



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Biologische Aktivität einer potentiell  
schwefelwasserstofffreisetzenden Verbindung  
(MAH 46.HCl) an isolierten  
Präparaten von Meerschweinchen

Verfasserin

Marlene Kiesenhofer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreuer:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

**„Was man lernen muss, um es zu tun,  
das lernt man, indem man es tut.“**

## **DANKSAGUNG und WIDMUNG**

Meine Diplomarbeit möchte ich meinem Sohn Julian widmen, der in den letzten Jahren stets Freude und Liebe in mein Leben brachte.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner ganzen Familie, die mir sowohl moralisch als auch finanziell tatkräftig zur Seite gestanden ist. Sie waren in meiner ganzen Studienzeit immer für Julian und mich da, haben mich stets unterstützt und großes Interesse an meinem Studium gezeigt. Ohne meine Lieben wären die letzten Jahre nicht so reibungslos verlaufen. Ich werde ihnen nie genug danken können!

Ein weiterer Dank geht an die besten Freunde und gleichzeitig Kollegen, die man sich wünschen kann. Sie haben die Zeit meines Studiums unvergesslich gemacht und ich hoffe zutiefst, dass wir uns nie aus den Augen verlieren.

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik bedanken, der mich während meiner Diplomarbeit betreut und umfangreich unterstützt hat.

Abschließend danke ich der Arbeitsgruppe des Departments für Medizinische Chemie und Pharmazeutische Chemie rund um ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker für die Bereitstellung der Testsubstanz.

# Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| 1. EINLEITUNG .....  | 1  |
| 2. ZIELSETZUNG .....   | 5  |
| 3. MATERIAL UND METHODDIK .....  | 6  |
| 3.1 Testsubstanzen .....   | 6  |
| 3.1.1. MAH46.HCl.....  | 6  |
| 3.1.2. Lösungsmittel.....  | 6  |
| 3.2 Versuchstiere.....   | 8  |
| 3.3 Physiologische Elektrolytlösung .....  | 8  |
| 3.4 Verwendete Organe.....   | 10 |
| 3.4.1 Die Präparation.....   | 10 |
| 3.4.1.1 Verwendete Materialien .....   | 10 |
| 3.4.1.2 Rechter Vorhof.....  | 11 |
| 3.4.1.3 Die Lungenarterie .....  | 12 |
| 3.4.1.4 Papillarmuskel (Musculus papillaris).....                                  | 12 |
| 3.4.1.5 Dünndarm (Terminales Ileum) .....  | 14 |
| 3.4.1.6 Aorta (Aorta descendens).....  | 14 |
| 3.5 Verwendete Apparaturen.....  | 16 |
| 3.5.1 Apparatur 1 .....  | 16 |
| 3.5.2 Apparatur 2.....   | 19 |
| 3.5.3 Der Kraftwandler.....  | 21 |
| 3.5.4. Verstärker und Schreiber .....  | 21 |
| 3.5.5. Versorgung mit Carbogen.....  | 21 |
| 3.6 Durchführung der Versuche.....   | 22 |
| 3.6.1 Wirkung der Substanzen auf die isolierten Meerschweinchenorgane.....         | 22 |
| 3.6.1.1 Atrium Dexter (Rechter Vorhof) .....                                       | 22 |
| 3.6.1.2 Musculus papillaris (Papillarmuskel).....                                  | 24 |
| 3.6.1.3 Terminales Ileum (Dünndarm) .....  | 25 |
| 3.6.1.4 Aorta descendens.....  | 26 |
| 3.6.1.5 Arteria pulmonalis (Lungenarterie).....                                    | 28 |
| 3.6.2 Untersuchung des Wirkmechanismus von MAH46.HCl an der Arteria pulmonali..... | 29 |
| 3.7 Auswertung der Daten und Statistik .....                                       | 30 |
| 3.7.1 Atrium Dexter.....   | 30 |
| 3.7.2 Musculus papillaris .....  | 30 |
| 3.7.3 Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum .....                            | 31 |
| 3.7.4 Statistik .....  | 31 |

|  |    |
|--|----|
| 4. ERGEBNISSE .....  | 33 |
| 4.1. Ergebnisse der Testsubstanz MAH 46.HCl .....  | 33 |
| 4.2.1 Atrium cordis dexter .....   | 33 |
| 4.2.2 Musculus papillaris .....  | 37 |
| 4.2.3 Aorta descendens .....   | 42 |
| 4.2.4 Arteria pulmonalis .....   | 45 |
| 4.2.5 Terminales Ileum .....   | 49 |
| 4.3 Versuche zur Analyse des Wirkungsmechanismus von MAH46.HCl auf die<br>Arteria pulmonalis ..... | 53 |
| <br>   |    |
| 5. DISKUSSION .....  | 57 |
| 5.1. Wirkung auf die glatte Muskulatur .....   | 57 |
| 5.2. Genauer Wirkmechanismus auf die Arteria pulmonalis .....                                      | 58 |
| 5.3. Wirkung auf die Herzmuskulatur .....  | 59 |
| <br>   |    |
| 6. ZUSAMMENFASSUNG .....   | 62 |
| <br>   |    |
| 7. LITERATURVERZEICHNIS .....  | 64 |
| <br>   |    |
| 8. CURRICULUM VITAE .....  | 67 |

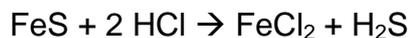
# 1. Einleitung

Seit vielen Jahren ist Schwefelwasserstoff, Summenformel  $\text{H}_2\text{S}$ , folgliches Molekulargewicht 34,08 g/mol, als giftiges Gas und als nach faulen Eiern riechende Substanz gut bekannt (Winder und Winder 1933, Smith und Gosselin 1979).

Es entsteht bei der Einwirkung von Säuren auf Schwermetallsulfide sowie bei reduktiver Zersetzung von Eiweiß (Forth et al. 2009).

Herstellung im Labormaßstab:

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



Die wichtigsten betroffenen Organe bei einer akuten Vergiftung sind das zentrale Nervensystem als auch der Atemtrakt. Die Folgen sind Kopfschmerzen, Schwindel, Brechreiz, Krämpfe, Bewusstlosigkeit bis hin zur Atemlähmung.

Geringe Konzentrationen aktivieren das Warnsystem durch den unangenehmen Geruch als auch durch die reizende Wirkung auf die Schleimhäute. Bei Konzentrationen über 200 ppm betäubt  $\text{H}_2\text{S}$  die Geruchsrezeptoren, wodurch eine folgende Konzentrationserhöhung nicht mehr wahrgenommen werden kann und es dadurch leicht zu folgenschweren Vergiftungen kommen kann.

Die Therapie der akuten Vergiftung verläuft symptomatisch, wesentlich dabei ist die gezielte Beatmung mit 100%igen Sauerstoff. Versuchsweise kann 4-DMAP (Diethylaminophenol) ohne nachfolgende Gabe von Natriumthiosulfat eingesetzt werden (Oberdisse et al. 2002).

Die physiologische Bedeutung von Schwefelwasserstoff ist noch nicht vollständig geklärt.

Es handelt sich dabei um ein biologisches Gas, das im Körper endogen beim Cystein-Metabolismus und in einer von der Cystathionin beta-Synthase (CBS)

und/oder der Cystathionin gamma-Lyase (CSE) katalysierten Reaktion entsteht (Stipanuk und Beck 1982, Hosoki et al. 1997).

In Studien an Mäusen, bei denen CSE genetisch ausgeschaltet wurde, verringerte sich die H<sub>2</sub>S Konzentration in allen Organen und Geweben merklich und sie zeigten erhöhten Blutdruck sowie verringerte Gefäßrelaxation (Yang et al. 2008).

Diese Eigenschaft wird auch bei anderen endogenen Transmittern wie Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenstoffmonoxid (CO) beobachtet. (Wang et al. 1997a,b).

Dadurch kam man zu dem Entschluss, dass Schwefelwasserstoff eine sehr erhebliche Rolle in der kardiovaskulären Regulation spielt. Folglich beschäftigten sich etliche Studien mit diesem therapeutischen Ansatz.

Hosoki et al. (1997) demonstrierten, dass H<sub>2</sub>S die Aorta von Ratten *in vitro* relaxierte und somit dilatierte. Diesem Wirkmechanismus wollte man auf den Grund gehen.

Dazu wurde ein Zusammenhang mit den schon bekannten Regulationsmechanismen der vaskulären, glatten Muskulatur, K<sub>ATP</sub> Kanäle, NO und CO, in Betracht gezogen.

Das ein Zusammenspiel von NO und H<sub>2</sub>S existiert, wurde in einer Studie an pulmonalen Rattenaorten bestätigt (Wang et al. 2008).

Des Weiteren kam man zu der Annahme, dass die relaxierende Wirkung von Schwefelwasserstoff auf isolierte Aortenringe von Ratten der Aktivierung bzw. Öffnung von K<sub>ATP</sub>-abhängigen Kanälen zu Grunde liegt.

Dadurch kommt es zu einem Ausströmen von Kalium aus der Zelle, welches eine Hyperpolarisation bewirkt. In Folge werden spannungsabhängige Calciumkanäle deaktiviert. Dies führt wiederum zu einer Relaxation der glatten Muskulatur und dadurch zu einer Vasodilatation (Zhao et al. 2001).

Nachweis dieses Effekts von Schwefelwasserstoff liefert die Tatsache, dass ein selektiver Antagonist (Glibenclamid) des ATP-abhängigen Kalium-Kanals die Wirkung reduziert (Zhao et al. 2001, Zhao and Wang 2002, Cheng et al. 2004).

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

ATP-abhängige Kaliumkanäle werden durch Adenosintriphosphat gesteuert, welches bei einem ATP-Anstieg zu einer Schließung der Kanäle führt (Mutschler et al. 2008). Ob auch andere Mechanismen an der Wirkung des Schwefelwasserstoffs, wie zum Beispiel eine Mitwirkung in den Adenylatcyclase-Weg (Lim et al. 2008) oder die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren (Abe and Kimura 1996) beteiligt sind ist noch nicht vollständig geklärt.

Eine weitere Studie beschäftigte sich mit H<sub>2</sub>S zur Behandlung einer künstlich biochemisch hervorgerufenen pulmonalen arteriellen Hypertonie. Hier zeigte sich dass die erzeugten negativen Effekte durch Verabreichung von NaHS teilweise wieder aufgehoben werden konnten (Huang et al. 2008).

Aufgrund des Wirkmechanismus von Schwefelwasserstofffreisetzung basierenden Wirkstoffen liegt die Annahme nahe, dass sie sich für eine Behandlung der essentiellen Hypertonie eignen. Dazu sind aber noch mehr Forschungsergebnisse notwendig um einen klinischen Einsatz zu ermöglichen.

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

Die fünf Säulen der pharmakologischen Behandlung von arterieller Hypertonie sind folgende Substanzklassen:

- Diuretika
- Beta-Rezeptor-Antagonisten
- ACE-Hemmer
- AT1-Rezeptorantagonisten
- Kalziumkanalblocker

Nicht pharmakologische Maßnahmen (Lifestyle-Maßnahmen) wären:

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

Besonders die Kombination der diversen Wirkstoffklassen eignet sich für einen positiven Therapieerfolg, denn dadurch kann die Wirksamkeit unterschiedlicher Wirkstoffe verbessert und verstärkt werden, als auch die Nebenwirkungen auf Grund einer verringerten Dosierung reduziert werden (Forth et al. 2009).

Auf der Basis der aktuellen Studienlage ist der Beginn der Hypertoniebehandlung mit einer niedrig dosierten Kombinationstherapie aus Diuretikum und  $\beta$ -Blocker oder Diuretikum und ACE-Hemmer hinsichtlich Wirksamkeit und Nebenwirkungen als gleichwertig der Monotherapie anzusehen.

Wenn das Therapieziel mit der normalen therapeutischen Dosierung einer Monosubstanz nicht erreicht wird, sollte man sich frühzeitig zur Gabe von Zweier- oder auch Dreierkombinationen entschließen, da so die Erfolgsrate erhöht wird und die Dosen (und damit der unerwünschten Wirkungen) der individuellen Kombinationspartner klein gehalten werden können (Forth et al. 2009).

## 2. Zielsetzung

Ziel meiner Diplomarbeit war es die Wirkung des neu synthetisierten Wirkstoffs MAH 46.HCl, auf isolierte Meerschweinchenorgane zu testen.

Entwickelt wurde diese Substanz am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie der Universität Wien.

Für die Untersuchung wurden 5 verschiedene Organe verwendet. Dabei handelte es sich um Atrium dexter, Musculus papillaris, Aorta descendens, Aorta pulmonalis und terminales Ileum.

An der quergestreiften Muskulatur wurde eine Veränderung der Chronotropie, zu Deutsch Schlagfrequenz, als auch der Inotropie (Schlagkraft) gemessen.

Zusätzlich wurde eine dilatierende bzw. spasmolytische Wirkung auf der glatten Muskulatur untersucht, die sich in Form einer Relaxation der Organe äußerte.

Zu diesem Zweck musste man sich zuvor die spezielle Präpariertechnik als auch die richtige Bedienung der Messgeräte aneignen um vergleichbare und reproduzierbare Versuche durchführen zu können. Des Weiteren war eine genaue Vorgehensweise der Versuche Voraussetzung für eine aussagekräftige Versuchsreihe.

Bei Erreichen einer signifikanten Wirkung wurden zusätzliche Versuche vorgenommen um dem genaueren Wirkmechanismus auf den Grund zu gehen.

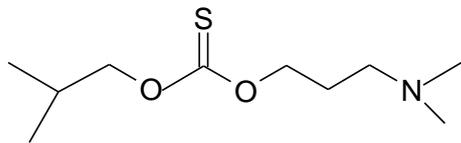
Dies wurde in meinem Fall an der Aorta pulmonalis untersucht.

## 3. Material und Methodik

### 3.1. Testsubstanz

#### 3.1.1.MAH 46.HCl

Abbildung 1: Chemische Struktur von MAH 46.HCl



Nomenklatur: Isobutyl-(3-dimethylaminopropoxy) methanthioat

#### 3.1.2.Lösungsmittel

Das geeignete Lösungsmittel für den neuen Wirkstoff war destilliertes Wasser. Die hydrophile Testsubstanz löste sich sehr rasch vollständig auf und musste nicht zusätzlich behandelt werden.

Um nach kumulativer Zugabe eine Konzentration von 100µmol/l zu erreichen, wählte man die Einwaage abhängig des zu verwendeten Gefäßes, welche sich im Fassungsvermögen unterschieden.

Folgende Tabelle dient zur Erklärung der berechneten und verwendeten Stammlösung:

Tabelle1: Stammlösung

| <b>Substanz</b> | <b>Molare Masse</b> | <b>Organbad in ml</b> | <b>Einwaage</b> |
|-----------------|---------------------|-----------------------|-----------------|
| MAH 46.HCl      | 255,80g/mol         | 8 ml                  | 0,20mg          |
|                 |                     | 25 ml                 | 0,64mg          |

Um kumulative Konzentrationen von 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  zu erreichen, wurden 3, 7, 20 und 70  $\mu\text{mol/l}$  Testsubstanz in einem jeweils 45 minütigen Abstand pipettiert.

Tabelle 2: Pipettierschema

| <b>Zugegebene Menge (insges. 100 <math>\mu\text{l}</math>)</b> | <b>Endkonzentration</b> |
|--|-------------------------|
| 3 $\mu\text{l}$  | 3 $\mu\text{mol/l}$     |
| 7 $\mu\text{l}$  | 10 $\mu\text{mol/l}$    |
| 20 $\mu\text{l}$   | 30 $\mu\text{mol/l}$    |
| 70 $\mu\text{l}$   | 100 $\mu\text{mol/l}$   |

Nach einer beständigen Vergleichsphase (Plateauphase) konnten die jeweiligen Konzentrationen mit Hilfe einer Finnmikropipette der Stammlösung zugefügt werden. Dies geschah in einem Zeitabstand von 45 Minuten. In dieser Zeitspanne wurde ein „steady-state“, das bedeutet ein konstanter Blutplasmaspiegel, als Sicher angenommen.

### **3.2. Versuchstiere**

Als Versuchsobjekte dienten für folgende Versuche die inneren Organe des Meerschweinchens. Diese unterscheiden sich hinsichtlich der Ionenkanäle nicht wesentlich von jenen der Menschen. Als auch wurden sie aus praktischen Gründen, wie Größe und Gewicht in Anbetracht der Gefäßgröße und dessen Fassungsvermögen, gewählt.

Wichtige Charakteristika der Meerschweinchen:

- Weiblich
- Alter: 4-8 Wochen
- Gewicht: 300g – 600g
- Stamm: TRIK

Durch einen präzisen Genickbruch wurde zu Beginn eines jeden Labortages ein Meerschweinchen getötet. Der Genickbruch ist für das Tier die schnellste, stress-, und schmerzfreiste Methode, da diese zum sofortigen Exitus führt.

Folgende Organe wurden nach Öffnung des Thorax und des Abdomens mit Hilfe einer OP-Schere und einer OP-Pinzette entfernt:

- Herz samt Lungengewebe
- terminales Ileums
- Aorta

Die entfernten Organe wurden umgehend in eine begaste physiologische Elektrolytlösung überführt und darin aufbewahrt bis zur weiteren Verwendung.

### **3.3. Physiologische Elektrolytlösung**

Die physiologische Elektrolytlösung wurde, wie bereits erwähnt, zur Aufbewahrung der Organe vor, während und nach der Präparation benutzt. Die Lösung, auch nach dem Pharmakologen Maurice Vejeux Tyrode „Tyrode“ genannt, stellt eine modifizierte Lösung von der Krebs-Henseleit-Lösung dar.

Die genaue Zusammensetzung ergibt sich aus folgenden Bestandteilen:

Tabelle 3:

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

Die genaue Herstellungsanleitung für 2 Liter sieht folgendermaßen aus:

Tabelle 4:

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

Um erfolgreiche Versuche durchführen zu können, musste die Tyrode täglich neu hergestellt werden.

Die aufgelisteten Bestandteile von Tabelle 4 wurden der Reihe nach aus den jeweiligen Stammlösungen zusammengefügt und auf ca. 1500ml mit destilliertem

Wasser aufgefüllt. Nach einer 20 minütigen Begasung, um eine optimale Gassättigung zu erreichen, wurde tropfenweise  $\text{CaCl}_2$  beigemischt. Zum Abschluss wurde die Tyrode bis zur 2000ml-Marke mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Gemeinsam mit einem Gasgemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid, auch Oxymix oder Carbogen-Gemisch genannt, welches durch einen Gasschlauch direkt in die Tyrode eingeführt wurde, diente die gesättigte Lösung neben der ausreichenden Versorgung von Sauerstoff auch zur Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Wertes und stellte somit optimale physiologische Bedingungen für die jeweiligen isolierten Organe dar.

Dadurch standen sie einige Stunden für Versuche zu Verfügung.

### **3.4. Verwendete Organe**

#### **3.4.1. Präparation**

##### **3.4.1.1. Verwendete Materialien**

Die isolierten, bereits zugeschnittenen Organe wurden in eine mit Tyrode befüllten Petrischale gelegt, um die Präparate so schonend wie möglich anzufertigen. Die Petrischale wurde zuerst mit einer Korkplatte ausgelegt, welche durch einen kurzen Gummischlauch befestigt wurde, um ein Fixieren der Organe mit Hilfe von Präpariernadeln zu ermöglichen.

Zusätzlich dienten diverse Pinzetten in den verschiedensten Größen, Pipetten, Federgriffscheren und OP-Scheren für eine optimale Präparation.

Für ein präzises, genaues Arbeiten stand ein Auflichtmikroskop zur Verfügung.

Abbildung 2: Auflichtmikroskop, Petrischale, Federgriffschere, Pinzette, Schere



### 3.4.1.2. Rechter Vorhof

Um das Herz des Meerschweinchens zu entnehmen, musste zuerst der Thorax geöffnet werden. Anschließend wurde das isolierte Herz vom umliegenden Gewebe, wie Fett,- und Lungengewebe, befreit und zur Präparation in eine mit Tyrode befüllte Petrischale positioniert.

Nach der Isolation des rechten Vorhofs, wurde auch dieser in eine Petrischale gelegt und mit zwei Präpariernadeln befestigt. Auf beiden Enden wurde nun jeweils ein Silberhaken mit Hilfe eines Bindefadens befestigt. Zuerst wurde der Haken mit dem ersten Knoten angebracht und mit einem zweiten Knoten fixiert und gesichert.

Danach wurde der präparierten Vorhof bis zum Versuchsbeginn wieder in einem Becherglas aufbewahrt, welches wiederum mit Tyrode befüllt war.

### **3.4.1.3. Die Lungenarterie**

Verwendet wurde der Lungenstamm (Truncus pulmonalis). Das ist jener Teil der aus der rechten Herzkammer entspringt.

Dieser ist maximal 1 cm lang und musste dementsprechend sorgfältig von diversen umliegenden Geweben (Muskel,- oder Fettgewebe) oder Blutgerinnsel befreit werden und anschließend in 1 bis 2 ringförmige Stücke geschnitten werden.

Ein Anbringen von Silberhaken war bei diesem Präparat nicht nötig, da das ringförmige Präparat direkt durch Einfädeln am Silberdraht der Apparatur befestigt wurde.

Nach dem Schneiden wurde die Lungenarterie ebenso in einem Becherglas gefüllt mit Tyrode unter ständiger Begasung aufbewahrt.

### **3.4.1.4. Papillarmuskel**

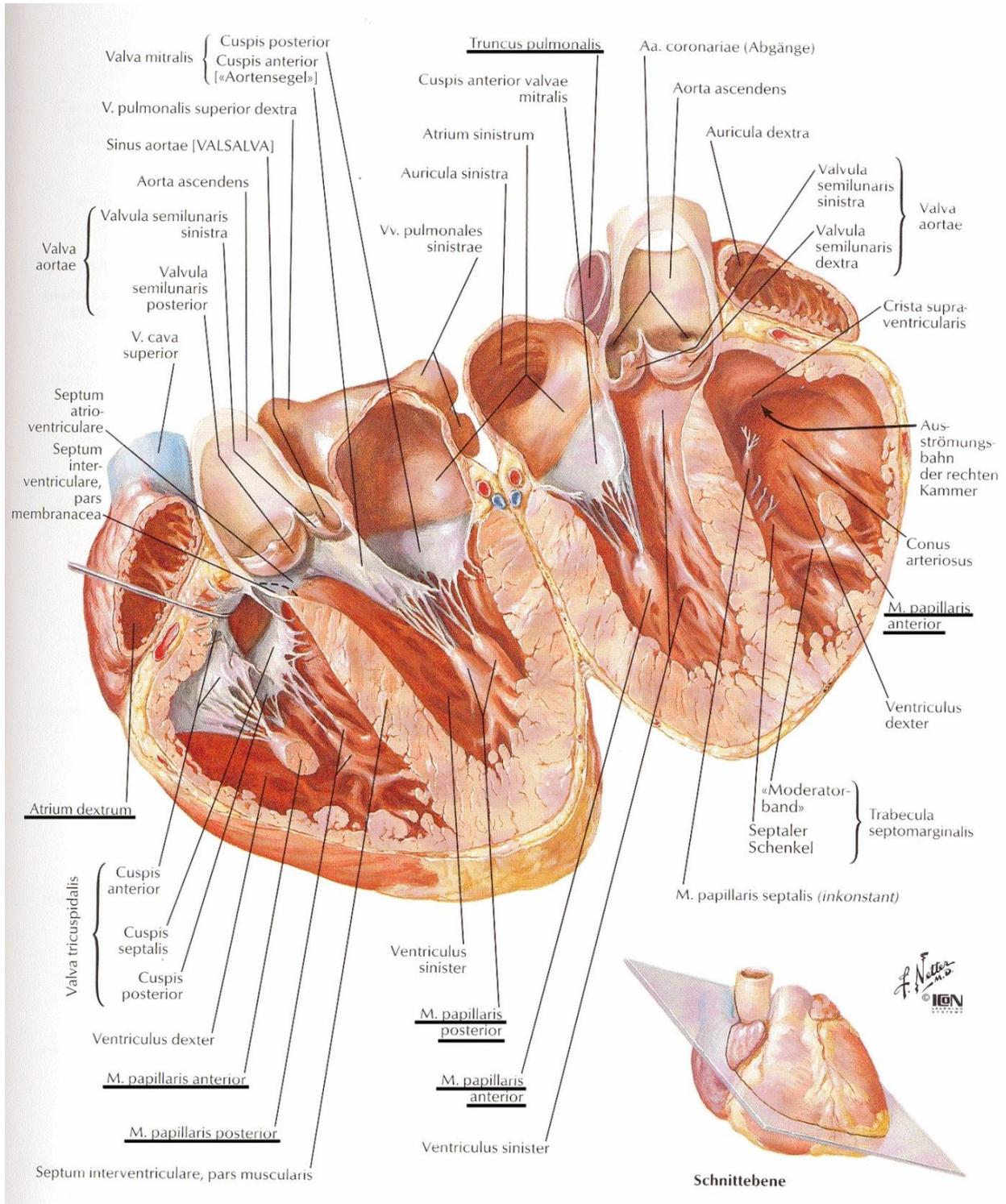
Der Musculus papillaris war das dritte Präparat aus dem Herzen stammend. Hierzu war es notwendig durch das Septum des Herzens zu schneiden und dieses aufzuklappen um direkt in die Herzkammern zu gelangen.

Nach der Entnahme wurde der Muskel mit Silberhaken versehen und vorsichtig vom umliegenden Gewebe getrennt. Zu achten war auf die vollständige Entfernung der Purkinje-Fasern, welche das Ergebnis des Versuches durch eigene Spontanaktivität verfälschen können.

Während der Präparation konnte es zu starken Blutungen kommen, vor allem bei der Öffnung des Herzens, welches ein mehrmaliges Wechseln der Tyrode zur Folge hatte.

Wie üblich wurden die Muskel, meist 3 bis 4 Stück, in einem Becherglas mit Tyrode unter Sauerstoffzufuhr aufbewahrt.

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Herzens (Netter FH 2003)



### **3.4.1.5. Dünndarm**

Nach der Isolierung des Herzens samt Lunge, wurde nach der Öffnung des Abdomens ein ca. 20 bis 25 cm langes Stück des terminalen Ileums entfernt. Dieses wurde mit Hilfe einer OP-Schere vom Rest des Darms getrennt und mit einem Bindefaden markierte man das untere Ende.

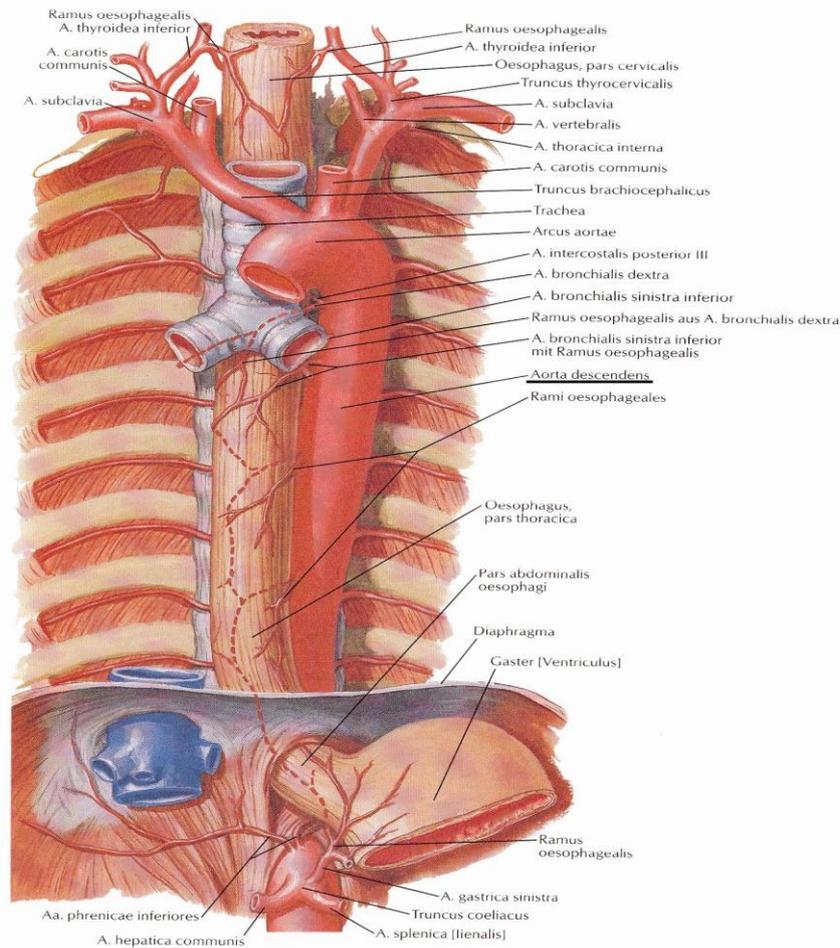
Zur Präparation benötigte man lediglich ein ca. 0,5 cm langes Stück, welches zuerst mit einer Pipette vom vorhandenen Chymus gereinigt wurde.

Danach wurde das Präparat mit 2 Präpariernadeln fixiert um an jedes Ende einen Silberhaken anzubringen. Hier war es wichtig darauf zu achten, die Öffnung des Darms nicht vollständig zu verschließen, um einerseits eine optimale Zirkulation der Substanzlösung zu gewährleisten, als auch um eine weitere Reinigung vornehmen zu können

### **3.4.1.6. Aorta descendens**

Zur Isolierung der Aorta descendens musste man den gesamten Brustkorb des Tieres öffnen. Mit Hilfe einer Pinzette hielt man das eine Ende des Gefäßes fest. Mit einer geeigneten Schere konnte man nun die Aorta, die entlang des Rückgrats liegt, optimal entfernen. Das isolierte Stück, meist 3 bis 4 cm lang, wurde daraufhin in einer Petrischale unter dem Mikroskop vom umliegenden Fettgewebe und von vorhandenen Blutgerinnsel entfernt. Bei diesem Vorgang wurde genau darauf geachtet die Aorta nicht zu verletzen oder zu überdehnen. Nun wurde ähnlich wie die Arteria pulmonalis, die gereinigte Aorta in ringförmige Stücke (ca. 2mm dick) geschnitten und ohne Anbringung von Haken in einem mit Tyrode befüllten, begasten Gefäß aufbewahrt.

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aorta (Netter FH 2003)



### Kurze Zusammenfassung:

Bei der Präparation der diversen Organe war stets auf Folgendes zu achten:

- Ein übermäßiges Dehnen und Strecken der Organe ist zu vermeiden um keine Verletzungen und Beschädigungen hinzuzufügen
- Stets ruhig und konzentriert arbeiten, um die Zeit in der das Organ nicht begast wird so kurz wie möglich zu halten
- Das richtige Präparationswerkzeug verwenden
- Immer auf die richtige Zusammensetzung der Tyrode achten
- Stets auf eine ausreichende Sauerstoffzufuhr achten

### **3.5. Verwendete Apparaturen**

Zur Ausführung der hier beschriebenen Versuche wurden zwei Arten von Apparaturen verwendet.

Apparatur 1 diente der Untersuchung des Papillarmuskels, Apparatur 2 wurde für Aorta, Arteria pulmonalis, Dünndarm und Vorhof verwendet.

In beiden Fällen wurden die entsprechenden Organe durch einen Silberdraht mit einem Kraftwandler verbunden, dessen Aufgabe darin bestand die Veränderungen des Zustandes in ein elektrisches Signal umzuwandeln, welches wiederum mit Hilfe eines Verstärkers für den Schreiber wie der Name schon sagt verstärkt wurde.

Damit die Versuchsreihe vergleichbar und reproduzierbar war, sollte man stets auf konstante Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffversorgung, Zusammensetzung der Tyrode als auch Vorspannung achten.

Unter Vorspannung versteht man, jedes isolierte Organ auf eine bestimmte Länge vorzuspannen um der natürlichen Plastizität des Gewebes und somit einer folgenden Störung und Verfälschung des Versuchs entgegenzuwirken.

#### **3.5.1.Apparatur 1**

- Apparatur für Musculus papillaris

Das Gerät besteht aus einer Wasserbadwanne aus Acrylglas, in die eine so genannte Muskelkammer hineinragt. Zusätzlich verfügt die Apparatur noch über ein Stativ an dem der Kraftwandler, Feintrieb und Organhalterung befestigt sind

Abbildung 5: Skizze der Apparatur 1

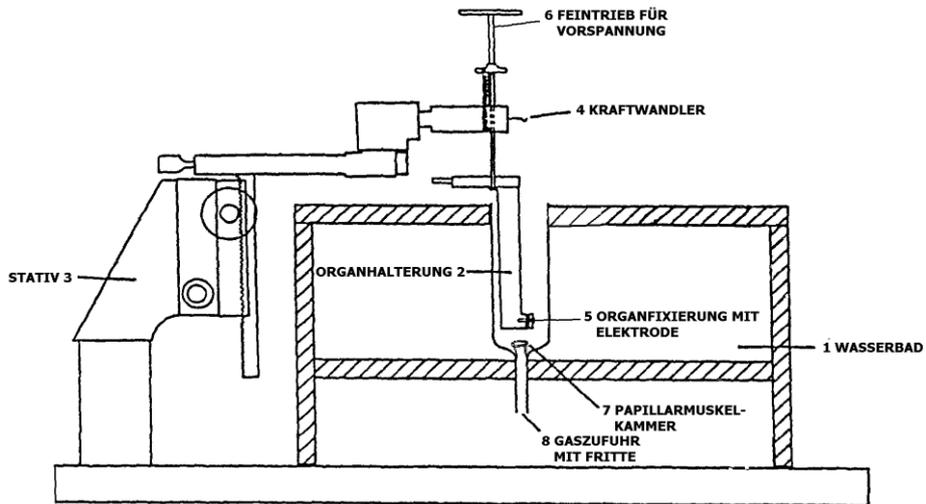


Abbildung 6: Original-Abbildung der Versuchsanordnung



Beschreibung:

Das Organbad der Apparatur 1 weist ein Fassungsvermögen von 25ml auf. Exakt diese Menge Tyrode, welche stets begast und mit Hilfe eines Wasserbads auf genau 35°C beheizt wurde, wurde verwendet. Dies sollte, um optimale physiologische Bedingungen zu schaffen, bereits 10 Minuten vor Beginn des Versuchs geschehen.

In dieses Organbad (Muskelkammer) wurde schließlich die Organhalterung eingetaucht. Diese besteht aus einem Silberdraht, auf welchen der Papillarmuskel mit Hilfe eines Silberhakens angebracht wurde. Anschließend wurde dieser zwischen einer Elektrodenplatte und einer Plexiglasscheibe eingeklemmt.

Der Silberdraht ist wie bereits erwähnt, mit einem Kraftwandler verbunden, dessen Signal an einem Amplifier verstärkt wird, und dieses dem Flachbettschreiber überträgt.

Im Unterschied zum Vorhof schlug der Papillarmuskel nicht spontan, sondern musste elektrisch stimuliert werden. Dies geschah mit einem Accupulser Stimulator.

### 3.5.2.Apparatur 2

- Apparatur für Aorta, Arteria pulmonalis, Darm und Vorhof

Abbildung 7: Skizze der Apparatur 2

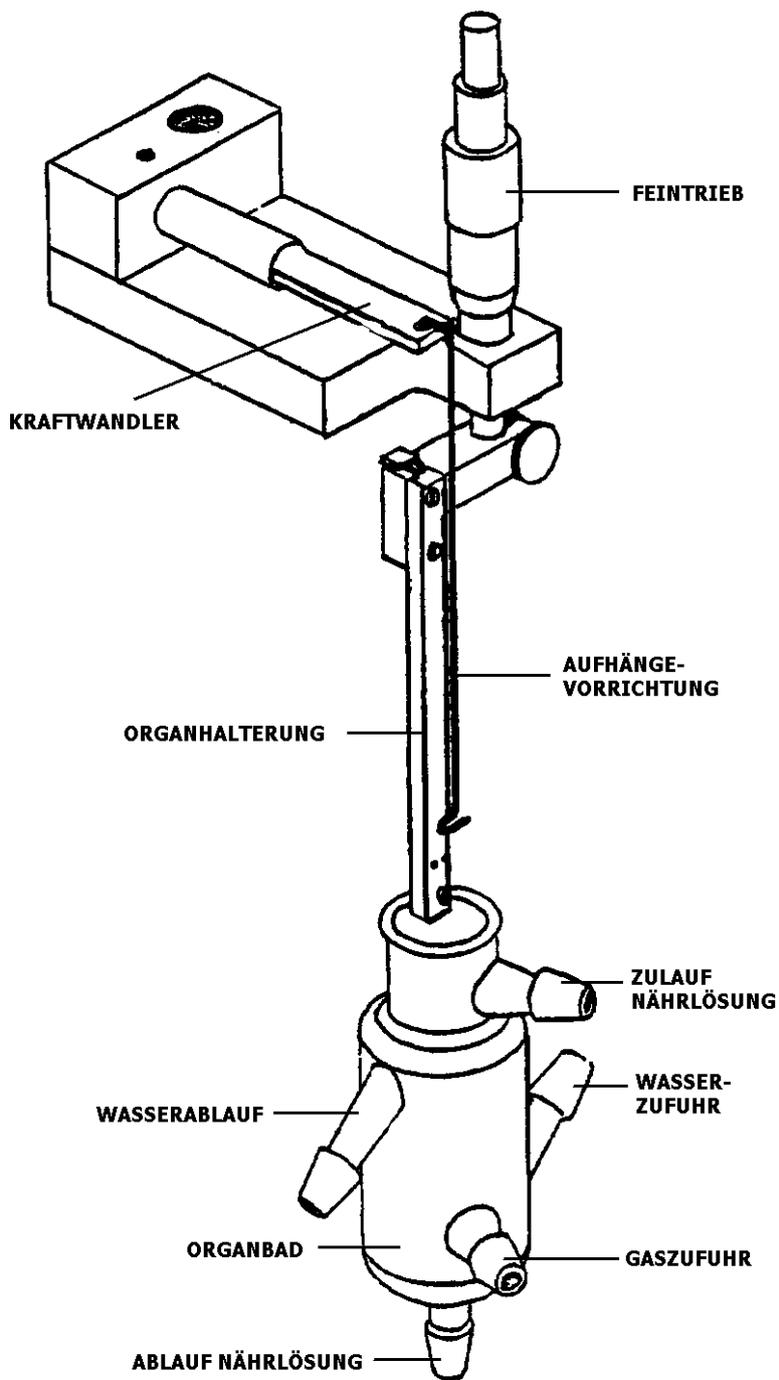
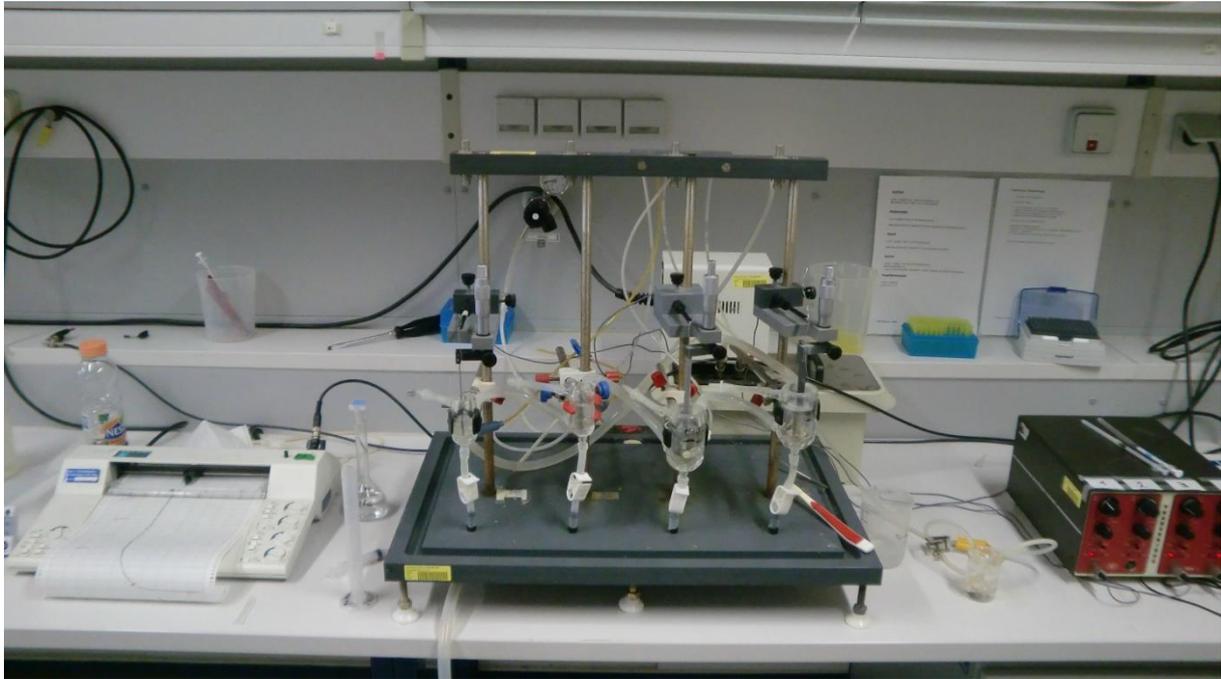


Abbildung 8: Originalabbildung der Versuchsanordnung



**Beschreibung:**

Die Apparatur 2 besteht wie die Apparatur 1 aus einem Organbad, welches ein Fassungsvermögen von 25ml oder 8ml aufweist. Dies wurde ebenfalls durch ein Wasserbad auf konstante 37°C gehalten, als auch ständig begast.

Die bereits erwähnten Organe konnten bei dieser Apparatur ebenfalls direkt an einem Silberdraht befestigt werden.

Im Falle von Aorta und Arteria pulmonalis erfolgte dies durch direktes Einfädeln der ringförmigen Präparate, im Falle von Darm und Vorhof erfolgte das Einspannen mit Hilfe der Silberhaken. Auch hier ist der Silberdraht mit einem Kraftwandler verbunden, der mit einem Amplifier versehen ist.

Die Organhalterung wurde nach dem Einspannen des Organs in das Organbad eingetaucht, sodass sich das Organ in der Mitte des Gefäßes befand.

Zur Auswertung diente auch in diesem Fall ein Flachbrettschreiber.

### **3.5.3. Der Kraftwandler**

Der Kraftwandler stellt einen essentiellen Bestandteil der Apparaturen dar. Mithilfe dieses Gerätes werden mechanische Veränderungen in Elektrische überführt, was eine Messung erst ermöglicht.

So ist die Apparatur im Stande die Zustandsveränderungen wahrzunehmen, weiterzuleiten und schließlich aufzuzeichnen.

### **3.5.4. Verstärker und Schreiber**

Das vom Kraftwandler produzierte Signal wurde zur deutlicheren Registrierung weiter zum Verstärker geleitet. Es handelte sich um einen 4-Channel Transducer Amplifier der Firma WPI (USA).

Die Aufzeichnung erfolgte über den Flachbettschreiber der Firma Kipp & Zonen, Modell BD 112, auf Millimeterpapier.

### **3.5.5. Versorgung mit Carbogen**

Das Gasgemisch, auch Oxymix genannt, besteht wie bereits beschrieben aus 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>.

Die ständige Zufuhr von Carbogen hat folgende Punkte als Aufgabe :

- Optimale Versorgung mit Sauerstoff während der Präparation und den anschließenden Versuchen
- Gleichmäßige Vermischung der Testsubstanz während des Versuchs
- Konstanthaltung und Pufferung des pH-Werts

Das Gas strömt direkt durch ein Schlauchsystem in das Organbad. Zuvor wird es noch von einer Glasfritte fein zerstäubt und gewährleistet somit eine optimale Dosierung des Gases, welche durch Schraubklemmen regulierbar ist.

## **3.6. Durchführung der Versuche**

### **3.6.1. Wirkung der Testsubstanz auf die isolierten Meerschweinchenorgane**

#### **3.6.1.1. Atrium Dexter**

Die Präparation des rechten Vorhofes wurde bereits in Kapitel 3.4.1.2. besprochen. Mit Hilfe der beiden Silberhaken an jedem Ende wurde der Vorhof locker in die Apparatur 2 eingespannt. Gerade beim Vorhof musste man darauf achten, das Organ nicht zu überdehnen, da die Gefahr zu groß war, den Sinusknoten zu verletzen und somit die Spontanaktivität herabzusetzen. Der Vorhof wurde im Gegensatz zu Aorta, Darm und Arteria pulmonalis nicht chemisch gereizt und somit wurden von Beginn an exakt 25ml Tyrode verwendet.

Nach dem Einspannen wurde der Flachbrettschreiber auf 5mV/Speed und 5mm/sec eingeschalten, der Amplifier mittels Kippschalter zugeschalten und der Schreiber wieder auf den Nullpunkt gesetzt. Danach erfolgte die Vorspannung auf 10,4 mN, da wie bereits erwähnt, jedes Organ eine natürliche Plastizität aufweist und man somit eine gewisse Reproduzierbarkeit gewährleisten konnte.

Anschließend erfolgte die 45-minütige Gewöhnungsphase, nach der man bereits mit der 30-minütigen Kontrollphase beginnen konnte. In dieser Phase wurde alle 5 Minuten die Schlagfrequenz (Chronotropie) für einen Zeitraum von etwa 12 Sekunden gemessen. Dies entsprach auf dem Millimeterpapier 6 Kästchen. Nach diesen 30 Minuten sollte der Vorhof konstant geworden sein und somit konnte mit der ersten Konzentration der Testsubstanz von 3 µl begonnen werden. Auch in dieser Zeit wurde alle 5 Minuten die Schlagfrequenz gemessen. Nach 45 Minuten wurde die 2. Konzentration pipettiert bis schließlich nach dem Pipettierschema von Kapitel 3.1.2. die Endkonzentration von 100 µmol/l erreicht wurde.

Abbildung 9: Originalabbildung des Atrium dexter



### 3.6.1.2. Musculus papillaris

Der bereits präparierte (Kapitel 3.4.1.4) und eingespannte (Kapitel 3.5.1) Muskel wurde ins Organbad abgesenkt und nach einer kurzen Gewöhnungszeit unter eine Spannung von 3,92mN gesetzt. Diese Spannung musste im weiteren Verlauf des Versuchs des Öfferns durch Nachjustierung am Feintrieb korrigiert werden, da die Kontraktionskraft mit der Ausgangsspannung einherging.

Im Gegensatz zum Vorhof weist der Papillarmuskel keine Spontantaktivität auf und musste daher elektrisch gereizt werden. Dies geschieht durch ein Reizgerät (A310 Accupulser, Firma WPI).

Als Folge dieser Reizung kam es zur Kontraktion des Papillarmuskels.

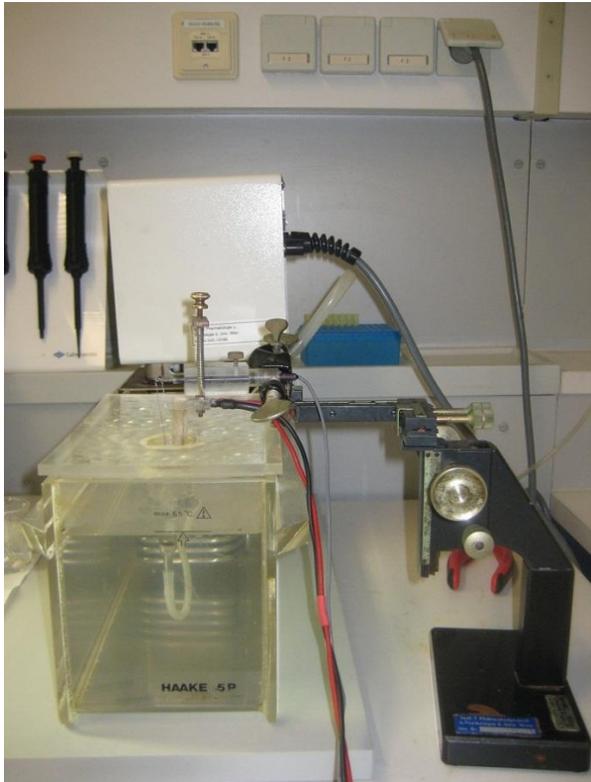
Nun konnte es vorkommen, dass es zu Kontraktionen kam obwohl das Reizgerät noch gar nicht zugeschaltet war. Dieses Phänomen war ein Zeichen dafür dass noch nicht entfernte Purkinjefasern vorhanden waren. Diese mussten vor Fortsetzung des Versuchs entfernt werden. Die Reize wurden in Form Rechteckimpulsen von  $10 \text{ ms}^{-1}$  bei einer Frequenz von 1 Hertz ausgesendet. Die eingebrachte Stromstärke wurde über eine Isolation Unit geregelt. Diese lag in etwa 10 % über der minimalen Reizschwelle. Es galt diese weitgehend einzuhalten, da es bei einer zu hohen Stromstärke zu einer Ausschüttung und Erschöpfung der Catecholaminspeicher kommen könnte, was in weiterer Folge zu einer Verfälschung der Versuchsergebnisse führen könnte (Furchgott et al. 1959).

Die Änderung der Inotropie konnte durch eine Abnahme der Amplitudenlänge des sich kontrahieren Papillarmuskels festgestellt werden.

Der Versuchsverlauf erfolgte ähnlich dem des rechten Vorhofs. Sowohl die Einstellung des Schreibers bezüglich Geschwindigkeit, als auch die Zeit für Kontrollphase und Aufzeichnungen entsprachen den Angaben des Atrium Dexter. Gemessen wurde jedoch nicht 12 Sekunden lang, sondern es wurde eine bestimmte Anzahl von Amplituden aufgezeichnet.

Mesung und Wirkstoffzugaben entsprachen dem gewohnten Schema.

Abbildung 10: Originalabbildung des Musculus papillaris in der Apparatur 1



### 3.6.1.3. Terminales Ileum

Das bereits mit 2 Silberhaken präparierte Darmstück wurde gleich dem Vorhof in die Apparatur 2 eingespannt (ebenfalls bei 5mV / Speed 5mm/sec). Der Unterschied lag in der Vorspannung, diese betrug beim Darm 4,92 mN.

Nach Aktivierung der Geräts und Justierung des Schreibers auf den Nullpunkt erfolgte eine 20-minütige Gewöhnungsphase. In dieser Phase entspannte sich der Darm und gewöhnte sich an die neuen Bedingungen.

Als nächster Schritt wurde das Organ, nach Ablassen der Tyrode, mit 25ml einer frisch zubereiteten 60 mmolaren Kaliumchloridlösung (450mg KCl in 100ml Tyrode) versetzt, um es chemisch zu reizen. Dabei kam es zu einer sofortigen starken Kontraktion, die jedoch schnell wieder abnahm und sich schließlich zwischen Nullpunkt und höchster Kontraktion einpendelte. Sobald eine konstante

Plateauphase erreicht wurde, konnte man mit der ersten Konzentration nach dem Pipettierschema von Kapitel 3.1.2. beginnen und im 45-minütigen Abstand weiter pipettieren.

Abbildung 11: Originalabbildung des terminalen Ileums



#### **3.6.1.4. Aorta descendens**

Die bereits gereinigte und ringförmig geschnittene Aorta (Kapitel 3.4.1.6.) wurde wie in Kapitel 3.5.2. in die Apparatur 2 eingespannt. Nachdem die Geräte eingeschaltet wurden und die Aorta bei 10mV auf 10 cm vorgespannt wurde, folgte wie beim terminalen Ileums eine 20-minütige Gewöhnungsphase. Nach Beendigung dieser Zeit, wurde das Gerät auf 5 mV herabgesetzt, der Schreiber wieder auf den Nullpunkt justiert und die Tyrode wie üblich ausgelassen. Hier erfolgte für die chemische Reizung die Zugabe einer 90mmolaren Kaliumchloridlösung (670mg in 100ml Tyrode). Nach Erreichen einer Plateauphase konnte nach bekanntem Pipettierschema wie üblich weiter gearbeitet werden.

Abbildung 12: Originalabbildung der Aorta descendens



### 3.6.1.5. Arteria pulmonalis

Wie bereits bei der Aorta beschrieben, wurde auch die ringförmige Arteria pulmonalis mit Hilfe der zwei Silberdrähte durch einfaches Einfädeln eingespannt und bei 5mV 10cm vorgespannt. Auch hier wurde eine 90mmolare Kaliumchloridlösung verwendet um eine chemische Reizung und somit eine folgende Kontraktion zu erzielen. Ansonsten wurde in gleicher Art und Weise die Abnahme der maximalen Kontraktion durch die Testsubstanzen gemessen.

Abbildung 13: Originalabbildung der Arteria pulmonalis



### 3.6.2. Untersuchung des Wirkmechanismus von MAH 46.HCl an der Arteria pulmonalis

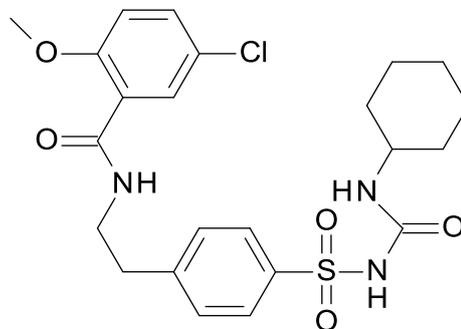
Die Untersuchung des Wirkmechanismus mit Hilfe von Glibenclamid unterschied sich nicht sehr Wesentlich von den vorigen beschriebenen Versuchen.

Die Arteria pulmonalis wurde wie gewohnt bei 5 mV /Speed 5mm/sec und 10cm Vorspannung in die Apparatur 2 eingespannt und nach einer 20-minütigen Gewöhnungsphase mit 90 mmolarer KCl gereizt. Nach Erreichen einer Konstanz wurde zuerst 100 µmol/l Glibenclamid zugefügt. Nach einer 45-minütigen Einwirkzeit, wurde die ganze Konzentration der Testsubstanz, sprich ebenfalls 100 µmol/l, injiziert. Nach weiteren 45 Minuten Einwirkzeit, war der Versuch zu Ende. Nähere Informationen zur Auswertung folgen in Kapitel 4.

#### Glibenclamid

Abbildung 14: Strukturformel

MG = 494,0 g/mol



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

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

Unerwünschte Nebenwirkungen sind vor allem gastrointestinale Beschwerden und allergische Reaktionen. Im Gegensatz zu allen physiologischen Stimulatoren der Insulinsekretion können Sulfonylharnstoffe und ihre Analoga sowohl bei

Stoffwechselgesunden als auch Typ-2 Diabetikern schwere Hypoglykämien auslösen (Forth et al. 2009)

## **3.7. Auswertung der Daten und Statistik**

### **3.7.1. Atrium Dexter**

Beim rechten Vorhof wurde durch die vorgenommenen Messungen die Schlagfrequenz (Chronotropie) des Sinusknoten festgestellt. Die Präparation, als auch die Durchführung des Versuchs wurden bereits in Kapitel 3.4.1.2. bzw. 3.6.1.1. beschrieben.

Nach jeder Zugabe einer Konzentration nach bekanntem Pipettierschema wurde alle 5 Minuten für 12 Sekunden die Schlagfrequenz gemessen, mit 5 multipliziert (entspricht somit einer Minute) und gezählt. Nach kumulativer Zugabe aller Konzentrationen (siehe Pipettierschema Kapitel 3.1.2.) konnte eine positive, negative oder gleichbleibende Chronotropie festgestellt werden. Dazu sah man den Kontrollwert (ohne Zugabe der Substanz) mit 100% an und errechnete sich in Folge die geänderte Schlagfrequenz in Prozent aus. Die Messungen erfolgten bei 5mV oder 2mV.

### **3.7.2. Musculus papillaris**

Im Gegensatz zum rechten Vorhof wurde bei diesem Versuch die Schlagkraft (Inotropie) gemessen. Präparation und Methodik wurden in den Kapitel 3.4.1.4. und 3.6.1.2. detailliert erläutert.

Vergleichbar mit dem rechten Vorhof bleibt der Vorgang der Messung: alle 5 Minuten wurde ca. 12 Sekunden lang die Schlagkraft gemessen. Dies entsprach etwa 6 bis 7 Amplituden, deren Länge anschließend mit einem Lineal abgemessen wurden. Der Kontrollwert wurde auch hier mit 100% angesehen und somit konnte die Abnahme der gemessenen Amplituden wieder prozentual ausgedrückt werden.

Die Versuche wurden bei 5mV oder 2mV durchgeführt, wobei man die erhaltenen Werte mit 0,98 (5mV) bzw. 0,4 (2mV) multiplizieren musste.

### **3.7.3. Aorta descendens, Arteria pulmonalis, terminales Ileum**

Bei allen drei Präparaten wurde eine mögliche Relaxation der glatten Muskulatur gemessen und somit eine resultierende dilatierende bzw. spasmolytische Wirkung festgestellt.

Versuchsanordnungen und,- techniken findet man in den Kapitel. 3.4.1.3., 3.4.1.5., 3.4.1.6. bzw. 3.6.1.3., 3.6.1.4. und 3.6.1.5.

Zuerst wurden die diversen Organe durch Zugabe einer Kaliumchloridlösung maximal kontrahiert um eine folgende Relaxation überhaupt messbar zu machen.

Nach Erreichen einer Konstanz konnte mit der Zugabe der Testsubstanz nach dem üblichen Pipettierschema begonnen werden.

Dazu markierte man sich jeweils den Zeitpunkt der Substanzzugabe.

Die Plateauphase vor der ersten Wirkstoffzugabe diente wieder als 100%iger Referenzwert und konnte somit nach jeder Konzentrationserhöhung eine mögliche Veränderung vergleichbar machen. Diese machte sich durch Verringerung des Abstands zur Nulllinie sichtbar und konnte somit wieder in Prozent ausgedrückt werden.

Die Messungen erfolgten meist bei 5mV und mussten ebenfalls mit dem Faktor 0,98 multipliziert werden.

### **3.7.4. Statistik**

Zur statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse wurden die Mittelwerte der Messwerte und deren Standardfehler (SEM, standard error of mean) berechnet.

Benötigte statistische Daten, wie  $EC_{50}$ , konnten mit Hilfe des Programms „Sigma-Plot 9.0“ ermittelt werden.

Zusätzlich wurde über den „Student-t-Test“ für gepaarte Beobachtung die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) berechnet um die Signifikanz der Ergebnisse zu überprüfen. Werte von  $< 5\%$  ( $P < 0,05$ ) und  $< 1\%$  ( $P < 0,01$ ) waren signifikant, Werte kleiner als  $0,1\%$  ( $P < 0,001$ ) hochsignifikant.

# 4. Ergebnisse

## 4.1. Ergebnisse der Testsubstanz MAH 46.HCl

### 4.1.1. Atrium Dexter

Präparation als auch Methodik zur Untersuchung des rechten Vorhofs wurden bereits in den Kapitel 3.4.1.2. bzw. 3.6.1.1. erläutert.

Um die in Kapitel 3.7.1. bereits erwähnte Chronotropie des Sinusknoten zu messen und auszuwerten, wurden 4 Versuche durchgeführt. Die Änderung der Schlagfrequenz nach Substanzzugabe gab Auskunft über die Wirkung der Testsubstanz MAH 46.HCl.

Die 4 Versuche erfolgten in Apparatur 2 nach dem gewohnten Pipettierschema mit den Konzentrationen von 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$ .

Zu erkennen ist eine Abnahme von 68 Schlägen pro Minute bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$ . Eine rasante Reduktion der Schlagfrequenz erfolgte wie in Tabelle 13 ersichtlich erst bei der letzten Konzentrationsstufe, hier liegt der Effekt bei  $-33,09\% \pm 3,77$ .

Eine  $\text{EC}_{50}$  konnte somit nicht erreicht werden.

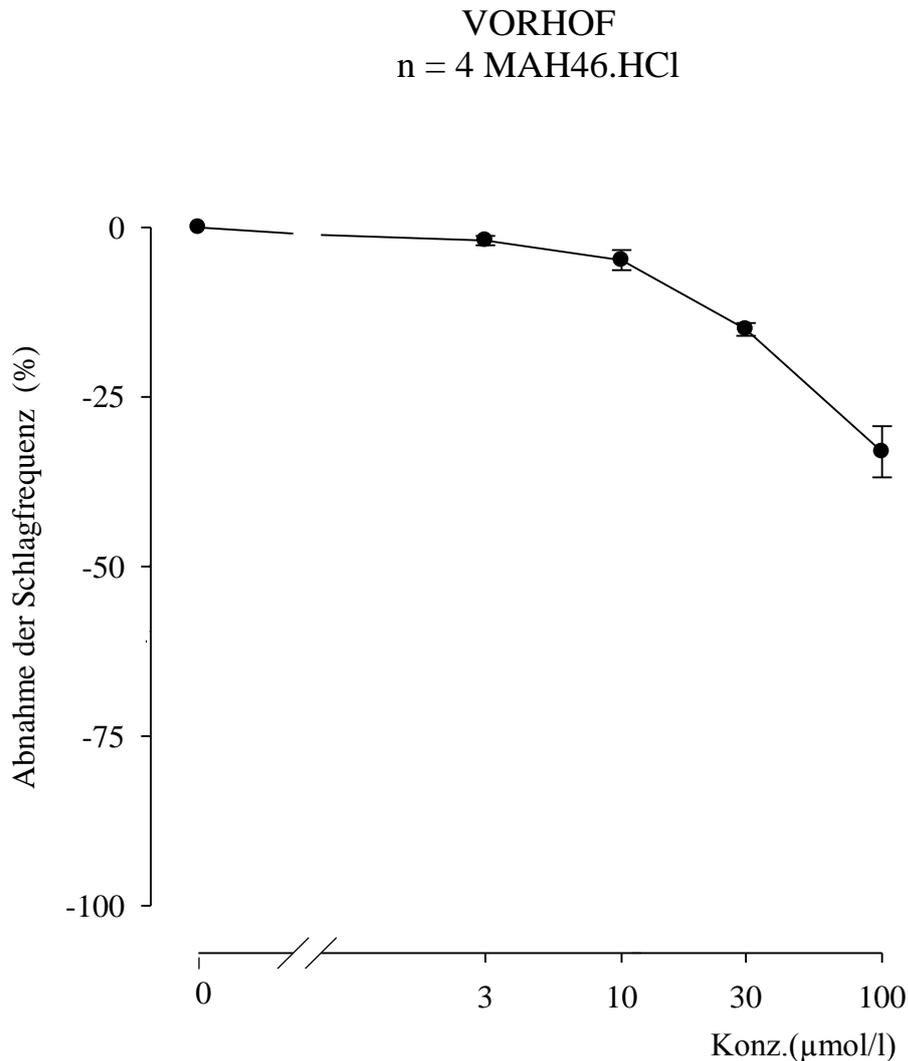
Tabelle 5: Versuchsergebnisse von MAH 46.HCl am rechten Vorhof

| <b>MAH<br/>46.HCl<br/>µmol/l</b> | <b>f ± SEM<br/>(x/min)</b> | <b>f ± SEM<br/>(%)</b> | <b>Anzahl<br/>der<br/>Versuche<br/>n</b> | <b>Irrtums-<br/>Wahrscheinlichkeit<br/>(P)</b> |
|----------------------------------|----------------------------|------------------------|--|--|
| Kontrolle                        | 200 ± 3,08                 | 0 ± 0                  | 4  | ---  |
| 3                                | 196 ± 3,12                 | -1,94 ± 0,69           | 4  | n.s.   |
| 10                               | 190 ± 2,71                 | -4,83 ± 1,49           | 4  | n.s.   |
| 30                               | 170 ± 2,68                 | -15,04 ± 0,95          | 4  | 0,05   |
| 100                              | 132 ± 1,50                 | -33,09 ± 3,77          | 4  | 0,05   |

Legende zu Tabelle 5:

In der Tabelle ist der arithmetische Mittelwert der Schlaganzahl (f) pro Minute ersichtlich, als auch die festgestellte Abnahme der Schlagfrequenz. Zusätzlich sind die jeweiligen Standardfehler für jede Konzentrationsstufe angegeben. Die Anzahl der Versuche wird mit n angegeben.

Diagramm1: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MAH 46.HCl am rechten Vorhof



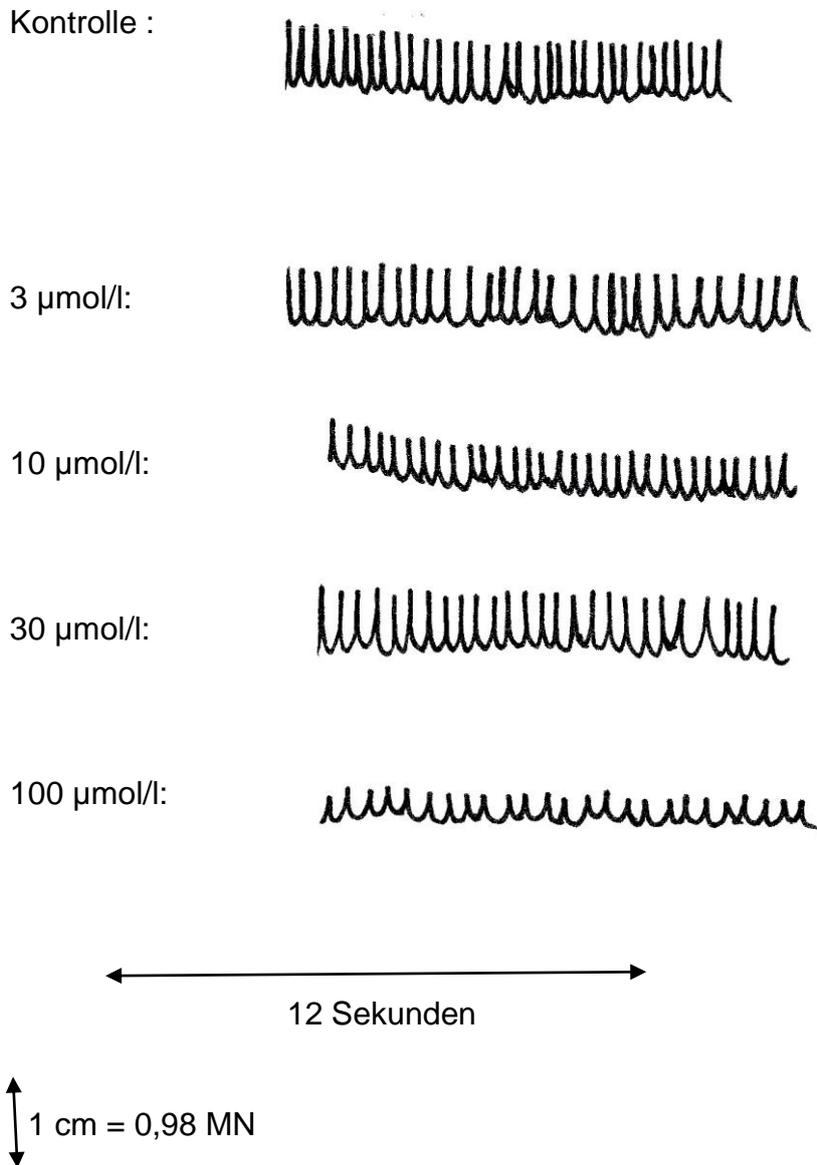
Legende zu Diagramm 1:

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigt den Zusammenhang zwischen Substanzkonzentration und der damit verbundenen Abnahme der Schlagfrequenz.

Auf der x-Achse sind die Substanzkonzentrationen logarithmisch aufgetragen, auf der y-Achse die prozentuale Abnahme der Chronotropie.

Die Punkte in diesem Diagramm markieren die Mittelwerte der gemessenen Schlagfrequenz nach jeder Substanzzugabe. Die Balken, die senkrecht durch die Punkte laufen, geben die dazugehörige Standardabweichung an.

Abbildung 15: Originalaufzeichnung der chronotropen Wirkung von MAH 46.HCl



Legende zu Abbildung 15:

Diese Originalaufzeichnung zeigt noch einmal den Verlauf der negativen chronotropen Wirkung der Testsubstanz.

Die Abnahme ist hier durch Reduktion der Amplitudenanzahl erkennbar.

### 4.1.2. Musculus papillaris

In Kapitel 3.4.1.2. und 3.6.1.2. wurden die Techniken der Präparation und Versuchsdurchführung bereits beschrieben, sowie die wichtigen Auswertungspunkte in Kapitel 3.7.2.

Für die Untersuchung der inotropen Wirkungen der Testsubstanz MAH 46.HCl wurden in der Apparatur 1 fünf Versuche durchgeführt.

Die negative Inotropie ist durch verringerte Kontraktionsfähigkeit des Papillarmuskels nach Substanzzugabe erkennbar. Diese äußerte sich durch Veränderung der Amplitudenlänge, die in mm gemessen wurde.

In Tabelle 6 ist eine starke negative inotrope Wirkung deutlich sehbar. Diese äußert sich bereits bei Zugabe der zweiten Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  mit einer prozentualen Wirksamkeit von  $-43,26 \% \pm 8,43$ .

Die letzte Konzentrationstufe von 100  $\mu\text{mol/l}$  wies einen Effekt von  $-82,27 \pm 4,55$  auf. Ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert konnte bei 14,5  $\mu\text{mol/l}$  erreicht werden.

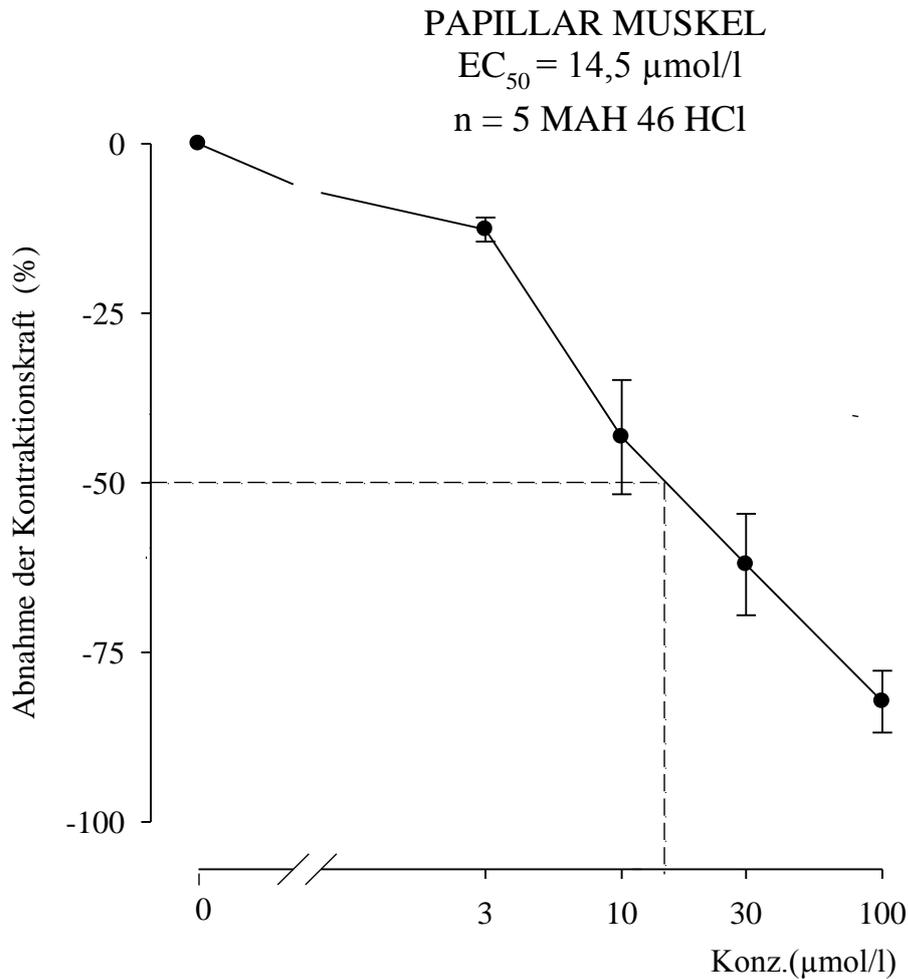
Tabelle 6: Versuchsergebnisse von MAH 46.HCl am Papillarmuskel

| <b>MAH<br/>46.HCl<br/><math>\mu\text{mol/l}</math></b> | <b><math>f_c \pm \text{SEM}</math><br/>(mN)</b> | <b><math>f_c \pm \text{SEM}</math><br/>(%)</b> | <b>Anzahl<br/>der<br/>Versuche<br/>n</b> | <b>Irrtums-<br/>Wahrscheinlichkeit<br/>(P)</b> |
|--|---|--|--|--|
| Kontrolle  | $17,17 \pm 3,09$                                | $0 \pm 0$                                      | 5  | ---  |
| 3  | $15,07 \pm 2,77$                                | $-12,65 \pm 1,78$                              | 5  | 0,05   |
| 10   | $8,94 \pm 1,52$                                 | $-43,26 \pm 8,43$                              | 5  | 0,01   |
| 30   | $6,04 \pm 1,49$                                 | $-62,05 \pm 7,48$                              | 5  | 0,001  |
| 100  | $3,14 \pm 1,21$                                 | $-82,27 \pm 4,55$                              | 5  | 0,001  |

Legende zu Tabelle 6:

Der arithmetische Mittelwert der Inotropie sam Standardfehler (SEM), sowie die prozentuale Abnahme der Schlagkraft nach jeder Substanzzugabe, als auch die Irrtumswahrscheinlichkeit werden in dieser Tabelle dargestellt.

Diagramm 2: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MAH 46.HCl am Papillarmuskel



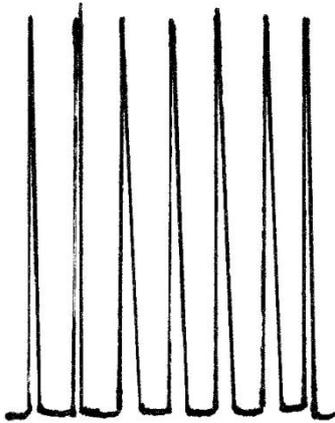
Legende zu Diagramm 2:

Das Diagramm erläutert graphisch die Beziehung zwischen der prozentualen Abnahme der Schlagkraft und der jeweiligen Konzentration der Testsubstanz. Die Punkte markieren die arithmetischen Mittelwerte der Testergebnisse, die Balken die dazugehörigen Standardabweichungen.

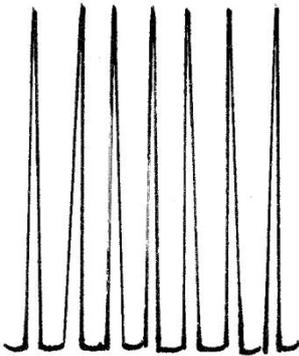
Unweigerlich zu erkennen ist der  $EC_{50}$ -Wert, der bereits bei einer Konzentration von  $14,5 \mu\text{mol/l}$  erreicht wird.

Abbildung 16: Originalaufzeichnung der inotropen Wirkung von MAH 46.HCl

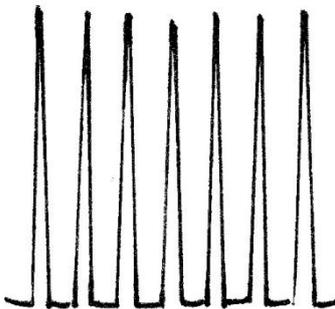
Kontrolle:



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



10  $\mu\text{mol/l}$ :



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



100  $\mu\text{mol/l}$ :



↑  
↓  
1 cm = 0,98 MN

Legende zu Abbildung 16:

Die stark negative inotrope Wirkung der Testsubstanz MAH 46.HCl ist in dieser Abbildung durch Verkürzung der Amplitudenlänge zu erkennen. Diese ist bei einer Konzentration von 14,5  $\mu\text{mol/l}$  bereits auf die Hälfte reduziert.

### 4.1.3. Aorta descendens

Um eine mögliche dilatierende Wirkung an der Aorta zu untersuchen wurde diese nach Kapitel 3.4.1.6. präpariert und vier Versuche nach Kapitel 3.6.1.4. in der Apparatur 2 durchgeführt.

Nach der maximalen Kontraktion durch Zugabe von einer Kaliumchloridlösung, wurde die Testsubstanz MAH 46.HCl nach dem gewohnten Pipettierschema zugefügt und die daraus resultierende Relaxation der glatten Muskulatur durch eine Abnahme des Abstands zur Nulllinie vermessen.

Die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktionskraft einer jeden Konzentration wurden berechnet und in Prozent zum 100%igen Kontrollwert angegeben. Bei einer Konzentration von 100µmol/l kam es zu lediglich zu einem Effekt von  $-16,29 \pm 6,3$ .

Ein  $EC_{50}$ -Wert konnte folglich nicht erreicht werden.

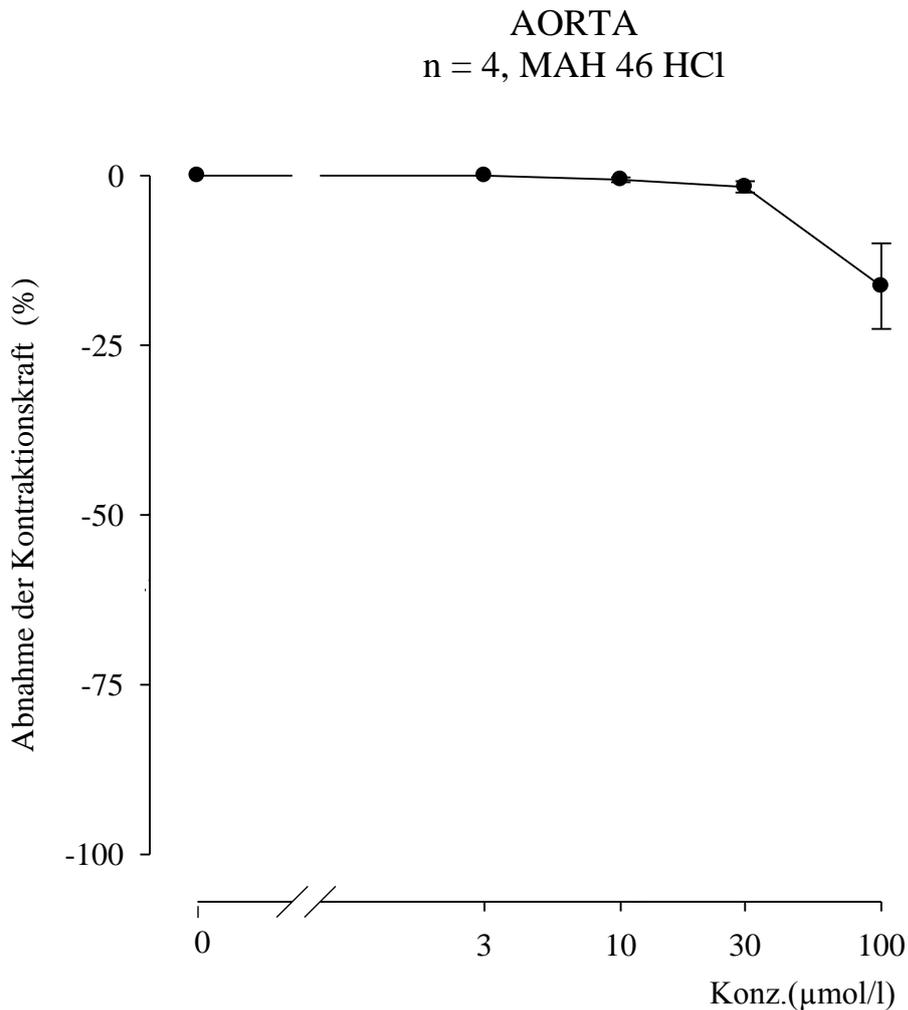
Tabelle 7: Versuchsergebnisse von MAH 46.HCL an der Aorta

| MAH<br>46.HCL<br>µmol/l | $f_c \pm SEM$<br>(mN) | $f_c \pm SEM$<br>(%) | Anzahl<br>der<br>Versuche<br>n | Irrtums-<br>Wahrscheinlichkeit<br>(P) |
|-------------------------|-----------------------|----------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| Kontrolle               | $10,46 \pm 1,57$      | $0 \pm 0$            | 4                              | ---                                   |
| 3                       | $10,46 \pm 1,57$      | $0 \pm 0$            | 4                              | n.s.                                  |
| 10                      | $10,44 \pm 1,58$      | $-0,62 \pm 0,36$     | 4                              | n.s.                                  |
| 30                      | $10,32 \pm 1,61$      | $-1,67 \pm 0,84$     | 4                              | n.s.                                  |
| 100                     | $8,90 \pm 1,69$       | $-16,29 \pm 6,3$     | 4                              | 0,05                                  |

Legende zu Tabelle 7:

In dieser Darstellung sind die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardfehler angegeben.  $f_c$  steht hier für die Kontraktionskraft in mN. Ebenso ist der prozentuale Wert im Vergleich zur Referenz angegeben.

Diagramm 3: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MAH 46.HCl auf die Aorta



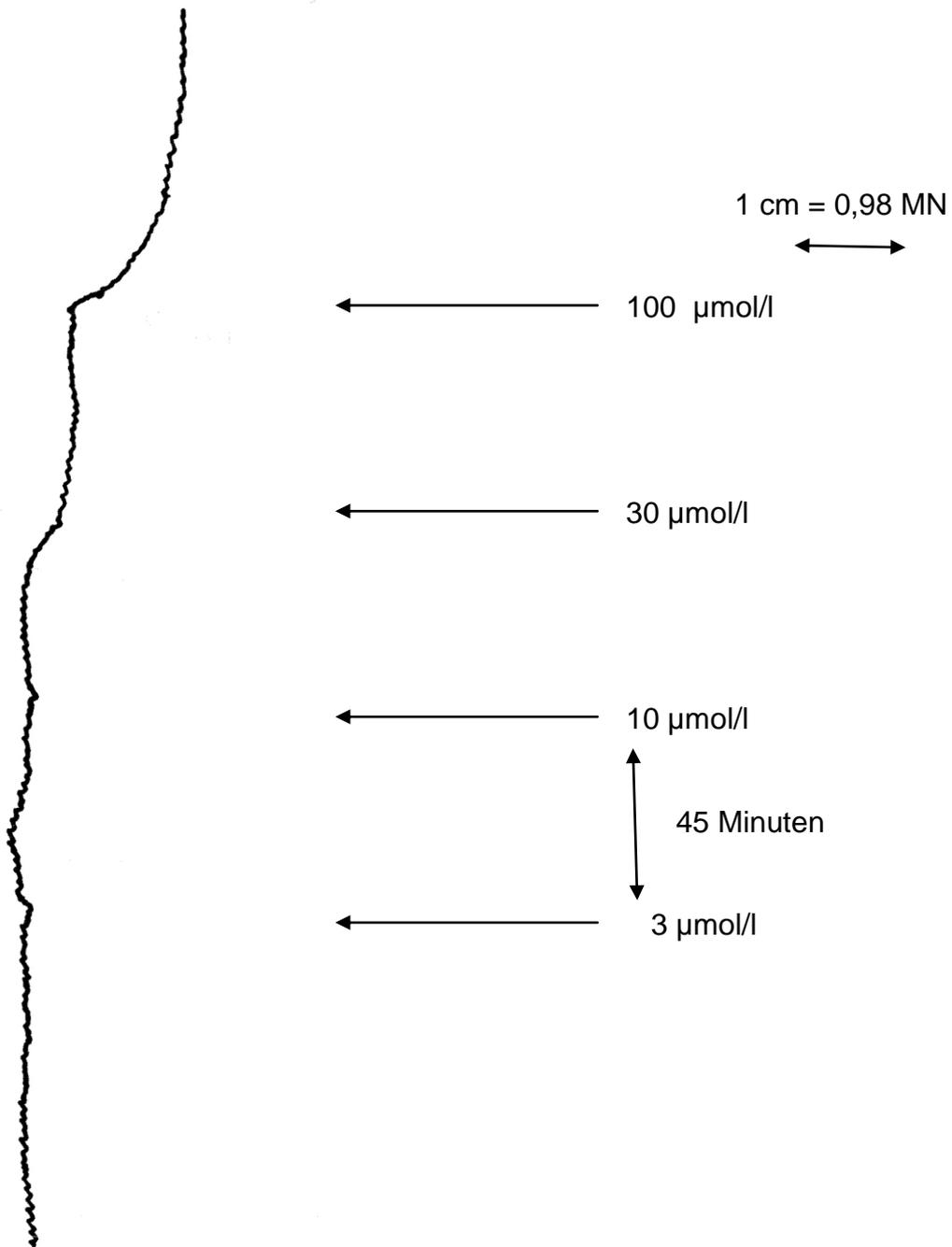
Legende zu Diagramm 3:

Auch dieser Graph zeigt schematisch den Zusammenhang zwischen Konzentration der Testsubstanz und der Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent.

Die Punkte stellen die Mittelwerte der jeweiligen Kontraktionskraft dar, die Balken die Standardabweichungen dazu.

Zu erkennen ist, dass bis zu einer Konzentration von 30 µmol/l, die Werte sich nicht wesentlich vom Ausgangswert unterscheiden. Auch danach kommt es nur zu einer leichten Relaxation der Gefäßmuskulatur.

Abbildung 17: Originalabbildung der dilatierenden Wirkung an der Aorta descendens



Legende zu Abbildung 17:

Nach dem Erreichen einer Konstanz wurde mit der Zugabe der festgelegten Substanzmenge begonnen.

Es lässt sich eine sehr leichte Abnahme der Kontraktionskraft bei der Injektion von 30 µmol/l erkennen.

#### 4.1.4. Arteria pulmonalis

In vier Versuchen wurde die dilatierende Wirkung der Arteria pulmonalis untersucht. Präparationstechnik und Versuchsanordnung sind aus den Kapitel 3.4.1.3. und Kapitel 3.6.1.5. bekannt.

Die maximale Kontraktion wurde durch Zugabe einer 90mmolaren Kaliumchloridlösung erreicht, der sich eine 45-minütige Gewöhnungsphase anschließt.

Nach Erreichen einer Plateauphase konnte nach bekanntem Pipettierschema (3, 10, 30, 100  $\mu\text{mol/l}$ ) mit der Zugabe des Wirkstoffes begonnen werden.

Aus den fünf Versuchen ergaben sich Mittelwerte des Kontrollwerts und der vier Konzentrationen samt Standardabweichung.

Die relaxierende Wirkung von MAH 46.HCl konnte bereits bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  festgestellt werden und konnte durch kumulative Zugabe erhöht werden. Bei der Konzentrationsstufe von 100  $\mu\text{mol/l}$  ergab sich ein Effekt von  $-34,82 \pm 5,32$ , verglichen mit dem Referenzwert. Ein  $\text{EC}_{50}$  blieb infolgedessen aus.

Tabelle 8: Versuchsergebnisse von MAH 46.HCl an der Lungenarterie

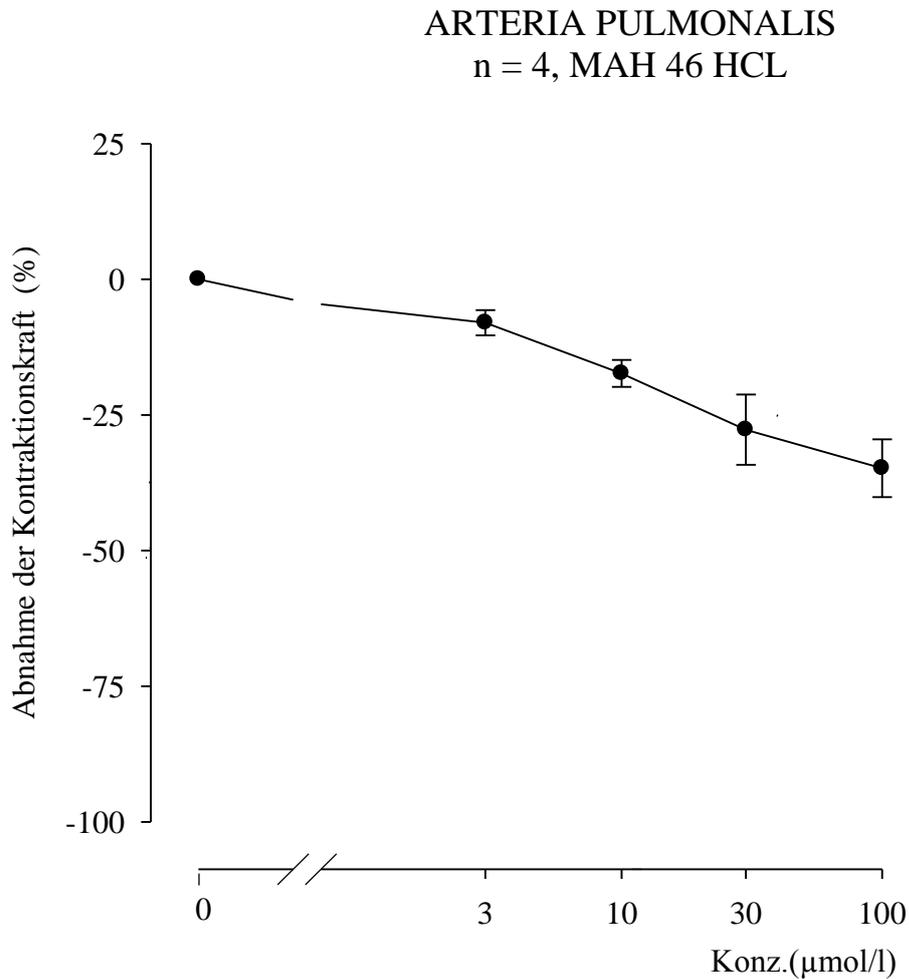
| <b>MAH<br/>46.HCL<br/>µmol/l</b> | <b>f<sub>c</sub> ± SEM<br/>(mN)</b> | <b>f<sub>c</sub> ± SEM<br/>(%)</b> | <b>Anzahl<br/>der<br/>Versuche<br/>n</b> | <b>Irrtums-<br/>Wahrscheinlichkeit<br/>(P)</b> |
|----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--|--|
| Kontrolle                        | 6,88 ± 1,16                         | 0 ± 0                              | 4  | ---  |
| 3                                | 6,35 ± 1,21                         | -8,00 ± 2,33                       | 4  | n.s.   |
| 10                               | 5,71 ± 0,97                         | -17,35 ± 2,49                      | 4  | 0,05   |
| 30                               | 5,07 ± 1,07                         | -27,72 ± 6,47                      | 4  | 0,05   |
| 100                              | 4,66 ± 65,18                        | -34,82 ± 5,32                      | 4  | 0,05   |

Legende zu Tabelle 8:

In dieser Tabelle ist für jede Konzentration aus vier Versuchen der berechnete Mittelwert der Kontraktionskraft samt Standardfehler dargestellt.

Die Abnahme wird wieder prozentual zum Kontrollwert angegeben.

Diagramm 4: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH 46.HCl an der Lungenarterie

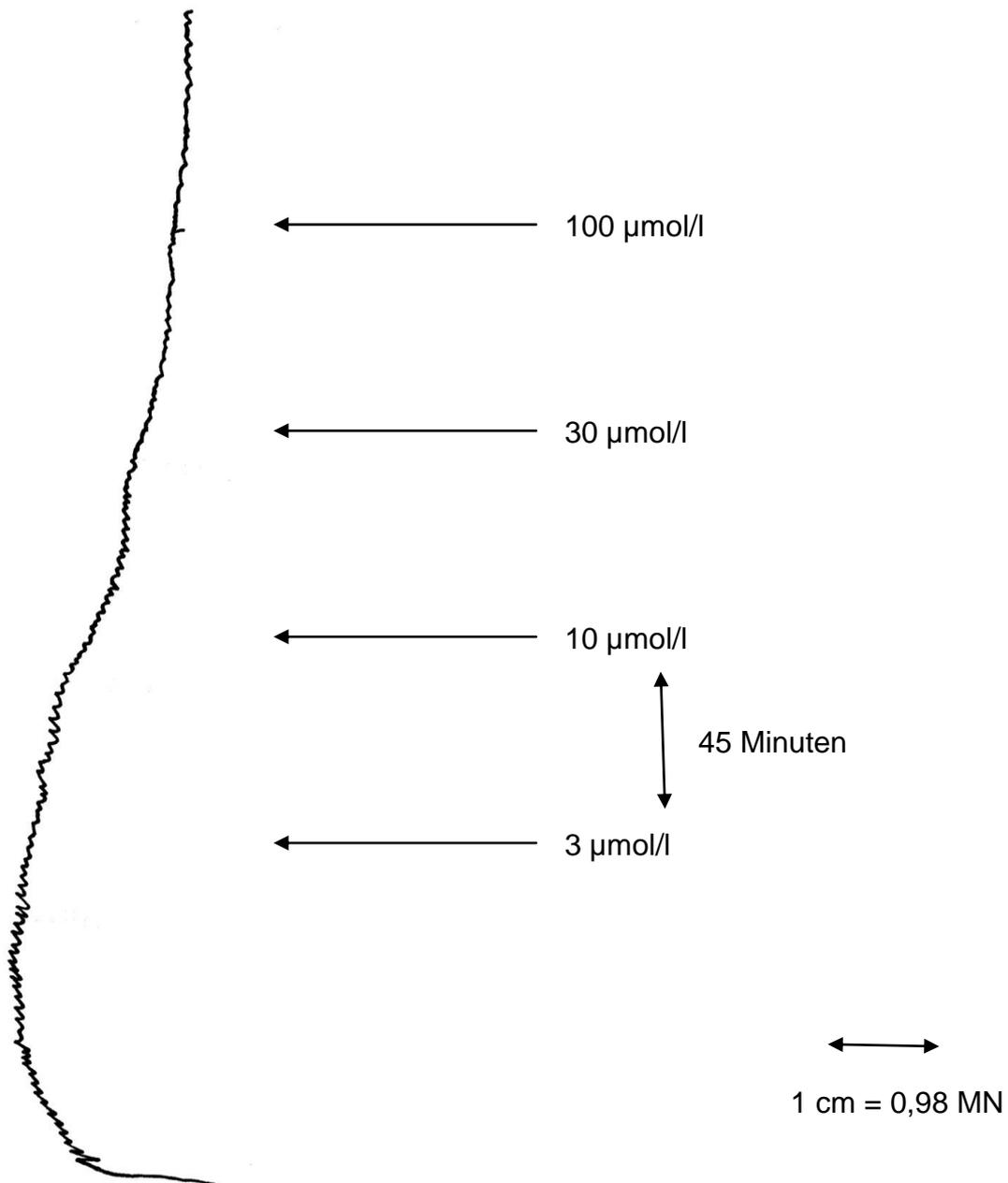


Legende zu Diagramm 4:

Die Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung an der Lungenarterie wurde auch hier mit Hilfe der arithmetischen Mittelwerte samt Standardfehler graphisch dargestellt.

Trotz der sehr schwachen Wirkung an der Aorta (siehe Kapitel 4.1.3.) konnte hier eine stärkere Relaxation der glatten Muskulatur beobachtet werden. Eine  $EC_{50}$ -Wert wurde jedoch nicht erreicht.

Abbildung 18: Originalaufzeichnung der dilatierenden Wirkung an der Arteria pulmonalis



Legende zur Abbildung 18:

Nach Erreichen der Plateauphase wurde mit der Injektion der Testsubstanz MAH 46.HCl begonnen.

Deutlich lässt sich eine Abnahme der Kontraktionskraft ab einer Konzentration von 3 µmol/l erkennen. Eine  $EC_{50}$  konnte jedoch auch bei einer Konzentration von 100 µmol/l nicht erreicht werden.

#### 4.1.5. Terminales Ileum

Um die Wirkung auf das terminale Ileum bzw. seiner glatten Muskulatur zu untersuchen, wurden vier Versuche in der Apparatur 2 durchgeführt. Präparation und Durchführung der Versuche sind in Kapitel 3.4.1.5. und Kapitel 3.6.1.3. näher erläutert.

Eine mögliche dilatierende bzw. spasmolytische Wirkung konnte ähnlich wie bei den Versuchen an der Aorta oder an der Lungenarterie nach maximaler Kontraktion mit Hilfe einer 60mmolaren Kaliumchloridlösung überprüft werden. Dieser äußerte sich wieder durch Verringerung des Abstands zur Nulllinie am Schreiber.

Ähnlich stark dilatierend wie an der Lungenarterie wirkte die Substanz auf das terminale Ileum. Bei Injektion von 100  $\mu\text{mol/l}$  des Wirkstoffes kam es zu einer 28,10%igen Abnahme der maximalen Kontraktion. Auch in diesem Falle konnte kein  $\text{EC}_{50}$ -Wert erzielt werden.

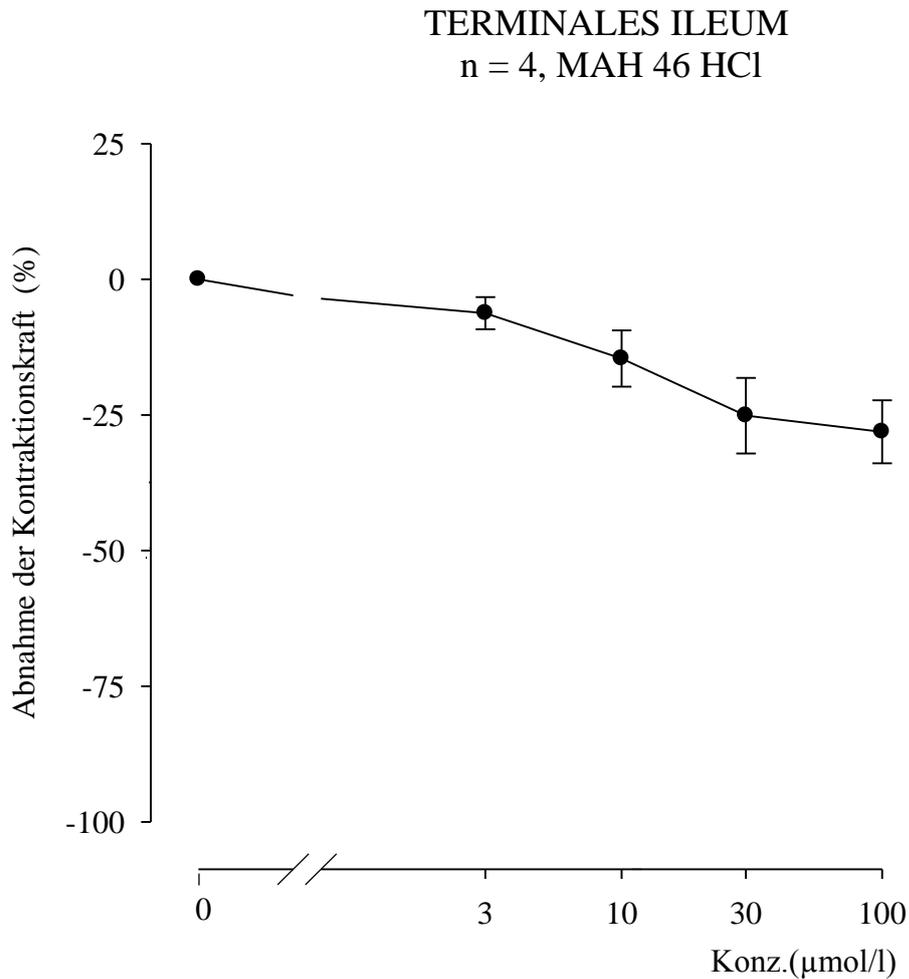
Tabelle 9: Versuchsergebnisse von MAH 46.HCL am Dünndarm

| <b>MAH<br/>46.HCl<br/>μmol/l</b> | <b>f<sub>c</sub> ± SEM<br/>(mN)</b> | <b>f<sub>c</sub> ± SEM<br/>(%)</b> | <b>Anzahl<br/>der<br/>Versuche<br/>n</b> | <b>Irrtums-<br/>Wahrscheinlichkeit<br/>(P)</b> |
|----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--|--|
| Kontrolle                        | 8,57 ± 0,93                         | 0 ± 0                              | 4  | ---  |
| 3                                | 8,05 ± 0,93                         | -6,24 ± 2,98                       | 4  | n.s.   |
| 10                               | 7,40 ± 1,07                         | -14,59 ± 5,19                      | 4  | 0,05   |
| 30                               | 6,48 ± 1,04                         | -25,12 ± 6,97                      | 4  | 0,05   |
| 100                              | 6,45 ± 1,14                         | -28,10 ± 5,81                      | 4  | 0,05   |

Legende zu Tabelle 9:

Die Ergebnisse der Kontraktionskraft nach jeder Substanzzugabe wurde gemittelt und sind hier samt Standardfehler angegeben. Auch die prozentuale Abnahme der Kontraktionskraft in Bezug auf den Kontrollwert ist ersichtlich.

Diagramm 5: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH 46.HCl am terminalen Ileum

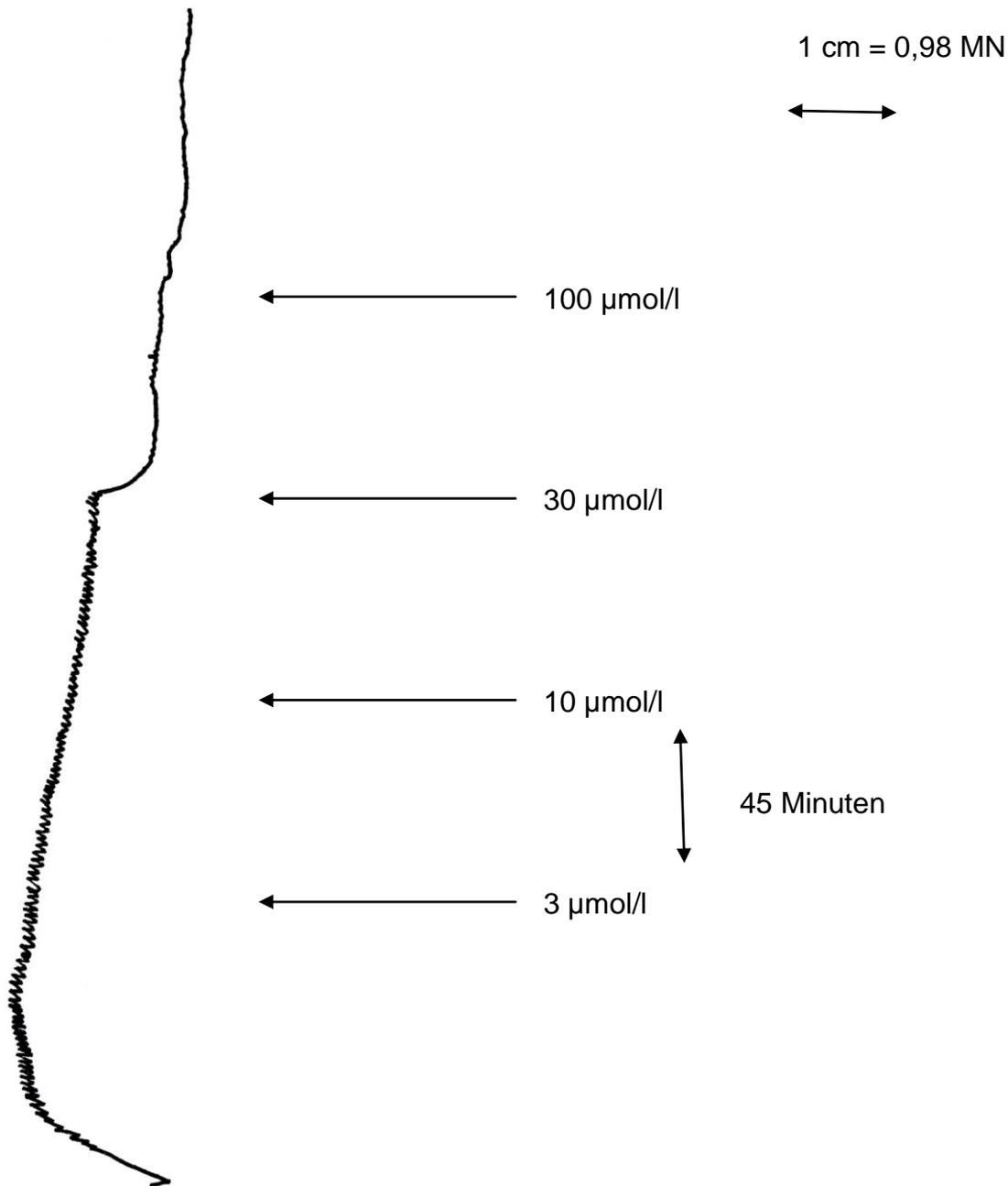


Legende zu Diagramm 5:

Die abnehmende Kontraktionskraft des terminalen Ileums ist hier im Zusammenhang mit der Substanzkonzentration angegeben. Die Punkte markieren die jeweiligen Mittelwerte der Kontraktionskräfte, die Balken wiederum die Standardfehler.

Es konnte kein  $EC_{50}$  erreicht werden, jedoch ist deutlich eine Abnahme der Kontraktionskraft ab einer Konzentration von 10 µmol/l erkennbar.

Abbildung 19: Originalaufzeichnung der spasmolytischen Wirkung des terminalen Ileums



Legende zu Abbildung 19:

Der Kurvenverlauf zeigt die spasmolytische Wirkung von MAH 46.HCl auf das terminale Ileum. Nach der Plateaubildung wurde nach dem Pipettierschema begonnen die Substanz zu injizieren. Die Kurve zeigt eine regelmäßige Abnahme der Kontraktionskraft, jedoch konnte keine  $EC_{50}$  erreicht werden.

## **4.2.Versuche zur Analyse des Wirkmechanismus der Testsubstanz MAH 46.HCL auf die Arteria pulmonalis**

Auf Grund der Erkenntnis, dass die Wirkung der Testsubstanz MAH 46.HCl auf der Arteria pulmonalis, der Lungenarterie, am stärksten und effektivsten war, wurden weitere Versuche daran durchgeführt um den genauen Wirkmechanismus zu erforschen.

Dafür wurde die Substanz Glibenclamid, ein Kaliumkanalblocker, verwendet, die in Kapitel 3.6.2. näher vorgestellt wird.

### **Wirkung von Glibenclamid auf die Arteria pulmonalis**

In den drei dafür durchgeführten Versuchen galt es herauszufinden, ob der Kaliumkanalblocker Glibenclamid in der Lage ist den vasodilatierenden Effekt von MAH 46.HCl an der glatten Muskulatur, speziell an der Arteria pulmonalis, zu antagonisieren.

Dazu wurden nach maximaler Kontraktion mit 90mmolarer Kaliumchloridlösung und Erreichen der Plateauphase 100  $\mu\text{mol/l}$  injiziert um somit eine vollständige Blockade der Kaliumkanäle zu erreichen. Anschließend wurde die identische Konzentration (100  $\mu\text{mol/l}$ ) Testsubstanz hinzugefügt um eine mögliche Antagonisierung von Glibenclamid zu überprüfen. Dadurch wäre der Wirkmechanismus auf Öffnung der entsprechenden ATP-abhängigen Kaliumkanäle zurückzuführen.

Im Falle von MAH 46.HCl konnte kaum ein Unterschied zwischen der Wirkung von Glibenclamid allein und der Kombination von Glibenclamid mit dem Wirkstoff festgestellt werden. Dies ist deutlich im Balkendiagramm sichtbar.

Dadurch kann gesagt werden, dass der zu Grunde liegende Wirkmechanismus von MAH 46.HCl auf die Arteria pulmonalis unter anderem die Öffnung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle ist.

Dies lässt die Frage offen ob auch andere Vorgänge oder Mechanismen daran beteiligt sind. Andere Möglichkeiten wären die Aktivierung des NO-Systems oder

eine sympathische Regulation der Gefäße. Dazu wären weitere Versuche bzgl. einer Mitwirkung notwendig.

Fakt ist, dass durch die Antagonisierung des Kaliumkanalblockers Glibenclamid eine Beteiligung der Kaliumkanäle an der Wirkung von MAH 46.HCl sehr wahrscheinlich ist.

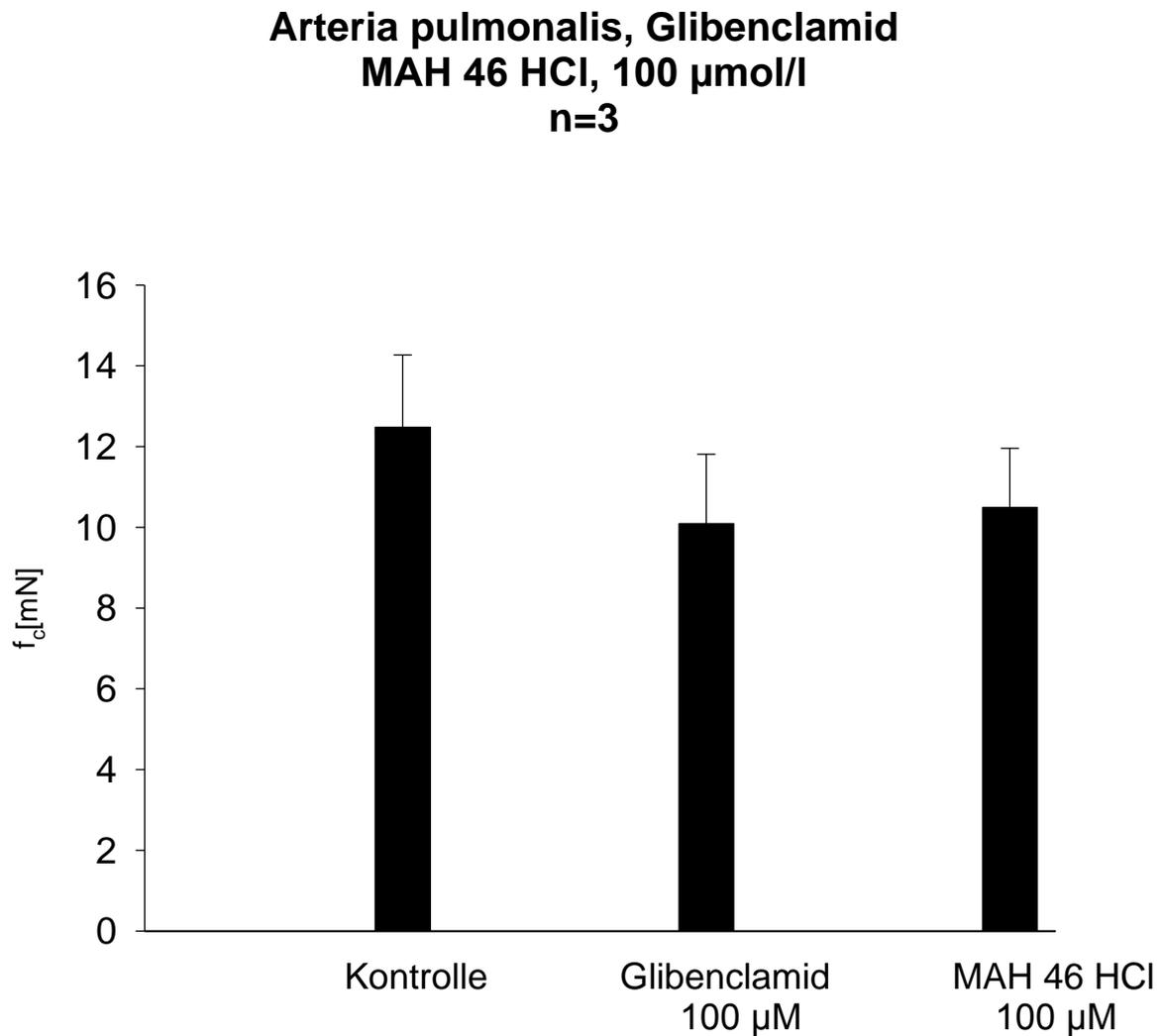
Tabelle 10: Versuchsergebniss von MAH 46.HCl in Kombination mit Glibenclamid

| <b>Konz.<br/>(<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b> | <b><math>f_c \pm \text{SEM}</math><br/>(mN)</b> | <b>Anzahl<br/>der<br/>Versuche</b> | <b>Irrtums-<br/>wahrscheinlichkeit</b> |
|---|---|------------------------------------|--|
| Kontrolle                                       | $12,48 \pm 1,79$                                | 3                                  | ---                                    |
| 100 $\mu\text{M}$ Glibenclamid                  | $10,09 \pm 1,72$                                | 3                                  | ---                                    |
| + 100 $\mu\text{M}$ MAH 46.HCL                  | $10,49 \pm 1,47$                                | 3                                  | n.s.                                   |

Legende zu Tabelle 10:

In der Tabelle sind die Mittelwerte der Kontraktionsänderung samt Standardfehler angegeben bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid sowie in Kombination mit 100 MAH 46.HCl  $\mu\text{mol/l}$ .

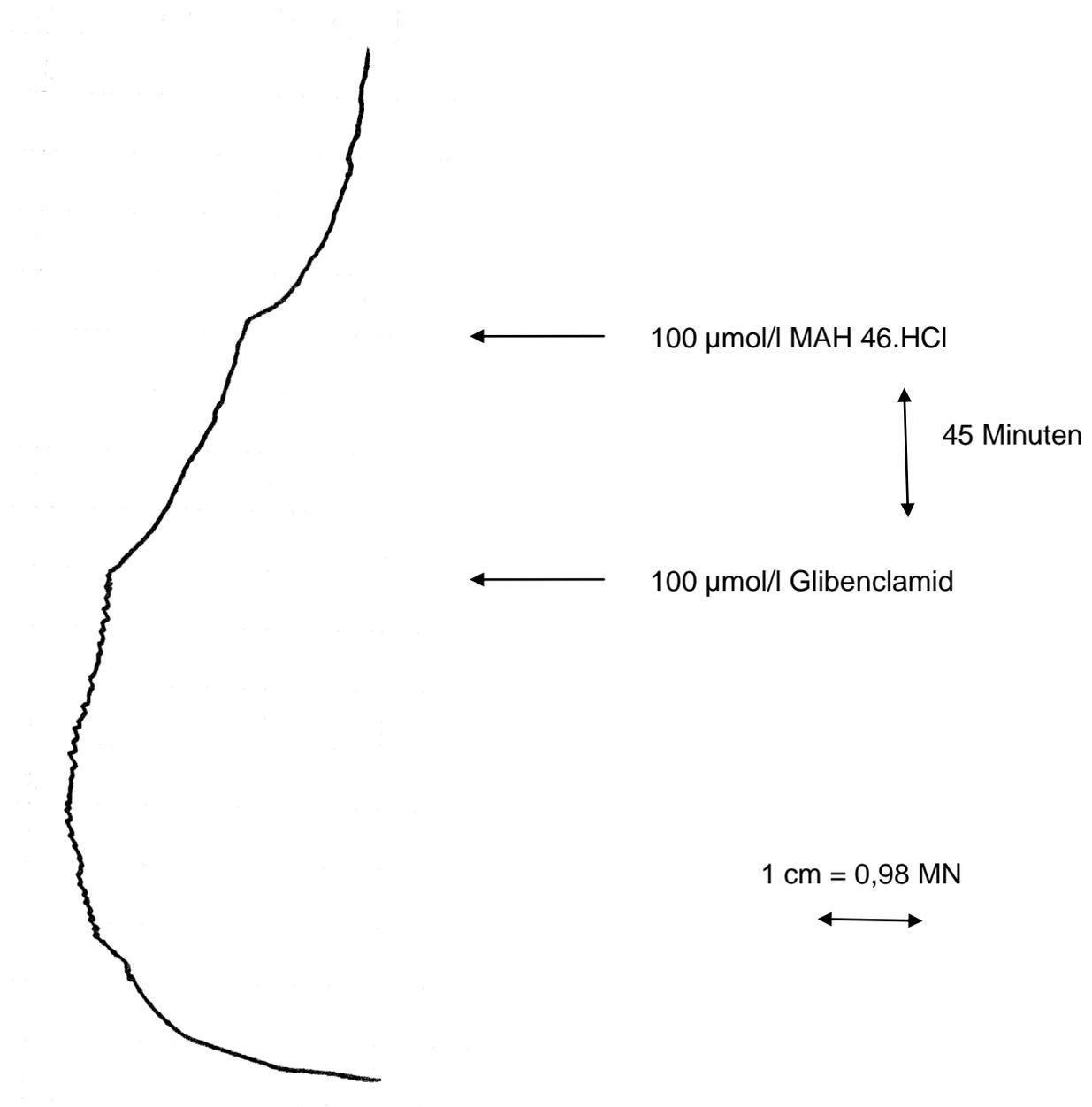
Diagramm 6: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Versuche in einem Balkendiagramm.



Legende zu Diagramm 6:

Dargestellt ist hier die Auswirkung der Kontraktilität nach Zugabe von Glibenclamid, sowie nach zusätzlicher Zugabe des Wirkstoffes in Form eines Balkendiagramms.

Abbildung 20: Originalaufzeichnung des Versuchs von Glibenclamid in Kombination mit MAH 46.HCL auf die Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 20:

Gleich den anderen Versuchen wurde auch hier nach maximaler Kontraktion und anschließender Plateauphase mit der Injektion von Glibenclamid begonnen. Nach einer 45-minütigen Einwirkzeit wurde die Testsubstanz zugefügt und eine ausbleibende Veränderung der Kontraktilität konnte beobachtet werden.

# 5. Diskussion

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurden in den vorherigen Kapitel die Ergebnisse der Untersuchungen der neuen synthetisierten Substanz MAH 46.HCl auf isolierte Organe des Meerschweinchen angegeben, als auch wurde auf Material und Methodik näher eingegangen.

In diesem Kapitel werden die erlangten Versuchsergebnisse und Erkenntnisse diskutiert bzw. miteinander verglichen.

Dazu unterscheidet man einerseits die Wirkung auf die glatte Muskulatur, aus der das terminale Ileum, die Aorta descendens, sowie die Arteria pulmonalis bestehen, als auch auf die quergestreifte Muskulatur, zu dieser der rechte Vorhof und der Papillarmuskel gehören.

## 5.1 Wirkung auf die glatte Muskulatur

Tabelle 11: Wirkung von MAH 46.HCL auf die glatte Muskulatur

| <b>Organpräparat</b> | <b>Kontraktionskraftänderung bei 100 <math>\mu\text{mol/l}</math> MAH 46.HCL<br/><math>F_c (\%) \pm \text{SEM}</math></b> |
|----------------------|---|
| Aorta                | $-16,29 \pm 6,3$  |
| Arteria pulmonalis   | $-34,82 \pm 5,32$   |
| Terminales Ileum     | $-28,10 \pm 5,81$   |

In Tabelle 11 sind die Wirkungen von MAH 46.HCl auf die diversen Organpräparate der glatten Muskulatur bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  ersichtlich.

An allen drei Organen konnte eine leichte spasmolytische bzw. dilatierende Wirkung festgestellt werden, wobei bei keinem der drei Versuchsreihen ein halbmaximaler Effekt erreicht werden konnte.

Die Wirkung an der Arteria pulmonalis war am stärksten ausgeprägt und wurde somit zur näheren Untersuchung des Wirkmechanismus herangezogen. Hierbei lag der Effekt bei 100 µmol/l von MAH 46.HCl bei  $-34,82\% \pm 5,32$ .

Die Muskulatur des terminalen Ileums wurde ähnlich stark relaxiert. Die maximale spasmolytische Wirkung wurde bei 100 µmol/l MAH 46.HCl erreicht und lag bei  $-28,10\% \pm 5,81$ .

Jedoch war hier der Unterschied zwischen den Konzentrationsstufen 30 µmol/l und 100 µmol/l geringer als jener bei der Arteria pulmonalis, und zwar unterschieden sie sich lediglich um 3,02mN.

Die Wirkung an der Aorta war interessanter Weise verschwindend gering im Vergleich zur Arteria pulmonalis und des terminalen Ileums. Trotz des gleichen Aufbaus der Muskulatur, kam es erst bei einer Konzentration von 30 µmol/l zu einer sehr leichten Änderung der Kontraktilität. Der maximale Effekt lag nach der Zugabe von 100 µmol/l MAH 46.HCl lediglich bei  $-16,29\% \pm 6,3$ .

Der Grund für die hier deutlich niedrigere Wirkung kann unter anderem die verringerte Dichte an Rezeptoren sein, jedoch wären für die genauere Ursache weitere Versuche notwendig.

## **5.2. Möglicher Wirkmechanismus auf der Arteria pulmonalis**

Auf Grund dessen, dass die Wirkung an der Arteria pulmonalis am stärksten ausgeprägt war, wurde hier wie bereits erwähnt der genauere Wirkmechanismus untersucht.

Die Versuchsreihe betrachtete ob die Wirkung durch Öffnung der Kaliumkanäle zu Stande kam. Dazu wurde der Kaliumkanalblocker Glibenclamid, ein Sulfonylharnstoff verwendet.

Die Wirkung von MAH 46.HCl war nach Zugabe von Glibenclamid durch dessen Antagonisierung deutlich vermindert, welches ein Hinweis für die Beteiligung von Kaliumkanälen war.

Graphische Darstellungen dafür findet man in Kapitel 4.3.

Ob weitere Mechanismen an der Wirkung von MAH 46.HCL an der Arteria pulmonalis involviert sind bleibt offen. Dazu müsste man weitere Versuchsreihen starten.

### 5.3. Wirkung auf die Herzmuskulatur

Tabelle 12: Wirkung von MAH 46.HCl auf die quergestreifte Muskulatur

| <b>Organpräparat</b> | <b>MAH 46.HCL<br/>Kontraktionskraft <math>f_c</math> (%)<br/><math>\pm</math> SEM bei 100 <math>\mu\text{mol/l}</math></b> |
|----------------------|--|
| Rechter Vorhof       | -33,09 $\pm$ 3,77  |
| Papillarmuskel       | -82,27 $\pm$ 4,55  |

Aus der Tabelle 12 ist die Wirkung von MAH 46.HCl auf die quergestreifte Muskulatur ersichtlich.

Erkennbar ist der sehr starke Effekt auf den Musculus papillaris, wobei bei einer Konzentration von 14,5  $\mu\text{mol/l}$  ein  $\text{EC}_{50}$  Wert erreicht wurde.

Das bedeutet, dass bei jener Konzentrationsstufe die Amplitudenstärke bzw. Kontraktionskraft des Papillarmuskels auf die Hälfte abgenommen hat.

Die starke negative Inotropie von MAH 46.HCl ist bereits bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/l}$  ersichtlich, woraus sich folglich der frühe halbmaximale Effekt ergibt. Bei der Konzentrationsstufe von 100  $\mu\text{mol/l}$  lag die Wirksamkeit bei -82,27  $\pm$  4,55.

Die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs wurde ebenfalls durch MAH 46.HCl reduziert, jedoch ergab sich kein  $\text{EC}_{50}$ -Wert.

Es kam bereits bei der ersten Konzentrationsstufe von 3  $\mu\text{mol/l}$  zu einer leichten Abnahme der Chronotropie, welche bis zur kumulativen Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  weiterhin abnahm. Hier lag der Effekt bei -33,09%  $\pm$  3,77.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Testsubstanz MAH 46.HCl auf der glatten Muskulatur als auch auf der quergestreiften Muskulatur Wirkung zeigt.

Diese zeigt sich einerseits durch die Änderung der Kontraktionskraft besonders an der Arteria pulmonalis als auch am terminalen Ileum, andererseits an der starken negativen Inotropie am Musculus papillaris, sowie der negativen Chronotropie am rechten Vorhof.

Im Jahre 2001 postulierten Zhao et al. (2001) ausführliche Untersuchungen über die Wirksamkeit von Schwefelwasserstoff ( $H_2S$ ) an der glatten vaskulären Muskulatur von Ratten.

Auf Grund dessen, dass die Testsubstanz MAH 46.HCl dieser Diplomarbeit ebenfalls Schwefelwasserstoff freisetzt, liegt ein Vergleich mit jener Studie nahe.

In der genannten Studie unterschied man die Wirkung auf eine mit 20 mmol KCl und auf eine mit 100 mmol KCl vorkontrahierte Aorta. Bei jener mit 20 mmol KCl behandelten Aorta wurde eine Relaxationsschwelle bereits mit einer Konzentration von 18  $\mu\text{mol/l}$  Schwefelwasserstoff erreicht, bei jener mit 100 mmol KCl vorkontrahierten Aorta mit etwa 300  $\mu\text{mol/l}$ .

Im Vergleich dazu, liegt bei einer Konzentration von 1100  $\mu\text{mol/l}$  die maximale Relaxation der mit 100 mmol vorkontrahierten Aorta bei  $-19 \pm 3,9\%$ , bei jener mit 20 mmol KCl bei  $-90 \pm 3,9\%$ .

Die  $EC_{50}$  wurde in der Versuchsreihe mit 20mmol KCl vorkontrahierten Aorta bei etwa 200  $\mu\text{mol/l}$  erreicht (Zhao et al. 2001).

MAH 46.HCl zeigte im Vergleich zu den oben genannten Ergebnissen eine weitaus niedrigere relaxierende Wirkung auf die Aorta descendens.

Obwohl die Aortanpräparate mit einer 90 mmolaren KCl vorkontrahiert wurden, liegt die maximale Relaxation bei  $-16,29 \pm 6,3\%$ .

Ein halbmaximaler Effekt konnte bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  nicht erreicht werden.

Die Relaxation der Arteria pulmonalis war im Vergleich dazu wesentlich höher. Die maximale Abnahme der Kontraktion liegt bei  $-34,82 \pm 5,32\%$ .

Nähere Informationen über die unterschiedlichen Wirkungen auf die glatte Muskulatur, sowie über die stärkere Wirkung auf die quergestreifte Muskulatur könnten weitere Untersuchungen zum Wirkmechanismus liefern.

Denn sowohl die geringe Wirkung auf die Aorta, sowie der starke Einfluss auf Schlagkraft und Herzfrequenz der Herzmuskulatur stimmen den Ergebnissen von Zhao et al. (2001) nicht überein.

In einem weiteren Versuch von Zhao et al. (2001) zeigte sich jedoch dass der hypotensive Effekt von H<sub>2</sub>S durch den K<sub>ATP</sub>-Kanalblocker Glibenclamid antagonisiert wurde und vom K<sub>ATP</sub> Kanalöffner Pinacidil imitiert wurde (Zhao et al. 2001).

Diese Annahme entspricht wiederum den Ergebnissen von MAH 46.HCl, dessen Wirkmechanismus unter anderem auf die Öffnung der Kaliumkanäle zurückzuführen ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Schwefelwasserstoff innerhalb von physiologisch relevanten Konzentrationen eine Vasodilatation hervorruft und so neben NO und CO einen weiteren intrinsischen, gasförmigen vasoaktiven Mediator darstellt (Zhao et al. 2001).

Abschließend kann festgestellt werden, dass die untersuchte Substanz dieser Diplomarbeit MAH 46.HCl keine signifikante vasodilatatorische Wirkung zeigt.

Dies beruht vermutlich auf einer sehr geringen oder fehlenden Freisetzung von Schwefelwasserstoff.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Diplomarbeit wurde eine neue Substanz namens MAH 46.HCl, die am Department für medizinische/pharmazeutische Chemie neu synthetisiert wurde, an isolierten Organen des Meerschweinchens getestet.

Es wurde die Wirksamkeit auf glatte Muskulatur, sowie auf quergestreifte Muskulatur untersucht. Dafür wurden folgende Organe verwendet:

Glatte Muskulatur: Aorta descendens, Arteria pulmonalis, terminales Ileum

Quergestreifte Muskulatur: Musculus papillaris, Atrium dexter

Im Speziellen wurde auf den Organen der glatten Muskulatur eine mögliche Relaxation, somit eine Dilatation der Gefäße bzw. eine Spasmolyse des Darms überprüft und an den Präparaten der quergestreiften Herzmuskulatur eine Änderung der Inotropie bzw. Chronotropie.

Um eine vergleichbare und reproduzierbare Versuchsreihe zu erhalten, wurden die benötigten Organe nach erlernter Technik jeden Tag frisch präpariert.

Die wasserlösliche Testsubstanz MAH 46.HCl wurde in vier verschiedenen Konzentrationen, welche durch kumulative Zugabe erreicht wurden, vermessen.

Eine mögliche Änderung der Kontraktion, Schlagfrequenz bzw. Schlagkraft konnte mit Hilfe eines Kraftwandlers, dem darauffolgenden Verstärker und einem Flachbettsschreiber aufgezeichnet werden. Der Verlauf der Kurve konnte nun ausgewertet und interpretiert werden.

Der Wirkstoff erzielte an der glatten Muskulatur keine signifikant starke Wirkung, da bei keinem der drei Organe ein  $EC_{50}$  erreicht werden konnte. Am stärksten ausgeprägt war die Wirkung auf die Arteria pulmonalis. Auf dieser Tatsache basierend, wurde an der Lungenarterie der zu Grunde liegende Wirkmechanismus näher erforscht. Dieser konnte auf eine Beteiligung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle zurückgeführt werden.

An der quergestreiften Muskulatur zeigte die Testsubstanz eine starke negativ inotrope Wirkung am Papillarmuskel. Nur bei diesem Präparat konnte eine  $EC_{50}$  von  $14,5 \mu\text{mol/l}$  erreicht werden.

## **7. Literaturverzeichnis**

Abe K, Kimura H (1996) The possible role of hydrogen sulphide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci* 16: 1066-1071

Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, Cao K, Wang R (2004) Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2316-2323

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Wang R (2002) Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *Faseb J* 16:1792-1798

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

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

Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder SH, Wang R (2008) H<sub>2</sub>S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science* 322:587-590.

Zhao W, Zhang J, Lu YJ, Wang R (2001) The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K<sub>ATP</sub> channel opener. *EMBO J* 20:6008-6016.

Zhao W, Wang R (2002) H<sub>2</sub>S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanism. Am J Physiol Heart Circ Physiol 283: 474-480

## **8. Curriculum vitae**

### **Persönliche Daten:**

Geburtsdatum: 30. Jänner 1986

Geburtsort: Wien  
Familienstand: ledig, ein Sohn: Julian Kiesenhofer  
Staatsbürgerschaft: Österreich

**Schulbildung:** 1992-1996 Volksschule in Aschbach  
1996-2004 AHS in Seitenstetten  
Matura im Juni 2004 mit gutem Erfolg  
ab Oktober 2004 Studium der Pharmazie in Wien

**Bisherige Berufserfahrung:** Ferialpraxis „Apotheke zum heiligen Martin“  
Aschbach, August 2010