mol/l}$ und auf der Ordinate die Kontraktionskraft in mN aufgetragen. Die Balken mit der strichförmigen Verlängerung werden durch die aus den drei bzw. vier Versuchen ermittelten arithmetischen Mittelwerten und deren Standardfehler gebildet.

Abbildung 31: Originalaufzeichnung der Wirkung von Glibenclamid allein in der Konzentration von 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ und in Kombination mit 25 $\mu\text{mol/l}$ der Testsubstanz SWS 4 HCl auf die Kontraktionskraft der Aorta.





Legende zu Abbildung 31:

Abbildung 31 zeigt die Originalaufzeichnung des Versuches mit 30 bzw. 100 µmol/l Glibenclamid. Bei der Zugabe des Agonisten kommt es bei 30 µmol/l zu einer leichten Kontraktionszunahme und bei der höheren Konzentration (100 µmol/l) wird eine leichte Dilatation verursacht. Die zu testende Substanz SWS 4 HCl führt in beiden Fällen zu einer eindeutigen Abnahme der Kontraktilität. Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der Substanzzugabe.

4.3.3. Wirkung von SWS 4 HCl in Kombination mit Phenylephrin auf die Aorta

Als dritter Agonist wurde, neben Nitro-L-Arginin und Glibenclamid, Phenylephrin verwendet um die Wirkung von SWS 4 HCl auf die Kontraktilität der Aorta zu testen. Mit dem Versuch konnte man der Möglichkeit, dass die Wirkung von SWS 4 HCl auf die Aorta durch eine Hemmung sympathomimetischer Vorgänge zustande kommt, auf den Grund gehen.

Zu Beginn wurde eine Verdünnungsreihe von Phenylephrinhydrochlorid mit den Konzentrationen 0,1; 0,3; 1; 3 und 10 $\mu\text{mol/l}$ hergestellt und mit diesen wurden die Kontrollwerte festgelegt. Danach wurde wie auch in Kapitel 3.6.2 näher beschrieben die Testsubstanz in einer Konzentration von 25 $\mu\text{mol/l}$ dem Organbad hinzugefügt und es wurden ebenfalls im zeitlichen Abstand die verschiedenen Konzentrationen injiziert. Die Kontraktionskraft der Aorta fiel unter dem Einfluss von SWS 4 HCl in einer Konzentration von 25 $\mu\text{mol/l}$ bei der höchsten Konzentration von Phenylephrin von $9,77 \pm 2,25$ mN auf $9,54 \pm 2,26$ mN.

Eine sympatholytische Wirkung der Testsubstanz ist zwar leicht vorhanden, allerdings in nur sehr geringem Ausmaß.

Tabelle 17: Wirkung von Phenylephrinhydrochlorid auf die Aorta

Phenylephrin HCl ($\mu\text{mol/l}$) Kontrolle	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche N
0,1	$0,05 \pm 0,03$	3
0,3	$0,75 \pm 0,36$	3
1	$3,44 \pm 1,09$	3
3	$7,12 \pm 1,50$	3
10	$9,77 \pm 2,25$	3

Legende zu Tabelle 17:

Die Tabelle 17 zeigt die arithmetischen Mittelwerte f_c aus drei Versuchen mit Phenylephrin HCl. Die Werte dienen als Referenzwerte zu den Versuchen mit Phenylephrin in Kombination mit SWS 4 HCl.

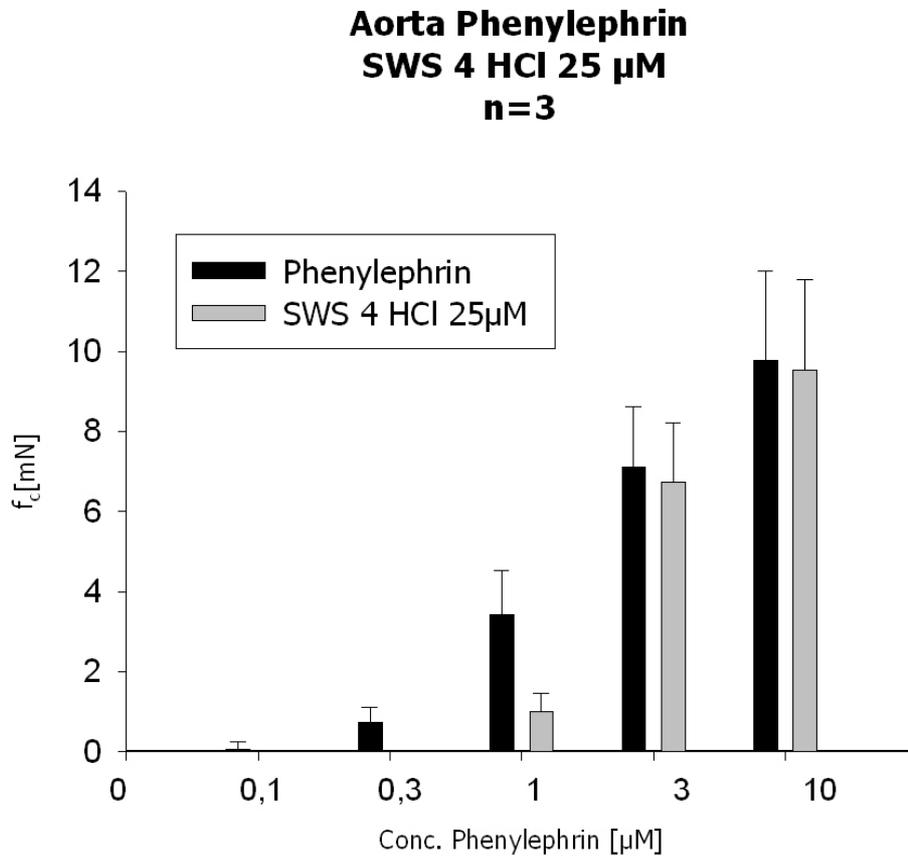
Tabelle 18: Wirkung von SWS 4 HCl in Kombination mit Phenylephrin HCl auf die Aorta

SWS 4 HCl (25 µmol/l) + Phenylephrin	$f_c \pm SEM$	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
0,1	0 ± 0	3	n.s.
0,3	0 ± 0	3	n.s.
1	$1,01 \pm 0,47$	3	0,05
3	$6,73 \pm 1,48$	3	n.s.
10	$9,54 \pm 2,26$	3	n.s.

Legende zu Tabelle 18:

Darstellung der arithmetischen Mittelwerte und deren Standardfehler aus 3 Versuchen mit Phenylephrinhydrochlorid und SWS 4 HCl in einer Konzentration von 25 µmol/l.

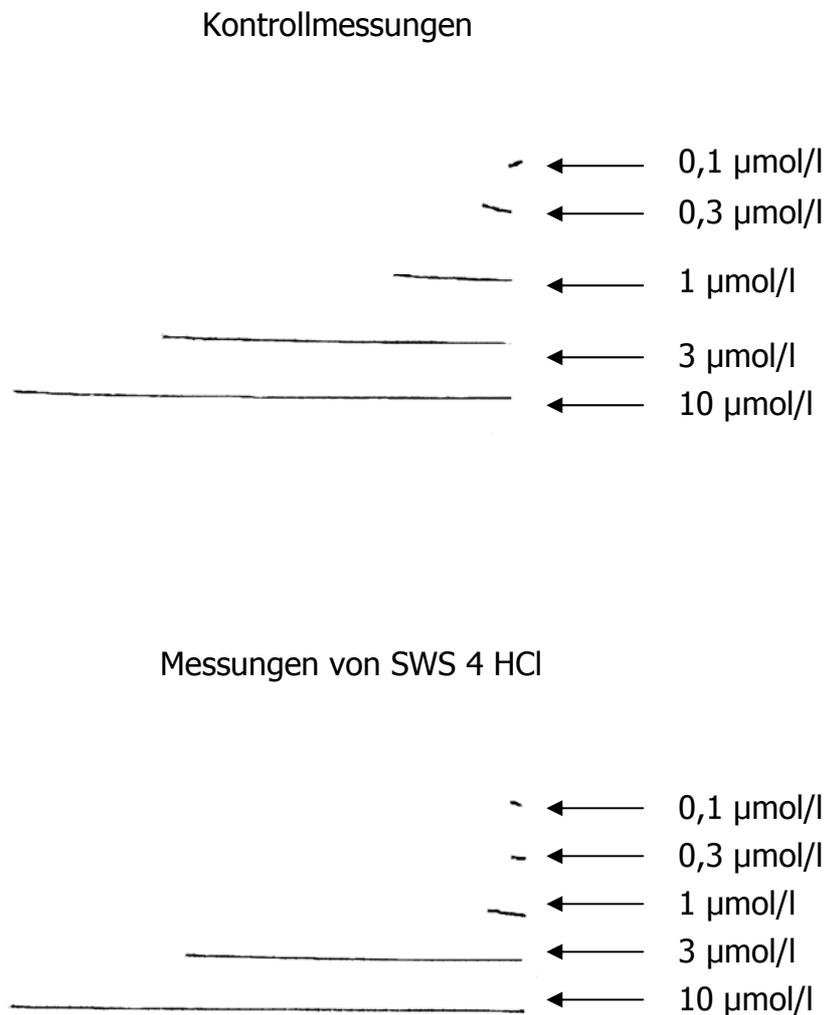
Diagramm 13: Graphische Darstellung des Einfluss auf die Kontraktionskraft der Aorta durch Phenylephrin und der Testsubstanz.



Legende zu Diagramm 13:

Auf der x-Achse wurden in dieser Abbildung die verschiedenen Konzentrationen an Phenylephrinhydrochlorid in μ mol/l festgesetzt und an der y-Achse ist die Kontraktionskraft der Aorta in mN abzulesen. Die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardfehler aus drei Versuchen werden als Balken und strichförmige Verlängerung abgebildet. Die schwarzen Balken stehen für die Kontrollversuche mit Phenylephrin und die grauen Balken zeigen die Ergebnisse aus den Kombinationsversuchen aus Phenylephrin und 25 μ mol/l SWS 4 HCl.

Abbildung 32: Originalaufzeichnung der Wirkung auf die Aorta



Legende zu Abbildung 32:

Abbildung 32 zeigt die Originalaufzeichnung des Schreibers von der Kontraktionsänderung während der Versuche. Die Pfeile zeigen die Zugabe von Phenylephrinhydrochlorid in verschiedenen Konzentrationen. Die drei durchgeführten Versuche wurden zunächst mit dem reinen Agonisten und dann in Kombination mit SWS 4 HCl durchgeführt.

5. DISKUSSION

In dieser Diplomarbeit wurde durch Austestung an unterschiedlichen Organen von Meerschweinchen eine mögliche Wirkung der beiden neu synthetisierten Wirkstoffe SWS 4 HCl und WHG 72 T geprüft.

Im gesamten Kapitel 4 wurden die gesammelten und ausgewerteten Ergebnisse der Versuchsreihen angeführt und nun sollen sie noch bewertet werden. Dafür wird die Wirkung der beiden Testsubstanzen anhand einer Gegenüberstellung der Daten der glattmuskulären Organe und der Herzmuskelpräparate beurteilt.

Zunächst wird auf die Substanz **SWS 4 HCl** näher eingegangen.

Tabelle 19: Wirkung von SWS 4 HCl auf die glatte Muskulatur

Organpräparat	SWS 4 HCl Kontraktionskraft f_c (%) ± SEM bei 100 $\mu\text{mol/l}$	SWS 4 HCl Kontraktionskraft f_c (%) ± SEM bei 30 $\mu\text{mol/l}$	EC ₅₀ ($\mu\text{mol/l}$)
Aorta	- 100 ± 0	- 60,76 ± 8,47	22,78
Arteria pulmonalis	- 93,38 ± 3,47	- 58,94 ± 8,79	25,06
Terminales Ileum	- 85,00 ± 4,56	- 53,78 ± 7,73	25,59

Anhand dieser Tabelle ist ersichtlich, dass die Substanz bei allen drei glattmuskulären Organen einen EC₅₀ Wert erreicht hat, der im Durchschnitt bei 24,48 $\mu\text{mol/l}$ liegt. Die Abnahme der Kontraktion der Organe ging sogar fast auf den Ausgangswert (- 100% Wert), was einer vollständigen Dilatation entspricht.

Bei den Versuchen an der Aorta kam es bei 1 und 3 $\mu\text{mol/l}$ SWS 4 HCl zu keiner signifikanten vasodilatierenden Wirkung. Dies änderte sich allerdings ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$, wo ein Abnahme von - 18,02 ± 4,93 % bezogen auf den Kontrollwert beobachtet werden konnte. Die Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ erzielte einen Wert von - 60,76 ± 8,47 % und bei 100 $\mu\text{mol/l}$ wurde sogar der - 100 % Wert erreicht. Anhand der Konzentrations-Wirkungskurve wurde dann der EC₅₀ Wert graphisch ermittelt, der bei 22,78 $\mu\text{mol/l}$ liegt.

Aufgrund dieser Ergebnisse war es ratsam den genaueren Wirkungsmechanismus der Substanz abzuklären, wofür drei verschiedene Versuchsreihen mit Agonisten durchgeführt wurden.

Die nähere Untersuchung mit Nitro-L-Arginin, welches als ein Inhibitor des NO-Systems fungiert (Ishii et al. 1990), ergab statistisch signifikante Ergebnisse. Der NO-Antagonisten Nitro-L-Arginin (100 $\mu\text{mol/l}$) führte bei den Versuchen zu einer leichten Zunahme der Kontraktion, jedoch wurde diese durch Zugabe von SWS 4 HCl (25 $\mu\text{mol/l}$) in eine deutliche Abnahme der Kontraktionskraft von $10,44 \pm 2,20$ mN auf $7,80 \pm 2,42$ mN umgelenkt. Die Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit P zeigte, dass diese Veränderung eine statistische Signifikanz aufwies. Somit könnte die vasodilatierende Wirkung der Substanz zumindest teilweise durch eine NO Freisetzung zustande kommen.

Bei den Versuchen mit Glibenclamid wurden zwei verschiedene Konzentrationen desselben angewendet und die Auswirkungen in Kombination mit der Testsubstanz beobachtet. Dadurch sollte abgeklärt werden, ob die Wirkung der Testsubstanz durch eine Öffnung der ATP abhängiger Kaliumkanäle zustande kommt. Die Kaliumkanalblockierende Substanz Glibenclamid wurde in einer Konzentration von 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ den Aortapräparaten zugefügt. Die Wirkung der Substanz SWS 4 HCl (25 $\mu\text{mol/l}$) war bei beiden Konzentrationen durch eine deutliche Dilatation geprägt und war mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 statistisch signifikant.

Die Versuche mit Phenylephrinhydrochlorid in den Konzentrationen von 0,1; 0,3; 1; 3 und 10 $\mu\text{mol/l}$ und SWS 4 HCl (25 $\mu\text{mol/l}$) ergaben keine aussagekräftigen Veränderungen. Lediglich war ein α -blockierender Anteil der vasodilatierenden Wirkung bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ SWS 4 HCl festzustellen gewesen, dem aber eher eine untergeordnete Bedeutung zuzuschreiben ist.

Insgesamt kann man also sagen, dass der Wirkungsmechanismus der Testsubstanz wahrscheinlich hauptsächlich durch eine Öffnung der Kaliumkanäle zu erklären ist.

Die Versuchsreihen an der Arteria pulmonalis sind mit denen an der Aorta zu vergleichen. Es kam ebenfalls zu einer starken Kontraktionsabnahme, die bei einer Konzentration von 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ Werte von $- 58,94 \pm 8,79$ % und $- 93,38 \pm 3,47$ % bezogen auf den Kontrollwert (0 %) erreichten und als statistisch höchst

signifikant einzuordnen waren. Der EC₅₀ Wert ist ein wenig höher und liegt bei 25,06 µmol/l.

Im Zuge der Versuche am terminalen Ileum wurde ersichtlich, dass die Substanz auch auf das letzte auszutestende Organ der glatten Muskulatur eine große Wirkstärke hat. Während die Vasodilatation bei 1 und 3 µmol/l erst eine schwache, aber trotzdem schon signifikante Wirkung aufzeigte, waren ab 10 µmol/l die Werte höchst signifikant. In der Graphik der Konzentrations-Wirkungskurve ist die stetige Abnahme der Kontraktilität der Gefäße besonders schön zu sehen. Die EC₅₀ war bei 25,59 µmol/l vorzufinden.

Abbildung 20: Wirkung von SWS 4 HCl auf die Herzmuskulatur

Organpräparat	SWS 4 HCl Kontraktionskraft f _c (%) ± SEM bei 100 µmol/l	SWS 4 HCl Kontraktionskraft f _c (%) ± SEM bei 30 µmol/l	EC ₅₀ (µmol/l)
Rechter Vorhof	- 86,19 ± 8,46	- 12,30 ± 2,26	55,97
Papillarmuskel	- 40,66 ± 4,60	- 16,35 ± 5,43	-

Wenn man nun die Ergebnisse der Untersuchungen an den Herzmuskelpräparaten näher betrachtet, erkennt man, dass die Wirkung der Substanz bei weiten nicht so stark ist wie auf die glatte Muskulatur. Allerdings wurde die Schlagfrequenz des Vorhofes bei 100 µmol/l auf ein Sechstel des Kontrollwertes reduziert. Die Auswirkung auf den isolierten Papillarmuskel war hingegen nicht allzu groß.

In einem Bereich von 1 bis 10 µmol/l beeinflusste die Substanz kaum die Vorhofpräparate. Es wurde die Schlagfrequenz sogar um bis zu knapp vier Prozent erhöht. Dies änderte sich jedoch bei einer Konzentration von 30 µmol/l, wo die Abnahme der Schläge 12,3 ± 2,26 % betrug. Bei 100 µmol/l wirkte sich die Substanz extrem negativ chronotrop aus, sodass sogar in drei von fünf Fällen das Präparat seine autonome Aktivität vollständig aussetzte. Der Mittelwert aus den Versuchen lag bei dieser Konzentration bei - 86,19 ± 8,46 % bezogen auf die Kontrolle. Durch die

starke Abnahme bei den höheren Wirkstoffkonzentrationen wurde auch ein EC₅₀ Wert von 55,97 µmol/l erreicht.

Bei den Versuchen auf den isolierten Papillarmuskel wurde der Einfluss auf die Inotropie ersichtlich. Die Testsubstanz verursachte bei einer Konzentration von 1 µmol/l bereits eine Abnahme der Schlagkraft auf einen Wert von - 11,99 ± 5,03% ausgehend von dem 0% Wert (Kontrolle). Zwischen 3 und 30 µmol/l ergaben sich trotz höheren Konzentrationen keine sonderlich großen Veränderungen auf die Inotropie. Erst bei 100 µmol/l nahm die Schlagkraft noch einmal deutlich ab und wies eine statistische Signifikanz auf. Aufgrund des nicht ausreichenden Einflusses von SWS 4 HCl auf den Papillarmuskel war es nicht möglich einen EC₅₀ Wert graphisch zu ermitteln.

Nun wird der Einfluss von **WHG 72 T** auf die verschiedenen Organe näher betrachtet.

Abbildung 21: Wirkung von WHG 72 T auf die glatte Muskulatur

Organpräparat	WHG 72 T Kontraktionskraft f _c (%) ± SEM bei 100 µmol/l	WHG 72 T Kontraktionskraft f _c (%) ± SEM bei 30 µmol/l	EC ₅₀ (µmol/l)
Aorta	- 31,00 ± 12,36	- 18,94 ± 8,66	-
Arteria pulmonalis	- 1,65 ± 0,87	- 2,17 ± 1,61	-
Terminales Ileum	- 87,95 ± 6,77	- 58,49 ± 9,38	20,46

Die Tabelle zeigt sehr gut, dass die Testsubstanz eine spezifische Wirkung auf das terminale Ileum vorweisen kann. Es wurde ein EC₅₀ Wert von 20,46 µmol/l ermittelt. An der Aorta wurde bei der höchsten Konzentration die Kontraktionskraft ungefähr um ein Drittel verringert und bei der Arteria pulmonalis kann man von fast keinem Einfluss der Testsubstanz sprechen.

Die Kontraktion der Aorta nahm bei den Versuchen mit WHG 72 T mit steigender Konzentration stetig schwach ab, aber erreichte lediglich einen Wert von - 31,00 ±

12,36 % bezogen auf den Kontrollwert. Die Irrtumswahrscheinlichkeit war bei allen Konzentrationen außer bei 100 µmol/l als statistisch nicht signifikant einzuordnen.

Die Versuche mit der Substanz WHG 72 T an der Arteria pulmonalis ergaben noch einen geringeren Effekt als bei den Aortapräparaten. Dies ist besonders gut in der Konzentrations-Wirkungskurve ersichtlich, da die Abnahme der Kontraktionskraft mit zunehmender Konzentration nahezu unverändert bleibt und somit eine Art Gerade in der Graphik entsteht. Die Dilatation des Organs lag sogar bei der höchsten Konzentration von 100 µmol/l nur bei $1,65 \pm 0,87$ %, somit konnte eine EC₅₀ nicht erreicht werden.

Bei den Versuchreihen am terminalen Ileum war es schon möglich einen EC₅₀ Wert graphisch zu ermitteln. Die Substanz WHG 72 T wies bereits bei der geringsten Konzentration spasmolytische Aktivität auf, die bei weiterer Erhöhung der Konzentration zunahm. Bei einer Konzentration von 20,46 µmol/l war der halbmaximale Effekt der Substanz bereits erreicht. Ab einer Konzentration von 10 µmol/l wurden die Ergebnisse als höchst signifikant eingestuft und bei 100 µmol/l betrug die Relaxation $87,95 \pm 6,77$ % bezogen auf den Kontrollwert.

Abbildung 22: Wirkung von WHG 72 T auf die Herzmuskulatur

Organpräparat	WHG 72 T Kontraktionskraft f_c (%) ± SEM bei 100 µmol/l	WHG 72 T Kontraktionskraft f_c (%) ± SEM bei 30 µmol/l	EC ₅₀ (µmol/l)
Rechter Vorhof	- 4,67 ± 2,65	- 4,94 ± 3,01	-
Papillarmuskel	0,88 ± 4,68	- 0,02 ± 3,99	-

Die Untersuchungen an den beiden Herzmuskelorganen ergaben, dass selbst bei einer Konzentration von 100 µmol/l kein signifikanter Einfluss der Testsubstanz auf die Chronotropie oder Inotropie besteht. Eine EC₅₀ wurde in beiden Fällen nicht erreicht.

Die Substanz WHG 72 T hatte nahezu keine Wirkung auf den Vorhof. Der maximale Effekt, der während der ganzen Versuchsreihe erzielt wurde, war eine leicht negativ chronotrope Wirkung von $-7,09 \pm 4,34$ % bei $10 \mu\text{mol/l}$.

Beim Papillarmuskel war die Situation ähnlich, da man ebenfalls weit davon entfernt war eine EC_{50} zu erhalten. Die Kontraktionskraft nahm bei der ersten Substanzzugabe nur um $8,24 \pm 4,33$ ab. Nach weiterer Erhöhung der Konzentration näherte sich die Konzentration immer mehr dem Ausgangswert und bei $100 \mu\text{mol/l}$ stieg die Kontraktilität des Papillarmuskels auf $0,88 \pm 4,68$ %.

WHG 72 T wies auf die Herzmuskelpräparate und auf die Gefäße bis zu einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ keine nennenswerte Wirkung auf. Lediglich das Vorhandensein einer selektiven Spasmolyse auf das terminale Ileum wurde herausgefunden. Der exakte Wirkungsmechanismus Bedarf allerdings noch genauerer Untersuchungen.

Zhao et al. (2001) untersuchten sowohl in vivo als auch in vitro die kardiovaskulären Effekte von Schwefelwasserstoff.

Die Versuche bei anästhesierten Ratten zeigten, dass eine intravenöse Bolusinjektion von H_2S ($2,8$ und $14 \mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht) eine vorübergehende Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks verursacht. Die Herzfrequenz wurde durch diese Injektion nicht beeinflusst. Die Zugabe von Pinacidil, einen K_{ATP} Kanal-Öffner, ergab ebenfalls eine Steigerung des Blutdrucks, welche den Effekt von H_2S nachahmt. Wenn man jedoch Glibenclamid als K_{ATP} Kanal-Blocker vor der Bolusinjektion von H_2S verabreicht, dann kommt es zu einer Antagonisierung des Effekts von Schwefelwasserstoff.

Weiters induzierte H_2S ebenfalls eine Relaxation der Aortaringpräparate, welche zuvor mit Phenylephrin kontrahiert wurden.

Zhao et al. (2001) untersuchten auch, nach Vorkontrahierung der Aorta mit unterschiedlichen Konzentrationen einer Kaliumchloridlösung, den Einfluss auf die Wirkstärke von Schwefelwasserstoff. Bei der Zugabe einer 20 mmolaren KCl-Lösung kam es zu einer geringeren Kontraktion durch H₂S (maximale vaskuläre Relaxation bei 60 µM: 19 ± 3,9 %), als bei der 100 mmolaren Lösung von Kaliumchlorid, wo man eine maximale Relaxation von 90 ± 8,2 % verzeichnen konnte.

Bei den Versuchen mit SWS 4 HCl wurden die Aortapräparate mit einer 90 mmolaren Kaliumchlorid-Lösung vorkontrahiert. Die maximale Relaxation bei einer Konzentration von 100 µmol/l der Substanz ging sogar über 100 % hinaus. Wenn man dies nun mit den Werten von Zhao et al. (2001) vergleicht, wäre eine Überlegung wert, ob die Vasodilatation durch Schwefelwasserstoff allein zustande gekommen ist.

Die Ergebnisse der in vivo Untersuchungen wiesen daraufhin, dass der hypotensive Effekt von Schwefelwasserstoff, angetrieben durch eine Relaxation der Blutgefäße, voraussichtlich durch eine Öffnung der K_{ATP}-Kanäle zustande kommt. Die kurze Dauer dieser Auswirkung könnte der Plünderung des H₂S durch Metalloproteine, Proteine mit Disulfiden, Thio-S-methyl-Transferase und Hämverbindungen zuzuschreiben sein. Der blutdrucksenkende Effekt von Pinacidil war ebenfalls sehr kurzlebig.

Außerdem zeigten die Daten von Zhao et al. (2001), dass die hypotensive Wirkung von H₂S auch auf einer spezifischen Aktivität an den vaskulären glatten Muskelzellen beruht.

Durch die in vitro Studien wurde herausgefunden, dass H₂S schon bei Konzentrationen von 18 und 60 µmol/l relaxierend auf die isolierte Aorta wirkt. In diesen Fällen wurde das Organ mit 20 mM KCl oder mit Phenylephrin maximal vorkontrahiert.

Mason et al. (1978) haben damals in ihrer Studie darüber berichtet, dass der H₂S Blutplasmaspiegel bei Wistar Ratten ungefähr 10 µmol beträgt. Die Studie von Zhao et al. (2001) hingegen fand einen Blutplasmaspiegel bei SD Ratten von ~ 50 µmol heraus. Prinzipiell ist die Konzentration von H₂S im Gewebe höher als im Blut. Zum Beispiel ist die physiologische Konzentration von Schwefelwasserstoff im Gehirn rund 50 – 160 µmol. (Hosoki et al. 1997)

Zusammenfassend kann man sagen, dass Schwefelwasserstoff eine Vasorelaxation hervorruft, die innerhalb einer physiologisch relevanten Konzentrationsspanne liegt. Diese Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass H₂S (genauso wie NO und CO) ein weiterer intrinsischer, gasförmiger und vasoaktiver Faktor ist.

Die Vasodilatation von Schwefelwasserstoff schließt aber auch einen geringen Endothel abhängigen Effekt und einen großen Einfluss auf die glatte Muskulatur ein, wodurch er sich von Stickstoffmonoxid und Kohlenstoffmonoxid sehr unterscheidet. Der wichtige Mechanismus für die Relaxation durch NO und CO ist nämlich die Aktivierung des cGMP – Pfads. Demgegenüber wird die vasorelaxierende Wirkung von H₂S hauptsächlich durch die Öffnung von K_{ATP} Kanäle in vaskulären glatten Muskelzellen und teilweise durch eine Kaliumleitfähigkeit in Endothelzellen. (Zhao et al. 2001)

6. ZUSAMMENFASSUNG

Diese Diplomarbeit umfasst die Überprüfung der biologischen Aktivität der Testsubstanzen SWS 4 HCl und WHG 72 T auf die isolierten Organe von Meerschweinchen.

Die gesamten Versuche wurden an drei verschiedenen glattmuskulären Präparaten (Aorta, Arteria pulmonalis und terminales Ileum) und an zwei Herzmuskelpräparaten (Atrium cordis dexter und Musculus papillaris) durchgeführt. Anhand der Ergebnisse wurden die genaue Wirkstärke und der dementsprechende Wirkungsmechanismus ermittelt.

Die Substanz SWS 4 HCl hatte eine vasodilatierende Wirkung auf alle drei Präparate der glatten Muskulatur, wobei die stärkste Veränderung an der Aorta festzustellen war. Die Versuche an den drei Organen ergaben eine durchschnittliche EC_{50} von 24,48 $\mu\text{mol/l}$. Weiters war der dilatierende Effekt von SWS 4 HCl so groß, dass bei der Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ die Kontraktion fast auf den Ausgangswert zurückging. Demgegenüber war der Einfluss auf die Kontraktionskraft und auf die Schlagfrequenz eher gering bis gar nicht vorhanden.

Aufgrund der starken Aktivität an der Aorta durch SWS 4 HCl, wurde ein Wirkungsmechanismus mit drei verschiedenen Agonisten durchgeführt, um die Ursache dieser zu klären. Man kam zu dem Erkenntnis, dass die Wirkung hauptsächlich durch eine Öffnung der Kaliumkanäle zustande kommen soll.

Die zweite getestete Substanz WHG 72 T wies eine selektive Dilatation auf das terminale Ileum auf. Es wurde eine EC_{50} von 20,46 $\mu\text{mol/l}$ bei diesem ermittelt. Auf die anderen Organe der glatten Muskulatur (Aorta und Arteria pulmonalis) war nahezu kein Einfluss auf die Kontraktionskraft zu beobachten. Die Kontraktionskraftabnahme lag am Ende der Versuche an der Aorta bei rund einem Drittel und bei der Arteria pulmonalis nicht einmal bei 2 %.

Auf die Chronotropie des rechten Vorhofes oder auf die Inotropie des Papillarmuskels war keine Einflussnahme abzuleiten.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Abe K and Kimura H (1996) The possible Role of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Neuromodulator. *J Neurosci* 16(3): 1066-1071

Ashcroft F (1998) Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Annu Rev Neurosci* 11: 97-118

Bhatia M, Sidhapuriwala J, Moochhala SM, Moore PK (2005a) Hydrogen sulphide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in the rat. *Br J Pharmacology* 145: 141-144

Collins R, MacMahon S (1994) Blood pressure, antihypertensive drug treatment and the risks of stroke and of coronary heart disease. *Br Med Bull* 50(2):272-98

Erickson PF, Maxwell IH, Su LJ, Baumann M, Glode LM (1990) Sequence of cDNA for rat cystathionine γ -lyase and comparison of deduced amino acid sequence with related *Escherichia coli* enzymes. *Biochem J* 269: 335-340

Griffith OW (1987) Mammalian sulfur amino acid metabolism. *Methods in enzymology* 143: 366-376

Gueyffier F, Boutitie F, Boissel JP, Pocock S, Coope J, Cutler J, Ekblom T, Fagard R, Friedman L, Perry M, Prineas R, Schron E (1997) Effect of antihypertensive drug treatment on cardiovascular outcomes in women and men. A meta-analysis of individual patient data from randomized, controlled trials. The INDANA Investigators. *Ann Intern Med* 126(10):761-7

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

Ishii K, Chang B, Kerwin JF Jr, Huang Z, Murad F. (1990) N-Nitro-L-arginine: A potent inhibitor of endothelium-derived relaxing factor formation. *Eur J Pharmacol* 176: 219-223

Kamoun P (2001) Mental retardation in Down syndrome: a hydrogen sulfide hypothesis. *Medical Hypotheses* 57: 389-392

Koenitzer JR, Isbell TS, Patel HD, Benavides GA, Dickinson DA, Patel RP, Darley-Usmar VM, Lancaster jr JR, Doeller JE, Kraus DW (2007) Hydrogen sulfide mediates vasoactivity in an O₂-dependent manner. *American J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1953-H1960

Kubo S, Kurokawa Y, Doe I, Masuko T, Sekiguchi F, Kawabata A (2007) Hydrogen sulphide inhibits activity of three isoforms of recombinant nitric oxide synthase. *Toxicology* 241: 92-97

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

Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, Anuar FB, Whiteman M, Salto-Tellez M, Moore PK (2005) Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *The FASEB J* 19: 1196-1198

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M, (2001) *Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 9. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

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

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

Rosemann S (2002) Verbesserung der Kontraktilität von Dünndarmstreifen bei nekrotisierender Pankreatitis durch NO-Antagonismus und Einfluss von Endotoxin. Dissertation Freie Universität Berlin

Seino S, Miki T (2003) Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Progress in Biophys Mol Biol* 81: 133-176

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

Stipanuk M H, Beck P W (1982) Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J* 206: 267-277

Swaroop M, Bradley K, Ohura T, Tahara T, Roper MD, Rosenberg LE, Kraus JP (1992) Rat cystathionine β -synthase. *J Biol Chem* 267: 11455-11461

Terzic A, Jahangir A, Kurachi Y (1995) Cardiac ATP-sensitive K⁺ channels: regulation by intracellular nucleotides and K⁺ channel-opening drugs. *Am J Physiol* 269: C525-C545

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

Yan H, Du J, Tang C (2004) The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. *Biochem and Biophys Research Commun* 313: 22-27

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

8. CURRICULUM VITAE

Name: Nicole Chvatlinsky

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 13.03.1986
Geburtsort: Wien
Wohnort: Langobardenstraße 126/4/36, 1220 Wien
Staatsangehörigkeit: Österreich
Eltern: Sonja Schmidt & Gerhard Chvatlinsky

Ausbildung:

1992 - 1996 Volksschule Maria Frieden, 1220 Wien
1996 - 2004 Bundesgymnasium Polgarstraße, 1220 Wien
Juni 2004 Matura am BG 22, Polgarstraße 24, Wien
Oktober 2004 Beginn des Studiums der Pharmazie an der
Universität Wien
April 2009 Beginn der Diplomarbeit am Departement für
Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien

Berufliche Erfahrungen:

07/2003 und 09/2004 Praktikum im Verband der Wiener Volkshochschulen,
Zeiss Planetarium Wien, 1020 Wien
10/2003 - 08/2006 geringfügig beschäftigt bei Max by Vögele Shoes, 1060
Wien
07/2005 Praktikum in der Marienapotheke, Mag. pharm.
Alvarado-Dupuy, 1160 Wien
seit 03/2006 geringfügig beschäftigt in der Allerheiligen Apotheke,
Mag. pharm. Baldia KG, 1200 Wien
seit 10/2007 Tutorin des Praktikums „Angewandte Mikrobiologie“,
Institut der Pharmakologie & Toxikologie, Universität
Wien