



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Biologische Aktivität eines neu synthetisierten Wirkstoffs
(MAH8 HCl) an isolierten Organen von
Meerschweinchen

Verfasserin

Milada Avdic

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

DANKSAGUNG

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei Herrn Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik, für seine Betreuung und Hilfsbereitschaft. Für alle Fragen und Probleme, war er freundlichst immer zur Stelle, dass ich meine Diplomarbeit rechtzeitig fertigstellen konnte.

Weiterst bedanke ich mich bei Herrn Ao. Univ.-Prof. Dr. Thomas Erker und der Arbeitsgruppe des Departments für Medizinisch/Pharmazeutische Chemie für das Bereitstellen der Testsubstanz.

Mein großer Dank geht an meine Eltern (Avdic Suad und Avdic Sabina) und meinen Bruder. Ihre Unterstützung, Geduld und Verständnis während des ganzen Studiums, haben mir Kraft gegeben, nicht aufzugeben und weiter zu machen.

Noch ein großes Dankeschön meinen Freundinnen, Alma, Özlem und Vesna. Sie waren mir eine große Hilfe und konnten mich in Prüfungsstress durch ihre angenehme Art immer beruhigen. Viele schöne gemeinsame Stunden haben wir während des Studiums in den Bibliotheken verbracht, die ich nie vergessen werde.

Zum Schluss noch ein großer Dank an meinen Freund, welcher so viel Einfühlungsvermögen für mich und mein Studium hatte.

Danke!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Anatomie und Physiologie von menschlichem Herz	1
1.2. Elektrophysiologie des normalen Herzrhythmus	3
1.3. Aktionspotential	4
1.4 Hypertonie	5
1.5. Antihypertensiv wirkende Pharmaka	6
1.6. Schwefelwasserstoff (H₂S)	9
2. Zielsetzung	11
3. Material und Methodik	12
3.1. Testsubstanz	12
3.1.1. MAH8 HCl	12
3.2. Versuchstiere	13
3.3. Physiologische Elektrolytlösung	14
3.4. Entnahme und Präparation der Organe	15
3.4.1. Organentnahme	15
3.4.2. Organpräparation	15
3.4.2.1. <i>Rechter Vorhof (Atrium cordis dexter)</i>	16
3.4.2.2. <i>Lungenarterie (Arteria pulmonalis)</i>	16
3.4.2.3. <i>Papillarmuskel (Musculus papillaris)</i>	17
3.4.2.4. <i>Darm (terminales Ileum)</i>	17
3.4.2.5. <i>Aorta (Aorta descendens)</i>	18
3.5. Versuchsanordnung und Apparaturen	20
3.5.1. Apparatur I	21
3.5.2. Apparatur II	23
3.5.3. Kraftwandler	25
3.5.4. Gasversorgung	25
3.5.5. Wasserbad	26
3.6. Versuchsabläufe	26
3.6.1. Wirkstärke der Substanzen bei isolierten Meerschweinchenorganen	27

3.6.1.1. Atrium dexter	27
3.6.1.2. Musculus papillaris	28
3.6.1.3. Terminales Ileum	29
3.6.1.4. Aorta	30
3.6.1.5. Arteria pulmonalis	31
3.6.2. Wirkmechanismus der Substanz in Kombination mit Antagonisten am Darm	31
3.6.2.1. Versuchsablauf mit Glibenclamid und Nitro-L-Arginin	31
3.7. Verwendete Antagonisten	32
3.7.1. Glibenclamid	32
3.7.2. Nitro-L-Arginin	33
3.8. Auswertung und Statistik	33
3.8.1. Atrium dexter	33
3.8.2. Musculus papillaris	34
3.8.3. Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum	34
3.8.4. Statistik	35
4. Ergebnisse	36
4.1. Ergebnisse der Testsubstanz MAH8 HCl	36
4.1.1. Wirkung von MAH8 HCl auf den Vorhof	36
4.1.2. Wirkung von MAH8 HCl auf den isolierten Papillarmuskel	39
4.1.3. Wirkung von MAH8 HCl auf die Aorta	42
4.1.4. Wirkung von MAH8 HCl auf die Arteria pulmonalis	45
4.1.5. Wirkung von MAH8 HCl auf den Darm	48
4.2. Untersuchung des Wirkmechanismus von MAH8 HCl auf den Darm	51
4.2.1. Wirkung von MAH8 HCl in Kombination mit Nitro-L-Arginin	51
4.2.2. Wirkung von MAH8 HCl in Kombination mit Glibenclamid	54
5. Diskussion	57
6. Zusammenfassung	60
7. Literaturverzeichnis	61
8. Curriculum Vitae	63

1. Einleitung

1.1. Anatomie und Physiologie von menschlichem Herz

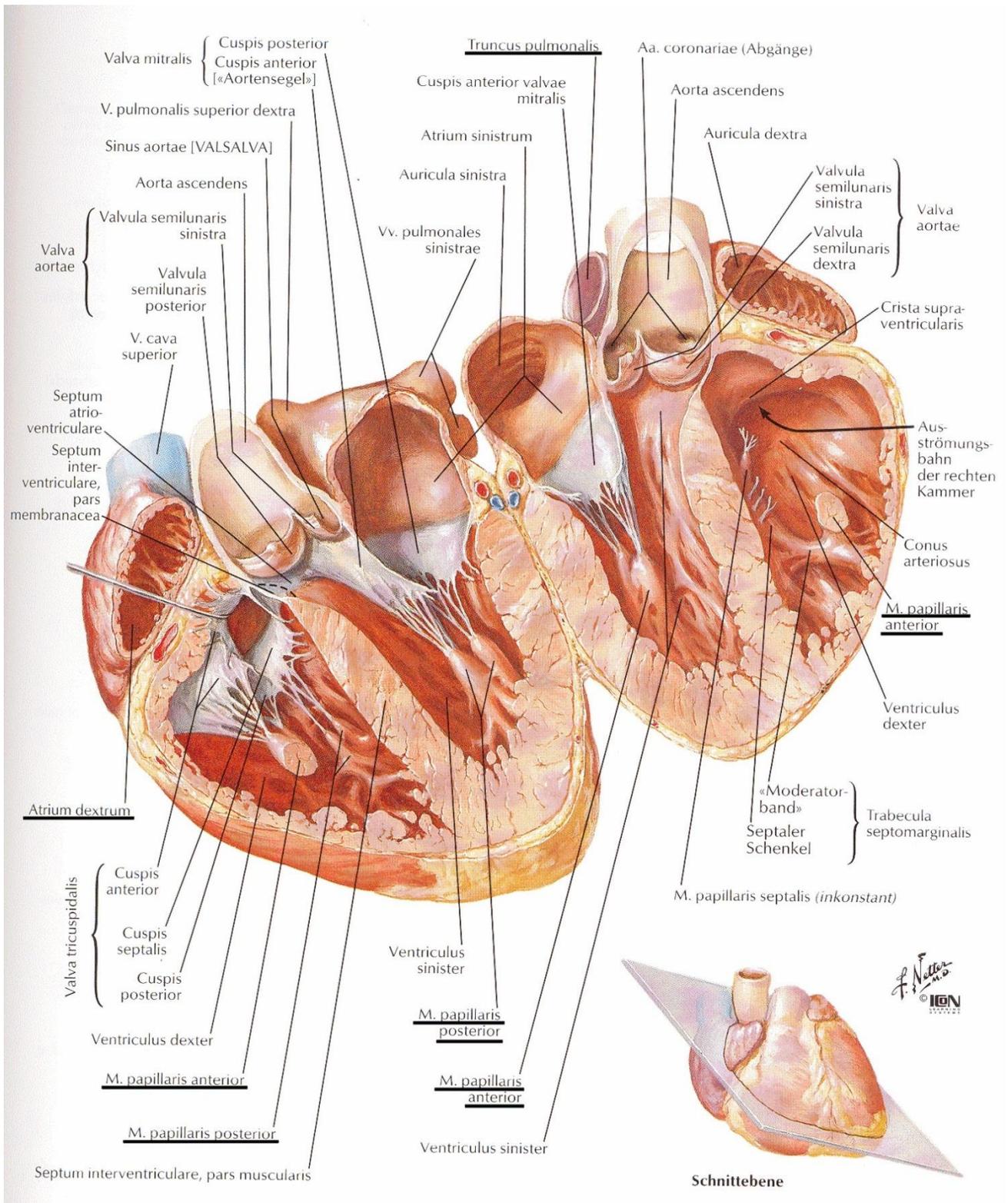
Das Herz liegt im vorderen unteren Teil des Mittelfellraums. Es ist ungefähr so groß wie die geballte Faust des jeweiligen Menschen. Sein Gewicht beträgt durchschnittlich beim erwachsenen Mann 320g und bei der Frau 280g. Das menschliche Herz kann in zwei Teile, das rechte und das linke Herz, eingeteilt werden. Es besteht aus einem kleineren Vorhof (Atrium) und einer größeren Kammer (Ventrikel).

Die Vorhöfe sind durch eine Scheidewand (Septum atriorum) voneinander getrennt. Die großen Hohlvenen münden in den rechten Vorhof und in den linken Vorhof die Lungenvenen. Die Kammern werden von den Vorhöfen abgegrenzt durch eine Furche (Sulcus coronarius), welche von außen zu erkennen ist. Eine durch den Sulcus coronarius gelegte Ebene bildet die Herzbasis.

In dieser Ebene sind sämtliche Herzklappen angeordnet, die als Ventilebene genannt werden. Die beiden Ventrikel werden durch die Kammerscheidewand (Septum interventriculare) voneinander geteilt. Das gesamte Herz ist von einer Hülle, dem Perikard (Herzbeutel), umgeben. Die Herzoberfläche überziehender innere Bereich wird als Epikard bezeichnet. (Mutschler et al. 2008).

In körperlicher Ruhe beträgt das Schlagvolumen etwa 70 ml Blut. Die Herzfrequenz liegt bei ca. 70 Schlägen/min. Das Herzvolumen, d.h. das pro Zeiteinheit transportierte Blutvolumen, zeigt unter Ruhebedingungen einen Wert von etwa 5 l/min auf (Mutschler et al. 2008).

Abbildung 1: Querschnitt des Herzens (Netter FH 2003)

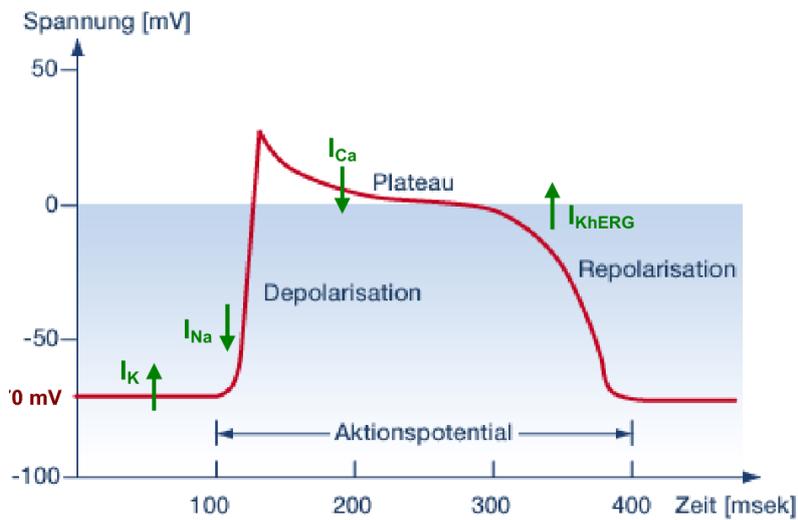


1.2. Elektrophysiologie des normalen Herzrhythmus

Die Zellen des Sinusknoten im rechten Vorhof haben die Aufgabe eines physiologischen Schrittmachers, weil dort in bestimmten Intervallen die elektrische Erregung zustande kommt. Über die Vorhofmuskulatur erreicht die Erregung sehr schnell den atrioventrikulären (AV-) Knoten. Dieser ist von Bedeutung, weil er der einzige Überleitungsweg zwischen den Vorhöfen und Ventrikeln ist. Die Weiterleitung durch den AV-Knoten erfolgt mit Verzögerung. Dadurch besteht eine Siebwirkung, d.h., mit hoher Frequenz ankommende Aktionspotentiale können den AV-Knoten nicht passieren. Von dort geht die Erregung weiter zu den beiden Schenkel der His'schen Bündel und deren fächerartigen Aufzweigung (Purkinje Fasern) in die Kammermuskulatur. Im Ganzen ist die Aktivierung der gesamten Muskulatur beider Ventrikel in weniger als 0,1 s vollendet. Dieser schnelle Ablauf ermöglicht eine effektive Kontraktion der gesamten Ventrikelmuskulatur. Wichtig für die Erregungsleitung ist eine Membranpotentialänderung, die sich entlang der oben genannten anatomischen Strukturen fortsetzt. Das Membranpotential einer Zelle wird durch die Konzentration verschiedener Ionen (Na^+ , K^+ , und Ca^{2+}) auf beiden Seiten der Membran beeinflusst, außerdem ist es abhängig von der Membranpermeabilität jeder dieser Ionen. Sie können die Membran durch ionenselektive Kanäle passieren. Dabei formieren transmembranäre Proteine eine Art Pore. Die Kanäle sind nicht nur ionenselektiv, sondern auch selektiv in Bezug auf den Mechanismus, der ihre Öffnung auslöst. Man unterscheidet „spannungsabhängigen“ Kanäle dessen Öffnung durch Änderungen des Membranpotentials ausgelöst wird. Aber es gibt auch „ligandengesteuerte“ Ionenkanäle, die durch Bindung mit einem Transmitter (z.B. Nicotinrezeptor) geöffnet werden. Die Ionen passieren ihre Kanäle durch Diffusion, d.h., Grundvoraussetzung für jeden Ionenfluss ist eine Konzentrationsdifferenz auf beiden Seiten der Membran. Es gibt extra- und intrazelluläre Ionenkonzentrationen. Somit fließen Na^+ - Ca^{2+} -Ströme immer ins Zellinnere, und die K^+ -Ströme sind Auswärtsströme. Wenn Ionen fließen, dann lassen sie immer eine gegensinnige Ladung zurück. Dabei entsteht ein elektrischer Gradient, der dann dem Konzentrationsgradienten entgegengesetzt ist. Ionen können daher nur so lange fließen, wie der Konzentrationsgradient der freien beweglichen Ionen durch den elektrischen Gradienten noch nicht ausgeglichen ist; erst wenn das eintrifft, kommt der Fluss zum Stillstand und es herrscht ein sogenanntes Equilibriumpotential. Jedes einzelne Ion besitzt sein charakteristisches Equilibriumpotential (Forth et al. 2005).

1.3. Aktionspotential

Abbildung 2: ventrikuläres Aktionspotential (www.onmeda.de, 13.02.2007)



In Folge einer Herzaktion (Systole) durchläuft jede Herzmuskelzelle ein Aktionspotential, welches aus den Phasen 0 bis 3 zusammengesetzt ist. Am Anfang erfolgt eine schnelle Depolarisation (Phase 0), die die Geschwindigkeit der Erregungsfortleitung bestimmt.

Nach einer allerdings unvollständigen Repolarisation (Phase 1) schließt sich dann die lang anhaltende Phase 2 (Plateauphase) an. Während dieser Phase strömt das für die elektromechanische Kopplung notwendige Ca^{2+} in die Zelle ein. Die Phase 3 vertritt die Repolarisation und ist damit für die Wiederherstellung des Ruhezustands zuständig. Während des gesamten Aktionspotentials ist die Membran im depolarisierten Zustand und damit vor einem weiteren eintreffenden Reiz geschützt d.h. sie ist refraktär. Während der Phase 4 besteht ein Ruhemembranpotential von -80 bis -90 mV. Zellen, die zu spontaner Impulsbildung (Automatie) fähig sind, kann zu einer leichten spontanen Depolarisation führen.

Phase 0:

Zur Auslösung eines Aktionspotentials muss ein elektrischer Reiz ausreichender Stärke eintreffen. Das heißt, dieser muss einen Einwärtsstrom hervorrufen, der nicht nur den K^+ -Auswärtsstrom übertrifft, sondern die Zellmembran auch soweit depolarisieren, dass der Spannungssensor des Na^+ -Kanals auf die Potentialänderung anspricht. Dann kommt es durch die schlagartige Öffnung der Na^+ -Kanäle zu einem Nettoeinwärtsstrom von Na^+ . Dieser löst eine Depolarisation der Zellmembran aus, die so wirksam ist, dass damit eine fortgeleitete Erregung entsteht (=Aktionspotential). Das für die Öffnung der Na^+ -Kanäle entscheidende Schwellenpotential liegt etwa bei -75 mV. In der Phase 0 des Aktionspotentials strebt das Membranpotential mit hohem Tempo dem Equilibriumpotential für Na^+ von +45 mV zu.

Phase 1-3:

Bevor das Equilibriumpotential für Na^+ erreicht ist, schließen sich geschwind die Na^+ -Kanäle genauso schnell, wie sie aufgingen. Ein kurz anhaltender Ausstrom von K^+ Ionen bewirkt eine Kerbe (=Phase 1). Daraufhin erreicht der nach Phase 0 ansteigende Einstrom von Ca^{2+} sein Optimum und hält im Gleichgewicht mit einem geringen K^+ -Ausstrom das Membranpotential auf einem Plateau (Phase 2). Der Ca^{2+} -Einstrom fließt durch spannungsabhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, die viel langsamer als die Na^+ -Kanäle inaktiviert werden. Außerdem kommt es gleichzeitig zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarcoplasmatischen Reticulum. Damit ist die myocardiale Kontraktion gegeben. Zu einer leichten Repolarisation während dieser Phase ist ein K^+ -Kanal verantwortlich, welcher sich bei Depolarisation sehr langsam öffnet („delayed rectifier“, I_k). Der höhere Anteil der Repolarisation, ist auf einen repolarisierenden K^+ -Ausstrom zurückzuführen. Das fällt in die Phase 3. Diese Phase setzt sich zusammen aus zwei K^+ -Strömen. Nämlich aus dem „delayed rectifier“ (I_k), welcher die initiale Phase der Repolarisation (bis -50 mV) bestimmt. Außerdem aus einem „inward rectifier“ (I_{k1}). Dieser wird durch Depolarisation abgeschaltet, und öffnet sich ab einem Membranpotential von -50 mV wieder. Der I_{k1} ist auch für das Ruhepotential mit verantwortlich.

Phase 4:

Im Verlauf der Phase 4 fließt kein Strom in Vorhof- und Ventrikelzellen. Während der Diastole ist das sogenannte Ruhepotential vorhanden (Forth et al. 2005).

1.4. Hypertonie

Als Bluthochdruck (Hypertonie) wird jede die Norm (140/90 mmHg) überschreitende anhaltende Zunahme des arteriellen Blutdrucks genannt. Der Blutdruck resultiert aus Herzzeitvolumen und peripherem Widerstand, d.h. eine Hypertonie kann durch ein erhöhtes Herzzeitvolumen, einen erhöhten peripheren Widerstand oder durch die Erhöhung beider Parameter erfolgen. Meistens findet man bei Jüngeren einen Herzzeitvolumenhochdruck vor, während bei Älteren häufiger ein Widerstandshochdruck vorliegt. Hypertonie ist eine der wichtigsten Auslöser für Arteriosklerose, als deren Folge kann es am Gehirn zum apoplektischen Insult (Schlaganfall), am Herzen zur koronaren Herzkrankheit, Linksherzhypertrophie, Herzinsuffizienz und an den Nieren zu Niereninsuffizienz kommen.

Es wird nach zwei Hypertonieformen unterscheiden:

- a) Primäre/essentielle/idiopathische Hypertonie, dessen Ursache ist unbekannt. Es ist die häufigste Hypertonieform (ca. 90%)
- b) Sekundäre Hypertonie, dessen Ursache können andere Erkrankung z.B. Nierenstenose, Aortensklerose, Tumore usw. sein (Mutschler et al. 2008).

1.5. Antihypertensiv wirkende Pharmaka

Wenn man an keinen zusätzlichen Krankheiten wie z.B. Herzinsuffizienz oder Diabetes leidet, dann ist der Zielblutdruck 140/90 mmHg. Die Dosierung des Medikaments sollte niedrig sein, um eventuelle Nebenwirkungen zu vermeiden und die Auswahl der jeweiligen Therapie wird an die Situation des Patienten angepasst.

Mittel der ersten Wahl in der Therapie von Bluthochdruck:

- **β -Adrenozeptorenblocker:**

(Metoprolol, Bisoprolol, Atenolol) werden aufgrund eindeutig positiver Studienergebnisse in Bezug auf die Lebensverlängerung und ihrer guten Verträglichkeit häufig zur Blutdrucksenkung eingesetzt. Der Mechanismus des blutdrucksenkenden Effekts von β -Blockern ist noch immer nicht vollständig geklärt. Die mit β -Blockern erzielte Blutdrucksenkung ist bei allen Verbindungen, unabhängig von ihren chemischen Eigenschaften und ihrem Wirkprofil, gleich. Folgende Angriffspunkte werden besprochen:

- Erniedrigung des Herzzeitvolumens
- Abnahme der Renin-Ausschüttung in den Nieren durch Blockade von β_1 -Rezeptoren, Herabsetzung der Bildung von Angiotensin II und der Freisetzung von Aldosteron,
- Blockade präsynaptischer β -Rezeptoren, somit Erniedrigung der Noradrenalin-Freisetzung, sowie Verringerung sympathischer Impulse.

- **Diuretika:**

Die blutdrucksenkende Wirkung nach Gabe dieser Stoffe (Thiazid-Diuretika, Furosemid) verläuft in zwei Phasen. Die Blutdrucksenkung basiert auf der gesteigerten Natriumionenausscheidung. Durch die Erniedrigung der Natriumionenkonzentration sinkt das Plasma- und Herzzeitvolumen, der periphere Widerstand steigt dagegen (reflektorisch) etwas an. In der zweiten Phase verläuft die Aufrechterhaltung der Blutdrucksenkung. Hier wird das Plasmavolumen wieder normalisiert und auch die Na^+ -Ausscheidung. Um Kalium- und Magnesiumverluste zu vermeiden, werden Patienten mit normaler oder gering eingeschränkter Nierenfunktion die kaliumsparenden Diuretika in Kombination gegeben.

- **Calciumkanalblocker (Calciumantagonisten):**

Diese blockieren den Einstrom von Calciumionen durch den sogenannten langsamen, spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanal. Die intrazelluläre Konzentration an (freien) Calciumionen bestimmt den Kontraktilitätszustand der glatten Gefäßmuskelzellen, somit sind die Calciumkanalblocker vasodilatierend und damit über die Abnahme des peripheren Widerstands blutdrucksenkend. Chemisch gesehen unterscheidet man drei Gruppen von Calciumantagonisten:

1. 1,4-Dihydropyridine (Nifedipin-Typ: Nifedipin, Amlodipin, usw.)
2. Diphenylamine (Verapamil-Typ: Verapamil, Galopamil)
3. Dibenzothiazepine (Diltiazem-Typ: Diltiazem)

Alle drei Gruppen sind vasodilatierend, wobei Verapamil und Diltiazem zusätzlich noch am Sinusknoten wirken und damit die Herzfrequenz senken.

- **ACE-Hemmer:**

(Enalapril, Lisinopril, Captopril) Es handelt sich um Antihypertensiva, deren Wirkung hauptsächlich auf einer Hemmung des Angiotensin-Konversions-Enzyms beruht, welches das Angiotensin I in Angiotensin II umwandelt. Dadurch wird die Entstehung von Angiotensin II, einer der stärksten blutdrucksteigenden Substanzen, unterdrückt. Als Folge davon wird der periphere Widerstand gesenkt. Außerdem kommt es durch

die Senkung der Angiotensin-II-Bildung zu einer reduzierten Freisetzung von Aldosteron und damit zu einer schwachen diuretischen Wirkung.

- **Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten (AT₁-Blocker):**

Auch als Sartane bezeichnet (Candesartan, Telmisartan, Losartan). Bei dieser Therapie wird der Renin-Angiotensin-Aldosteron-System blockiert. Man unterscheidet AT₁- und AT₂ Angiotensin Rezeptoren. Therapeutisch vom Nutzen sind daher Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten, die selektiv AT₁-Rezeptoren blockieren und blutdrucksenkend wirken.

- **Sonstige Vasodilatoren mit direktem Angriff an der glatten Muskulatur:**

Zu dieser Substanzgruppe zählen Dihydrolazin und Hydralazin, Nitroprussidnatrium und Cicletanin sowie der Kaliumkanalöffner Minoxidil. Der Wirkmechanismus erfolgt durch den Angriff an kleineren Arterien und Arteriolen. Somit werden der periphere Widerstand und dadurch der Blutdruck gesenkt. Bei einem Teil der Stoffe kann es zu einer Erweiterung der venösen Kapazitätsgefäße kommen.

Der Wirkmechanismus von **Dihydralazin** und **Hydralazin** ist noch weitgehend unbekannt, besprochen wurde die Hemmung der IP₃-vermittelten Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum.

Die Wirkung von **Nitroprussidnatrium** beruht jedoch auf der raschen Freisetzung von NO.

Minoxidil dagegen steigert die Öffnungswahrscheinlichkeit ATP-abhängiger Kaliumkanäle. Die K⁺-Ausströme aus der Zelle bewirken eine Zunahme des Membran Ruhepotentials (Hyperpolarisation) und dadurch kommt es zu einem verringerten Einstrom von Calciumionen durch spannungsabhängige Calciumkanäle. In diesem Fall ist die Calciumionen-Konzentration verringert und führt vor allem in Arteriolen zur Abnahme des Tonus der glatten Muskulatur und damit zur Blutdrucksenkung (Mutschler et al. 2008).

1.6. Schwefelwasserstoff (H₂S)

Aufgrund der Strukturähnlichkeit mit anderen endogenen Gasmolekülen wie z.B. Kohlenstoffmonoxid (CO) und Stickstoffmonoxid (NO) (Wang et al. 1997 a.b), nahm man an, dass H₂S womöglich eine Rolle im kardiovaskulären System spielen könnte.

Der Schwefelwasserstoff wurde für eine lange Zeit als ein stechendes und toxisches Gas gesehen. In niedrigen Konzentrationen ist Schwefelwasserstoff durch den charakteristischen Geruch nach verfaulten Eiern erkennbar, hingegen in höheren Konzentrationen riecht es leicht süßlich. Aufgrund der schnellen Lähmung des Geruchsinns ist Schwefelwasserstoff später kaum wahrnehmbar. Der Wirkmechanismus einer H₂S-Vergiftung ist noch nicht ganz geklärt.

Man geht davon aus, dass die Lähmung durch eine Blockade der eisenhaltigen Atmungsenzyme und durch das daraus gebildete Hydrogensulfid-Ion verursacht wird. Außerdem nimmt man an, dass Schwefelwasserstoff eine Störung des Zellstoffwechsels mit konsekutiver Hypoxie bewirkt. Bei Vergiftungen die langsam geschehen, kommt es meist zur Reizung der Augen und Atemwege, Erbrechen, Übelkeit, Atemnot und Krämpfen. Als Antidot wird neuerdings auch Dimethylaminophenol (Handelsname: 4-DMAP) verwendet. Trotz Therapie sind Schäden des Myokards und des Zentralnervensystems möglich (Mutschler et al. 2001).

H₂S wird im Körper auch durch den Abbau von L-Cystein, einer Aminosäure produziert. Die Biosynthese wird katalysiert durch zwei Enzyme Cystathion- γ -Lyase (CSE) und Cystathion- β -Synthase (CBS). (Stipanuk and Beck 1982; Griffith 1987; Erickson et al. 1990; Swaroop et al. 1992; Hosoki et al. 1997) CSE kann man in der Leber, Niere und in kleiner Menge im Gehirn finden (Abe and Kimra 1996).

Hasoki et al. (1997) zeigte, dass Schwefelwasserstoff in vitro auf die Aorta von Ratten eine relaxierende Wirkung nachwies. Außerdem wurde herausgefunden, dass die Vasodilation der Aortaringpräparate in Folge von Aktivierung ATP-abhängiger Kaliumkanäle zurückzuführen ist. (Zhao et al. 2001) Andere Studien zeigten, dass die K_{ATP} Kanäle nicht die einzigen Wirkungsmechanismen sind, die für die Relaxation der Gefäße durch Schwefelwasserstoff verantwortlich sind. Es wurde angeführt, dass H₂S eine wesentliche Rolle bei der Regulation des intrazellulären pH spielt, wobei es zur Erschlaffung kommt (Lee et al. 2007).

Außerdem fand man heraus, dass der Einfluss von Schwefelwasserstoff auf den Gefäßtonus vom Sauerstoff abhängig ist (Koenitzer et al. 2007).

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

Die ATP-abhängigen Kaliumkanäle werden über das Adenosintriphosphat reguliert, wobei es bei einem ATP-Anstieg zur Schließung der Kanäle kommt (Mutschler et al. 2008).

Man findet sie z.B. in den B-Zellen des Pankreas, in glatten Muskelzellen, Gehirn, Skelett und in der Leber (Ashcroft 1998, Terzic et al. 1995, Seino and Miki 2003). Wegen der bereits bisher gemachten Untersuchungen und aufgrund der Forschungsergebnisse, zieht man Pharmaka, die enzymatisch und chemisch Schwefelwasserstoff freigegeben, als neue Ansätze für Therapiemöglichkeiten in Erwägung. Es wäre ein großer Durchbruch besonders für die Behandlung von essentieller Hypertonie.

2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die Wirkung einer neu synthetisierten Substanz MAH8 HCl an isolierten Organen von Meerschweinchen geprüft.

Für einen guten Ablauf und die Reproduzierbarkeit, musste zu Beginn der Arbeit die genaue Präpariertechnik und die richtige Handhabung der Apparaturen erlernt werden.

Ziel war die Untersuchung der Substanz bezüglich der Inotropie und Chronotropie der Herzmuskelpräparate und deren Auswirkung auf die glatte Muskulatur.

Die Wirkung der Substanz auf die glattemuskulären Organe wurde an isolierten Präparaten der Aorta, der Arteria pulmonalis und des terminalen Ileums ausgeführt.

Weiteres wurde die Auswirkung des Wirkstoffs auf die Herzmuskelpräparate untersucht. Dafür wurden der isolierte rechte Vorhof und der Papillarmuskel genommen.

Beim Erreichen einer mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}), die außerdem noch bei einer Konzentration von unter $30 \mu\text{mol/l}$ im Organbad einen halbmaximalen Effekt auf das Organ hervorgebracht hatte, wurden dann an diesen Organ spezielle Untersuchungen bezüglich Wirkmechanismus mit entsprechenden Antagonisten durchgeführt.

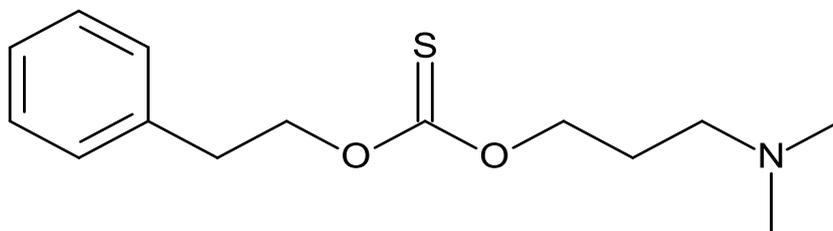
3. Material und Methodik

3.1. Testsubstanz

Die Testsubstanz MAH8 HCl wurde von Department für Medizinische Chemie und Pharmazeutische Chemie neu synthetisiert und von Hr. Univ.-Prof. Dr. Thomas Erker für die Untersuchung der Wirkung zur Verfügung gestellt.

3.1.1. MAH8 HCl

Abbildung 3: Struktur



Nomenklatur:

3-(Dimethylamino)propoxy-2-phenylethoxy-methanthioat Hydrochlorid

Jeden Tag wurde eine neue und frische Stammlösung der Substanz hergestellt, indem die Substanz ausgewogen und mit 100 μ l Lösungsmittel versetzt wurde. Das Lösungsmittel war Wasser, da die Substanz hier gut löslich war. Die Einwaage der Testsubstanz bezog sich auf das Volumen des verwendeten Organbades. Zur Verfügung standen ein 8 ml und vier 25 ml Organbäder. Die Berechnung der Substanzmenge, erfolgte so, dass nach einer kumulativen Zugabe eine Konzentration von 100 μ mol/l im Gefäß vorlag.

Berechnung:

$MG / 4 / 100 =$ Berechnung für das große Gefäß

$MG / 12,5 / 100 =$ Berechnung für das kleine Gefäß

Tabelle 1: Berechnung der Einwaage

Substanz	Molare Masse	Volumen Organbad in ml	Einwaage der Testsubstanz (100 μ mol/l) / Organbad
MAH8 HCl	303,87	8	0,24 mg
		25	0,75 mg

Die Substanzgabe bei den Versuchsreihen lief immer nach dem gleichen Prinzip ab. Wenn das entsprechende Organ eine konstante Phase erreicht hat, d.h. vorkontrahiert wurde, konnte dann die erste Substanzmenge 3 µl der Stammlösung mit Hilfe einer Finnmikropipette ins Organbad zugespritzt werden. Die darauf folgende Menge 7 µl wurde nach 45 Minuten zugegeben. Weiterst folgten noch 20 µl und 70 µl. Somit wurde alle 45 Minuten eine bestimmte Menge der Stammlösung zugespritzt und man erreichte die erwünschte Konzentration von 100 µmol/l im Organbad.

Tabelle 2: Darstellung des Pipettierschema

Zugegebene Menge	Endkonzentration
3 µl	3 µmol/l
7 µl	10 µmol/l
20 µl	30 µmol/l
70 µl	100 µmol/l

3.2. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Meerschweinchen von TRIK Stamm verwendet. Es gab sowohl männliche als auch weibliche Geschlechter. Sie waren zwischen vier bis acht Wochen alt und ihr Gewicht betrug 300 bis 600g.

Der Grund für ihre Auswahl war, dass deren physiologischen Charakteristika der Ionenkanäle den Organkanälen der Menschen ähnlich sind. Aufgrund dessen konnten gut reproduzierbare Informationen bezüglich der Testsubstanz und ihrer Wirkung bei Menschen geschlossen werden.

Das Meerschweinchen wurde am Versuchstag durch einen schnellen Genickschlag von einem ausgebildeten und qualifizierten Fachpersonal, getötet. Mit dieser Methode konnte ein schneller und schmerzfreier Tod des Meerschweinchens gewährleistet werden. Danach wurden der Thorax und das Abdomen mit einer Schere durchtrennt und man entnahm das schlagende Herz, die Lunge und das Ileum. Als letztes wurde die Aorta von einem Diplomanten herausgeschnitten. Alle Organe wurden in eine Nährlösung gegeben und bis zur Präparation dort gelassen und begast.

3.3. Physiologische Elektrolytlösung

Die entnommenen Organe wurden gleich nach der Entnahme aus dem Meerschweinchen in die physiologische Nährlösung eingebracht. Allgemein wird die Nährlösung auch als Thyrode genannt. Diese ist eine Mischung aus verschiedenen Ionen und Glucose, außerdem wird sie mit einem Sauerstoffgemisch versetzt, um eine bestmögliche Versorgung der isolierten Organe gewährleisten zu können. Das Gasgemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂, namens Oxymix oder Carbogen wurde für die vollständige Sauerstoffversorgung verwendet.

Die Nährlösung wurde hergestellt nach den Vorschriften von Reiter (1976) und entsprach der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung. Es war sehr wichtig das die Organe während der Lagerung, der Bearbeitung als auch während der Versuche immer mit ausreichender Menge an Nährlösung versetzt waren.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Nährlösung

Substanz	Molare Masse	Stocklösung	ml Stocklösung/ l Thyrode	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	34,00 g/250ml	3,20	3,92
Glucose	180,16 g/mol	Reinsubstanz	1,98	

Die Thyrode wurden immer in der Früh zu Versuchsbeginn frisch zubereitet. Die Substanzen, die in Tabelle 3 angeführt sind, wurden eingewogen und in einen 2000 ml Messkolben gegeben und mit destilliertem Wasser bis zu dreiviertel des Messkolbens aufgefüllt. Nach vollständigen lösen der Glucose wurde dann die Mischung mit Carbogen 20 Minuten lang begast. Nach 20 Minuten konnte eine vorgeschriebene Menge an CaCl₂ tropfenweise hinzugefügt werden, wobei geachtet werden musste, dass es nicht zu schnell geht, da es zur Bildung von schwerlöslichen Calciumsalzen kommen konnte. Das wäre durch die Trübung der Nährlösung ersichtlich gewesen. Am Ende wurde der 2000 ml Messkolben bis zur Markierung mit destilliertem Wasser gefüllt.

3.4. Entnahme und Präparation der Organe

Damit der Wirkstoff untersucht werden konnte, wurden das Herz, ein Abschnitt des Darms und die Aorta isoliert und weiter bearbeitet.

3.4.1. Organentnahme

Die Organentnahme erfolgte nach folgender Reihenfolge. Zuerst wurden das schlagende Herz und die Lunge, dann als nächstes das Ileum und zuletzt die Aorta entnommen.

Abbildung 4: Sezierbesteck



3.4.2. Organpräparation

Nach Entnahme der Organe und der Einlegung in die entsprechende Nährlösung mit dem hinzugefügten Gasgemisch, konnte man mit der Präparation der einzelnen Organsegmente beginnen. Gleich am Anfang wurden die Petrischalen mit einem Korkboden ausgelegt und mit einem Schlauch befestigt. Darenin wurde die begaste Nährlösung eingefüllt. Die Präparation der Organe erfolgte mit Hilfe eines Auflichtmikroskops. Zur Verfügung stand ein für die Bearbeitung der isolierten Organe entsprechendes Präparierbesteck. Dieses bestand aus Pinzetten, Federgriffschere und Präpariernadeln zur Befestigung der Organe.

Abbildung 5: Präparierbesteck und Mikroskop



3.4.2.1. Rechter Vorhof (*Atrium cordis dexter*)

Als Erstes musste man das Herz mit der Schere von der Lunge und dem umliegenden Fettgewebe befreien. Danach wurde das Herz mit zwei Präpariernadeln an der Basis und an der Spitze auf der Korkunterlage gesichert und darauffolgend konnte man behutsam den rechten Vorhof mit dem darauf befindlichen Sinusknoten isolieren. Es wurde darauf geachtet, dass der Vorhof nicht überdehnt oder in irgendwelcher Form verletzt wird. Durch unvorsichtiges Abbinden zum Beispiel könnte es zur Beschädigung des Vorhofs kommen. Die Folge wäre ein abruptes Ende des autonomen Schlagens. Wenn vielleicht noch etwas vorhandenes Fettgewebe oder eventuell ein Blutgerinnsel vorhanden wären, müssten diese sorgfältig entfernt werden, damit der Sinusknoten innerhalb des rechten Vorhofs exakt zu lokalisieren ist.

Als Nächstes wurden zwei Bindfäden am Vorhof befestigt. Es erfolgte auf die Weise, dass das Ende und die Spitze des Vorhofs mit einer Nadel fixiert wurden und dann legte man einen Faden unter die fixierten Teile, darauf konnte man einen Knoten machen, indem man vorher ein Silberhäkchen einfädelt. Zur Sicherheit konnte noch ein zweiter Knoten fest gezogen werden. Wenn der obere Teil und der untere Teil des Vorhofs mit einem Silberhäkchen versehen wurde, konnte das fertig präparierte Organ wieder in das Gefäß mit Nährlösung gelegt werden, welches mit Oxymix versehen war.

3.4.2.2. Lungenarterie (*Arteria pulmonalis*)

Damit man zur Pulmonalarterie gelangt, muss man das bereits für den Vorhof herangezogene Herz von dem restlichen Fettgewebe befreien. Wir haben für unsere Versuchsreihe den Truncus pulmonalis verwenden, das ist der Teil der Pulmonalarterie, der direkt aus der rechten Herzkammer hervorgeht. Bei der Aorta erhält man ein ca. 2-3 cm langes Stück, welches man herauspräparieren konnte, hier bei der Lungenarterie hat man meist nur einen maximal 1 cm langen Abschnitt zur Bearbeitung.

Vorher wurde die Lungenarterie von überschüssigen Fett- oder Muskelgewebe vorsichtig und feinsäuberlich entfernt. Dieser Abschnitt wurde in ringförmige Präparate von etwa zwei bis drei Millimeter Breite geschnitten. Die Ringe der Pulmonalarterie wurden bis zur Einspannung in den entsprechenden Gefäßen mit Nährlösung und Oxymix aufbewahrt.

3.4.2.3. Papillarmuskel (*Musculus papillaris*)

Nach der Isolierung des Vorhofs und der Pulmonalarterie wurde mit dem Herauspräparieren der Papillarmuskeln begonnen. Man öffnet über die Arteria pulmonalis entlang des Septums den rechten Ventrikel, damit dieser aufgeklappt werden konnte. In dieser Stellung wurde das Herz erneut mit Präpariernadeln fixiert und es konnte am Ansatz der Papillarmuskelsehne ein Silberhaken mit zu den Hilfenahmen eines Bindfadens befestigt werden.

Der Muskel wurde aus der Herzwand herausgeschnitten. Falls vorhandene Purkinje Fasern noch enthalten sind, mussten diese entfernt werden, da sie beim Erregungsleitungssystem eine Spontanaktivität aufweisen und den Versuchsablauf negativ beeinflussen können. Zur weiteren Papillarmuskelentnahme konnte man zusätzlich noch den linken Ventrikel zur Präparation heranziehen. Die isolierten Papillarmuskeln wurden dann in einem Gefäß mit Nährlösung unter Begasung aufbewahrt.

3.4.2.4. Darm (*terminales Ileum*)

Abbildung 6: Präparate des terminalen Ileums



Nach der Isolierung des Herzens folgte anschließend die Öffnung des Bauchraums des Meerschweinchens mit einer Schere. Somit konnte man den Darm mit der Hand herausziehen dabei musste geachtet werden, dass das Gewebe nicht überdehnt oder verletzt wird. Für unsere Versuche wurde der terminale Teil des Ileums verwendet. Der Darm wurde in der Nähe des Caecum getrennt und der jejunale Teil mit einem Bindfaden gebunden. In dem Fall wurde der Darm gleich für die darauffolgende Weiterbearbeitung markiert, um die Enden nicht zu verwechseln. Besonders wichtig ist die Versorgung des Darms mit Sauerstoff. Von dem circa 25 cm langen Ileum wurde ein ungefähr 1 cm großer Abschnitt abgeschnitten, wobei die Enden mit der Schere schräg durchtrennt wurden. Die daraus entstandenen schrägen Spitzen wurden dann mit einer Präpariernadel am Korkboden fest gemacht, wodurch das Einrollen der Darmwand verhindert wurde. Danach konnten an beiden Enden die Silberhäkchen mit einem

Bindfaden befestigt werden. Man musste vorsichtig arbeiten, um die Wand des Präparates nicht zu verletzen. Außerdem war von Bedeutung, dass das Darmloch nach anbringen des Fadens trotzdem durchgängig blieb. Ob das der Fall war, überprüfte man, indem eine Pasteurpipette an die Öffnung angesetzt und das Präparat mit Nährlösung durchspült wurde. Dieser Vorgang ermöglichte, dass auch die restlichen Teile des Chymus entfernt wurden und beim Versuchstart konnte somit die Substanzlösung durch das Darmrohr zirkulieren.

3.4.2.5. Aorta (*Aorta descendens*)

Abbildung 7: Originalabbildung der Aortaringe

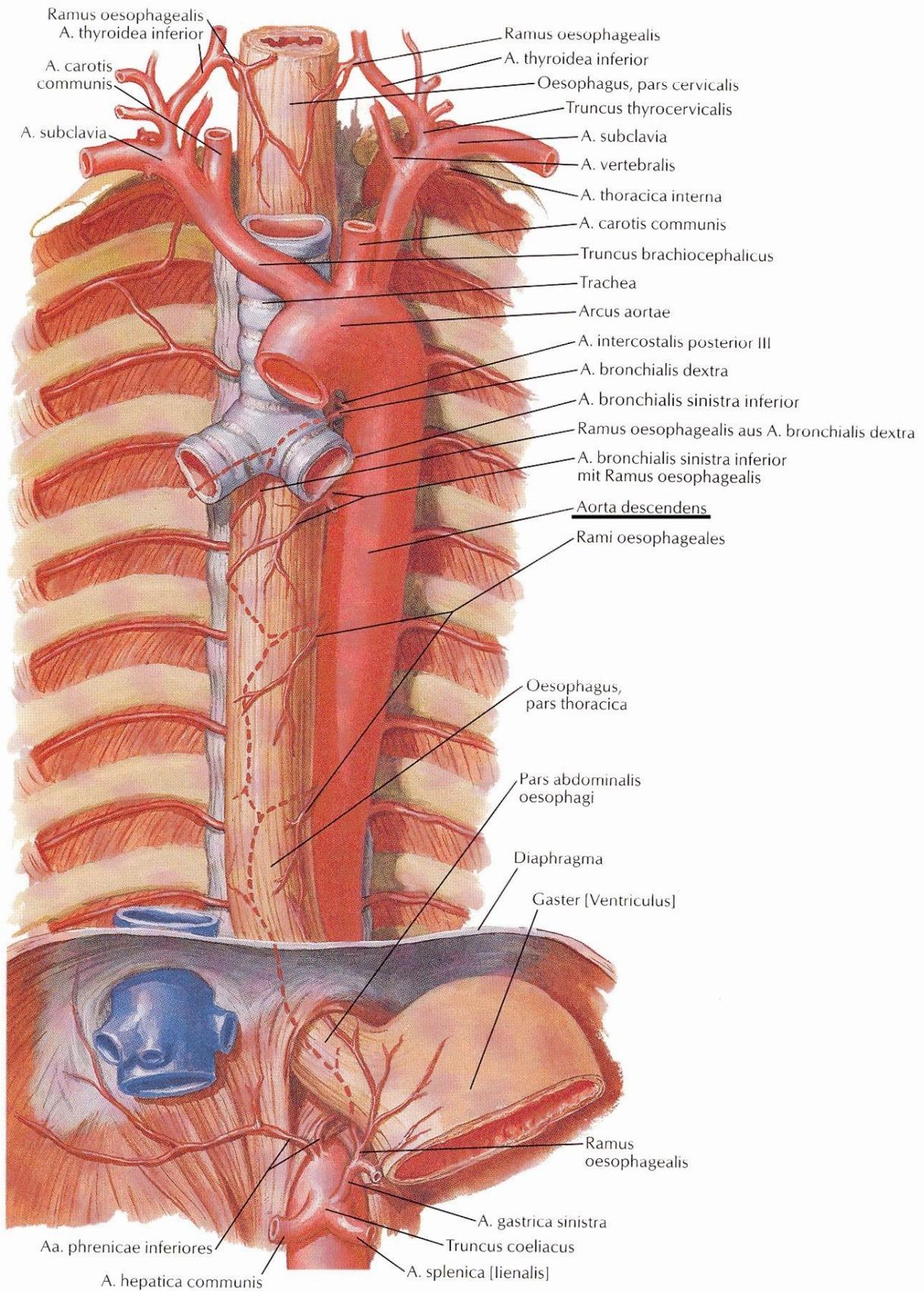


Als letztes wurde aus dem Meerschweinchen die Aorta herausgenommen. Damit das erfolgen konnte, musste der Thorax vollständig geöffnet und die Wirbelsäule durchgebogen werden, damit man zum oberen Teil der Aorta gelangt. Die Aorta wurde zuerst am oberen Ende durchtrennt, dann konnte man sie am Rückrand entlang ausschneiden. Um eine gute und präzise

Trennung zu ermöglichen, wurde eine Pinzette zu Hilfe genommen, mit welcher man den oberen Teil der Aorta hielt, und mit einer Schere konnte dann parallel zur Wirbelsäule vorsichtig die angewachsene Aorta abgetrennt werden. Hier musste man darauf achten, dass diese nicht zu stark gedehnt oder mit Löchern versehen wurde.

Nach der Entnahme wurde die Aorta in eine vorbereitete Petrischale gegeben und mit zwei Präpariernadeln am oberen und unteren Ende befestigt. Anschließend musste man mit einer Federschere das noch vorhandene Gewebe entfernen. Danach konnte die Aorta in ungefähr 2 Millimeter dicke Ringe geschnitten werden, welche in einem Gefäß mit Nährlösung unter Begasung bis zur Einspannung aufbewahrt wurden.

Abbildung 8: Verlauf der Aorta entlang des Rückgrates (Netter FH 2003)

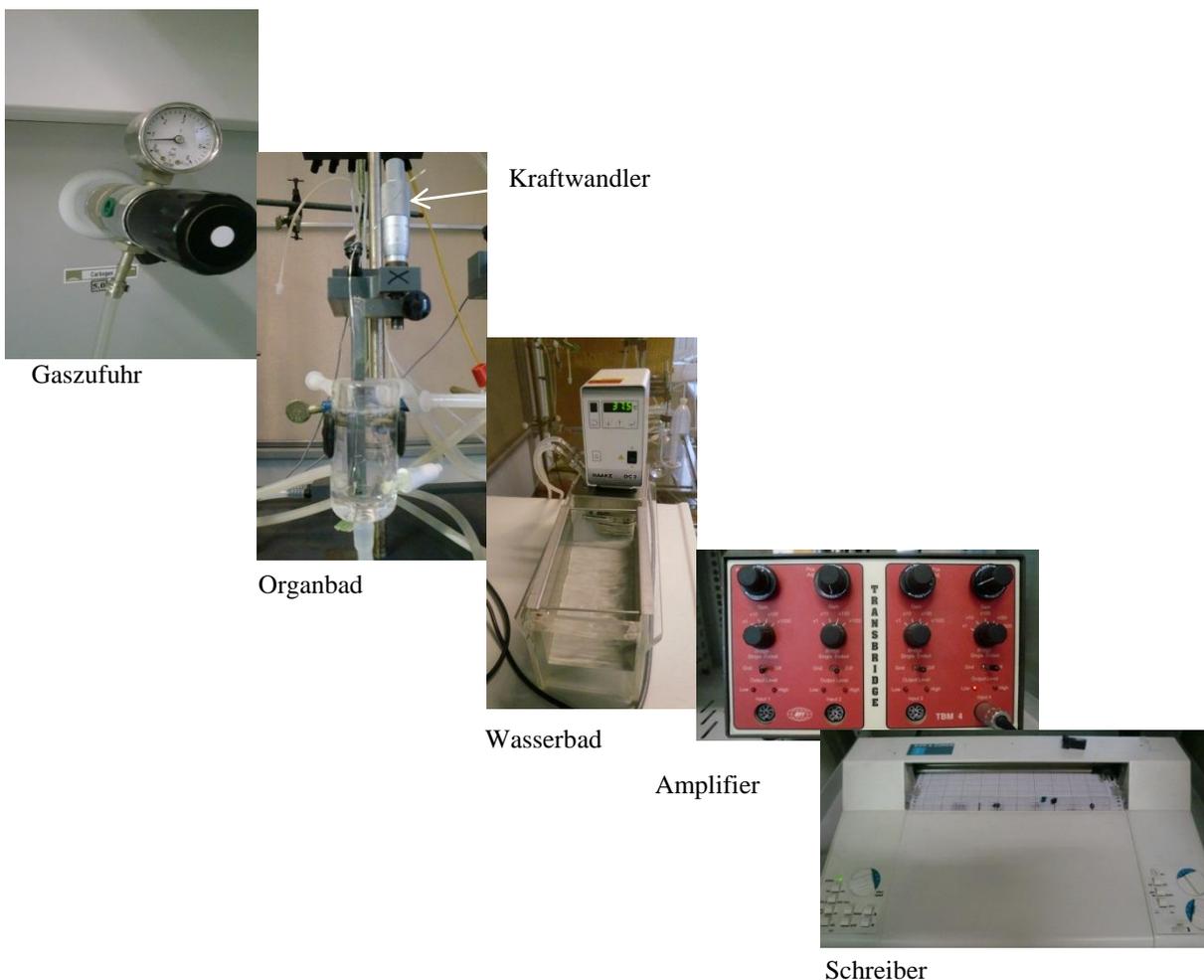


3.5. Versuchsanordnung und Apparaturen

Damit die Testsubstanz an den verschiedenen Organen des Meerschweinchens gut untersucht werden konnte, standen uns zwei unterschiedliche Apparaturen zur Verfügung. Der Papillarmuskel wurde in die Apparatur I eingespannt. Die Apparatur II wurde für die Aorta, die Lungenarterie, den Darm und für den rechten Vorhof in Anspruch genommen.

Die Organe waren über einen Draht an einem Kraftwandler befestigt, welcher dann einen elektrischen Impuls an den Amplifier leitete. Der Amplifier hatte die Aufgabe das Signal zu verstärken. Durch die Verbindung mit einem Schreiber war es möglich, dass es zur Aufzeichnung auf einen Millimeterpapier kommt. Für eine gute Reproduzierbarkeit war wesentlich, dass die physiologischen Bedingungen, beispielsweise die konstante Sauerstoffversorgung, Temperatur und pH immer gleich blieben.

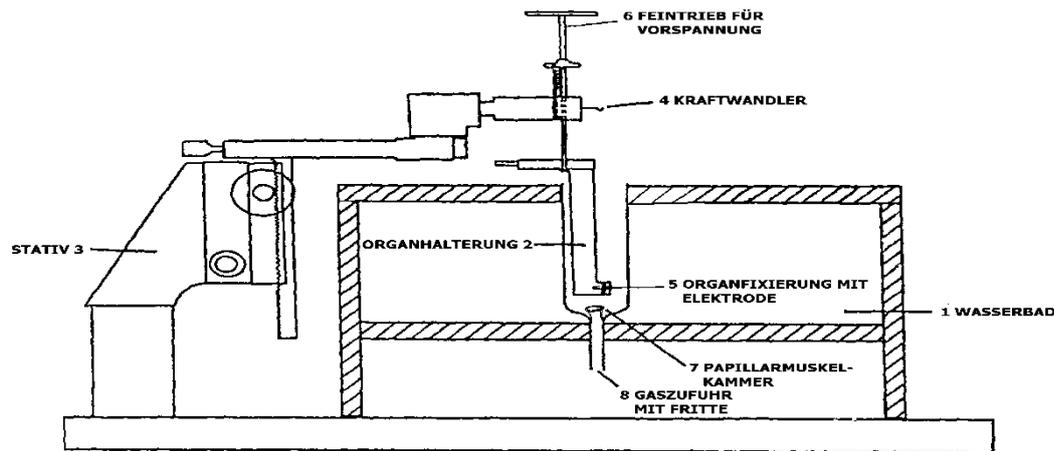
Abbildung 9: Versuchsanordnung



3.5.1. Apparatur I

Die Apparatur I wurde verwendet für die Untersuchung der Wirksubstanz am Papillarmuskel.

Abbildung 10: Schematische Darstellung der Apparatur I



Das für die Versuchsreihen verwendete Gerät besteht aus einer aus Acrylglas gebauten Wasserbadwanne, in die eine Muskelkammer hineinragt, außerdem noch aus einem Stativ. Die Wasserbadtemperatur wurde mit Hilfe eines Thermostates kontrolliert, und die Temperatur sollte konstant sein und circa $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ betragen. Die Apparatur I wurde nur für den Papillarmuskel verwendet. Man hat die Muskelkammer mit 25 ml physiologischer Nährlösung gefüllt und die Begasung mit Carbogen erfolgte stets über die Glasfritte. Damit die Nährlösung die richtige Temperatur erreicht, musste die Lösung mindestens 10 Minuten im Wasserbad verweilt haben, bevor das Organ hinzugefügt werden konnte.

Der Papillarmuskel wurde vorbereitet und daraufhin auf einen Silberdraht gehängt, der mit dem Kraftwandler verbunden war. Die Spitze des Papillarmuskels wurde dann zwischen der Elektrode und einer Plexiglasscheibe eingeklemmt, dabei war zu achten, dass der Muskel flach auf der Elektrode anlehnte. Der Draht diente dazu, dass die Kontraktion des Muskels auf den Kraftwandler übertragen wurde und in elektrische Signale übergeführt werden konnte.

Der Papillarmuskel zeigte keine autonome Regung und musste deswegen vorher elektrisch stimuliert werden. Die Reizung erzielte man über einen Anapulse Stimulator (Model Isostim 301T, WPI, Hamden, CT, USA). Nachdem die Einspannung des Organs vollständig gemacht wurde, konnte dann die Organhalterung mit Hilfe des Stativs in die Muskelkammer eingesenkt werden, damit das Organ komplett mit Nährlösung umgeben ist.

Abbildung 11: Originalabbildung der Versuchsanordnung I

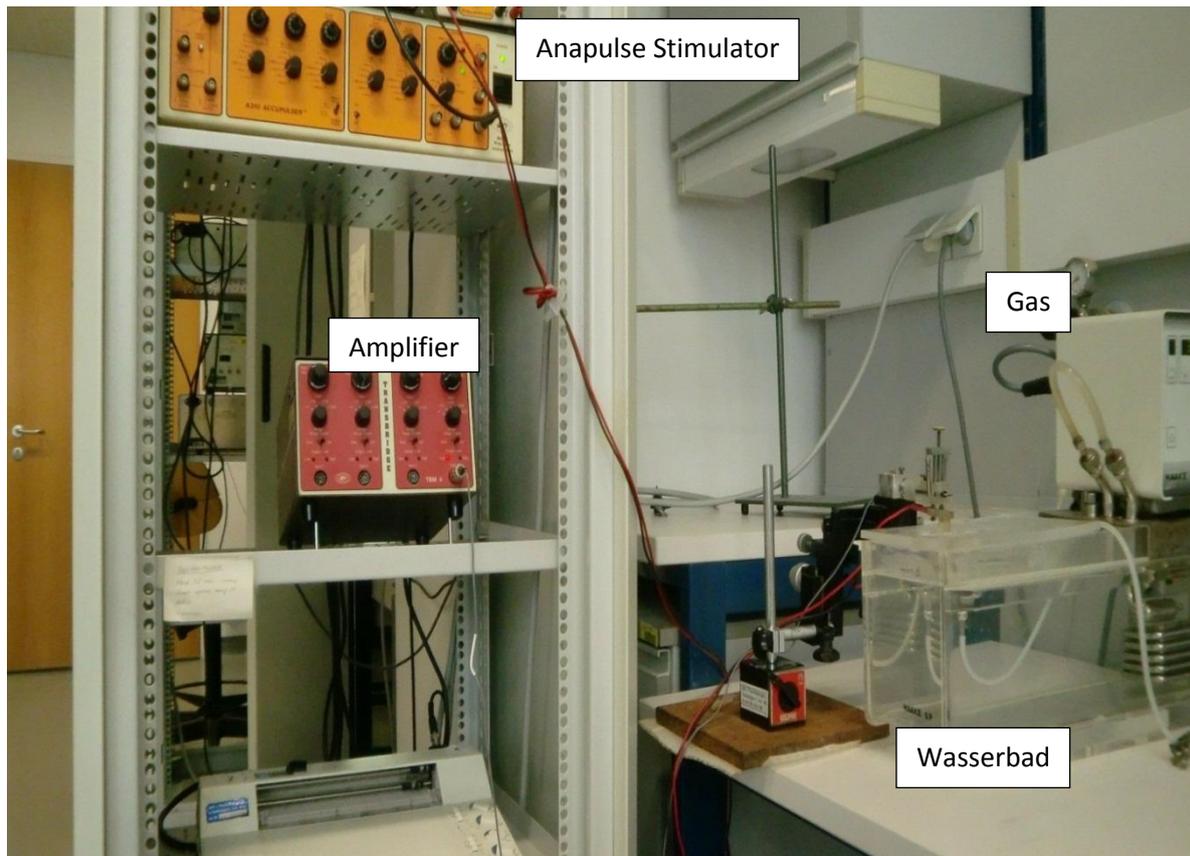


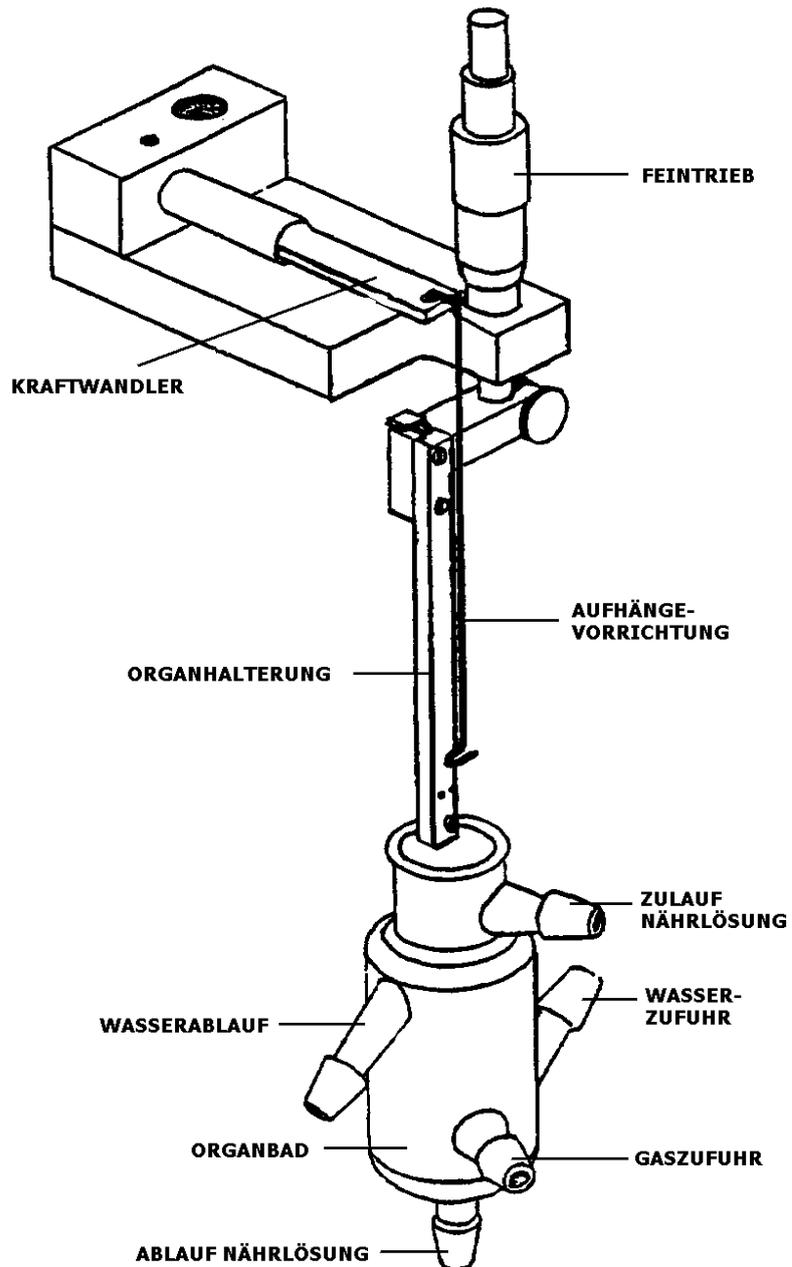
Abbildung 12 : Übersichtliche Darstellung des Anapulse Stimulators



3.5.2. Apparatur II

Die Benützung der Apparatur II wurde vorgesehen für die Versuchsreihen an Aorta, Arteria pulmonalis, terminalem Ileum und den rechten Vorhof.

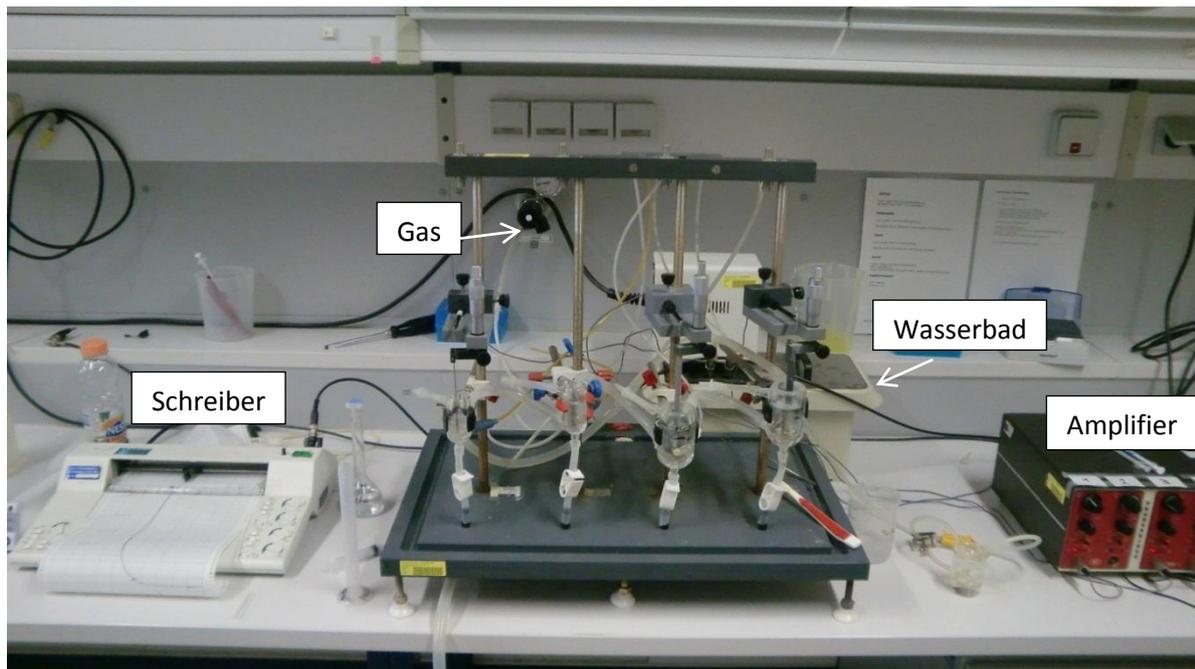
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Apparatur II



In die Apparatur II befestigte man das Organ mit zwei Silberdrähten, ein Häkchen wurde auf den oberen Silberdraht, das andere an den unteren Draht eingehängt. Dieser Vorgang wurde bei Vorhof- und Darmpräparaten gemacht, damit ein problemloses Einspannen in das Gerät ermöglicht werden konnte. Anders bei der Aorta und Lungenarterie.

Hier wurde das Organ direkt durch Einfädeln der beiden Drähte in das ringförmige Stück eingespannt. Anschließend konnten die Organe in die mit Nährlösung gefüllten und temperierten Organbäder eingetaucht und mit einem Gasgemisch sofort wieder bestmöglich versorgt werden. Der Feintrieb wurde für die notwendige Vorspannung der Organe verwendet. Ebenfalls bei Apparatur II wurde die Kontraktion in Stromimpulse umgewandelt und dann an den Schreiber weitergeleitet.

Abbildung 14: Originalabbildung der Versuchsapparatur II



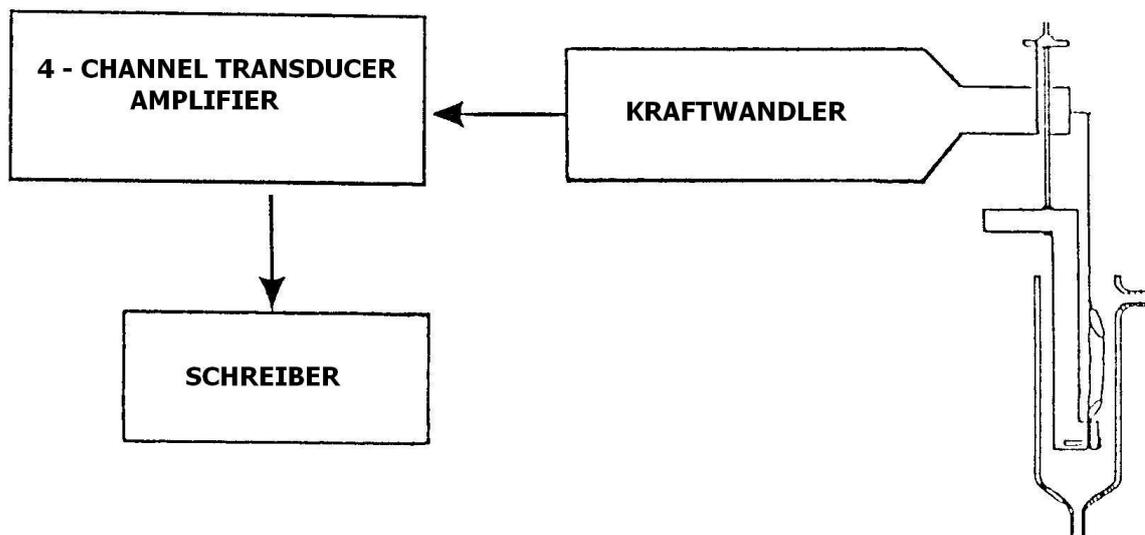
3.5.3. Kraftwandler

Der Kraftwandler gehört zu dem wichtigsten Bestandteil der Apparatur. Seine Funktion war die Überführung von einem mechanischen Vorgang in eine elektrisch messbare Größe.

Das heißt der Dehnungsstreifen befindet sich im Kraftwandlergehäuse und durch die Änderung der Kontraktionskraft der Organe, kam es ebenfalls zur Veränderung des Dehnungswiderstandes und damit auch zur proportionalen Änderung des Stromflusses kommen.

Die daraus resultierende Kontraktionsänderung wurde über den Kraftwandler zu einem Verstärker (4-Chanel Transducer Amplifier, Firma WPI) gebracht und dieser war mit einem Schreiber der Firma Kipp & Zonen (Flatbed Recorder Modell BD 112) verbunden, der dann die ankommenden Impulse auf das Millimeterpapier übertrug.

Abbildung 15: Schematische Darstellung des Kraftwandlers



3.5.4. Gasversorgung

Die Versorgung der entnommenen Organe mit Sauerstoff- und Kohlendioxid Gemisch sind unentbehrlich. Im Laufe der Versuchsabläufe wurde die Versorgung mit Sauerstoff weiter aufrechterhalten, indem die Apparaturen über Schläuche ohne Unterbrechung mit Sauerstoff Versorgung, verbunden waren. Mit bestimmten Ventilen konnte die Gasversorgung geregelt und richtig eingestellt werden.

Die Schläuche hatten an ihrem Ende eine Art Glasfritte, die als ein Filter diente und auch eine weitere Regelmöglichkeit der Gasversorgung darstellte, damit konnte eine feine Zerstäubung des Gases im Gefäß erzielt werden. Weiteres waren an den Zufuhrschläuchen zusätzlich noch Schraubklemmen angebracht, die ebenfalls eine Regelung der Gaszufuhr ermöglichten. Die Organe mussten immer mit Oxymix begast werden und durften keine Unterbrechung der Gaszufuhr aufweisen. Damit konnten eine ausreichende Sauerstoffversorgung, ein konstanter physiologische pH-Wert von 7,2-7,4 und eine gleichmäßige Verteilung der Untersuchungssubstanz in den Organbädern gesichert werden.

3.5.5. Wasserbad

Von Bedeutung war sowohl eine optimale Gasversorgung als auch eine konstante Temperatur in den Organbädern. Eine genaue Temperatureinstellung konnte mit Hilfe von Thermostat erzielt werden. Die Temperatur für die Apparatur I, in welcher der Papillarmuskel geprüft wurde, sollte stets $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ aufweisen. Das Wasserbad der Apparatur II, sollte die Temperatur von $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ nachweisen, um somit die optimalen Versuchsbedingungen zu ermöglichen.

3.6. Versuchsabläufe

Die Versuchsabläufe liefen immer nach einem bestimmten Schema ab. Wichtig war, dass vor Versuchsbeginn sichergestellt wurde, dass die Gefäße schmutzfrei sind, falls Verunreinigungen vorhanden waren, musste diese gesäubert werden. Für das saubere Arbeiten, wurden die Gefäße immer in der Früh und am Abend nach Versuchsende gründlich geputzt. Am Abend musste man die Organbäder mit Aqua destillata und mit Hilfe einer Bürste reinigen, um eventuelle Organreste vom Glas wegzubekommen.

Dann wurde mit HCl gespült, und nochmals mit Aqua destillata ausgewaschen. In der Früh vor Versuchsbeginn wurden die Organbäder mit Wasser ausgewaschen und dann mit frischer Nährlösung gefüllt, damit diese durch das Einschalten der Wasserbäder die richtige Temperatur erreicht.

3.6.1. Wirkstärke der Substanzen bei isolierten Meerschweinchenorganen

3.6.1.1. Atrium dexter

Abbildung 16: Rechter Vorhof



Nach Entnahme des Herzens wurde der rechte Vorhof isoliert und für den Versuchsvorgang mit Haken versehen. Hier war darauf zu achten, dass der Vorhof nicht zu sehr gespannt eingehängt wurde, sondern eher locker befestigt war. Danach wurde dieser vorsichtig in das Gefäß mit 25 ml begaster Nährlösung der Apparatur II eingetaucht. Das Ganze sollte möglichst schnell und vorsichtig erfolgen, damit es nicht zu Beeinträchtigung der Schlagfähigkeit des Vorhofes kommt. Weil der Vorhof spontan schlug, musste dieser nicht elektrisch gereizt werden. Anschließend konnte man den Schreiber einschalten und mit der Einstellung des Vorgehens

des Versuchsablaufs beginnen. Zu Beginn musste der Schreiber auf 5 mV und auf Speed 5 mm/sec gestellt werden. Dann folgte die Nullpunkt Einstellung mit einem Zero-Drehrad, wobei der Amplifier kurz darauf in Betrieb genommen wurde, und es musste wieder zum Nullpunkt nachjustiert werden. Darauffolgend arbeitete man mit dem Feintrieb, welcher für die Vorspannung des Organs wichtig war, um während des Versuches eine maximale Kontraktionskraft zu erreichen.

Die Vorspannung des Organs wurde mit dem Feintrieb auf 10,4 mN gestellt. Die Vorspannung wurde wegen der Plastizität der Organe ausgeführt und hatte den Sinn immer die gleichen Ausgangsbedingungen zu schaffen. Es wurde eine ungefähr 45 Minuten lange Anpassungsphase mit der Kontrollmessung gemacht und alle 5 Minuten wurde der Schreiber auf Pen Down gedrückt und dann über 12 Sekunden, welche auf dem Millimeterpapier 6 Kästchen (= 6 cm) entsprach, die Schläge aufgezeichnet. Die Anzahl der Schläge sollte über mindestens vier Messungen konstant sein und dann war es möglich mit dem eigentlichen Versuch zu beginnen. Zuerst wurde die erste Substanzzugabe von 3 µl zugegeben und anschließend alle fünf Minuten die Schlagfrequenz aufgezeichnet. D.h. alle fünf Minuten wurden sechs Kästchen gezeichnet. Das Ganze wurde über eine Dauer von 45 Minuten durchgeführt. Der gleiche Vorgang wiederholte sich bei den nächstfolgenden Einspritzungen

von 7 µl, 20 µl und 70 µl. Die endgültige Maximalkonzentration wies 100 µmol/l in Organbad auf. Es wurde darauf geachtet, dass es bei der Gabe der Substanz mit der Finnmikropipette in die Organbadlösung, zu keiner Berührung der Silberdrähte und des Kraftwandlers kommt. Ansonsten wäre eine veränderte Aufzeichnung die Folge.

3.6.1.2. *Musculus papillaris*

Der schon präparierte Papillarmuskel wurde in die Apparatur I eingespannt und dann in die Muskelkammer mit 25 ml temperierte Nährlösung eingetaucht. Dann erfolgte die Spannung des Organs auf 3,92 mN. Wichtig war, dass die Spannung während des ganzen Versuchsablaufs konstant blieb und falls nötig mit dem Feintrieb stets nachjustiert wurde, um eine Abnahme der Kontraktionskraft durch eine verringerte Ausgangsspannung zu vermeiden. (Reiter M 1967). Verglichen mit dem spontan schlagenden Vorhof musste der Papillarmuskel elektrischen gereizt werden, welches mit einem Reizgerät Accupulser A310 (World Precision Instrument Hamden, FL, USA) ausgeführt und über die Silberchloridelektroden übertragen wurde.

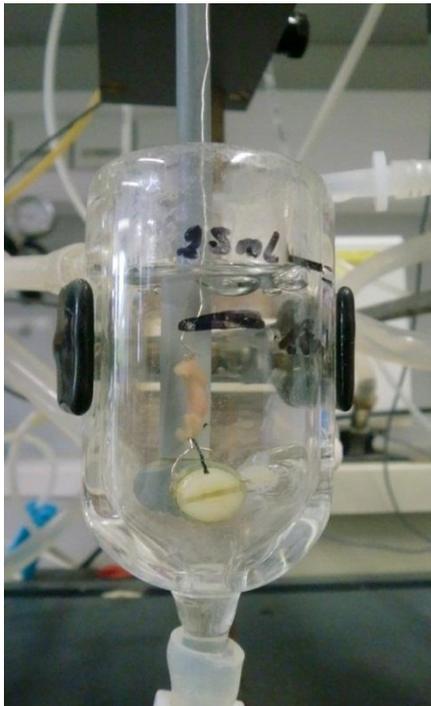
Somit konnte der Papillarmuskel Kontraktionen abwickeln. Wenn aber eine Kontraktion ohne Reizung festgestellt wurde, war das meistens ein Hindeuten auf noch vorhandene und nicht ganz entfernte Purkinje Fasern. Diese musste man abtrennen und entfernen bevor es weiter mit dem Versuchsablauf ging. Nach der kurzen Anpassungszeit wurde der Muskel mit Rechteckimpulsen von 10 ms^{-1} Länge und einer Frequenz von 1 Hertz zur Stimulation befähigt. Die einleitende Stromstärke wurde über die Isolation Unit festgesetzt und befand sich ungefähr 10% über der minimalen Reizschwelle. Das war deswegen von Bedeutung, weil bei einer zu hohen Stromstärke, kommt es zur Ausschüttung der Catecholaminspeicher und als Folge zur Verfälschung der Versuchsergebnisse (Furchgott et al. 1959).

Die daraus folgenden veränderten Ergebnisse wären als sogenannte „run down“ ersichtlich, und die Amplitude des sich kontrahierenden Papillarmuskels würde von alleine abnehmen. Die Erledigung der Kontrollphase und die Einstellungen am Schreiben sind gleich dem des rechten Vorhofes. Als einziger Unterschied war zu berücksichtigen, dass die Aufzeichnung nicht über eine Distanz von sechs Zentimeter gemacht wurde, sondern nur von der Anzahl der Amplituden abhängig war. Es wurden immer ungefähr sechs Amplituden alle fünf Minuten zu Papier gebracht. Nachdem die Kontrollphase vollendet war, wurde mit der Substanzzugabe

nach dem kumulativen Schema 3, 7, 20, 70 μl in zeitlichen Abstand von 45 Minuten vollzogen. Um ein präzises Vermessen der Amplituden gewährleisten zu können, musste am Ende jedes Konzentrationsintervalls die letzte Messung mit Speed 20 mm/sec vorgenommen werden.

3.6.1.3. Terminales Ileum

Abbildung 17: Ileumstück



Das isolierte und präparierte Ileumstück wurde in die Organhalterung mit den zwei eingeführten Silberhaken eingespannt. Der im Tier jejunal zugewandte Abschnitt war oben. Der Darm musste behutsam und vorsichtig behandelt werden, ohne, dass dieser überdehnt wird. Nach Anbringen des Darmstücks in die Halterung, wurde dieser vorsichtig in das temperierte Nährlösungsbad eingebracht. Als nächster Schritt war die Geräteaktivierung. Die Vorspannung war bei 5 mV mit 4,92 mN. Nach der empfohlenen Akklimatisierungsphase des Organs über eine Zeitdauer von 20 Minuten, musste eine mögliche Verschiebung des Nullpunktes mit der Stellschraube (= Feintrieb) erfolgen. Die Anpassung auf den Nullpunkt war erforderlich wegen der Peristaltik des Darms. Danach folgte, dass man den Schreiber des Kipp & Zonen Gerätes herunter gab und die Tyrode aus dem Gefäß über eine am Ablaufschlauch angebrachte Klammer abließ und genau 25 ml einer 60 mmolaren Kaliumchlorid-Lösung hineinfüllte.

Die KCl- Lösung wurde jeden Tag, durch die Einwaage von 0,45 KCl und das Auffüllen mit Tyrode bis zur Markierung des 100 ml Messkolbens frisch zubereitet. Dadurch konnte eine sofortige Kontraktion des Organs hervorgebracht und mit dem Flatbad-Recorder aufgezeichnet werden. Die somit hervorgerufene Kontraktion des Darms unterscheidet sich sehr von der der Aorta oder der Arteria pulmonalis. Am Anfang ist eine starke Kontraktion am Millimeterpapier ersichtlich, dann aber fiel diese wieder bis nahezu der Hälfte ab und pendelte sich erst langsam auf eine konstante Kontraktion ein.

Nach ungefähr 45-60 Minuten konnte mit einer Plateauphase gerechnet werden, bei der eine gleich bleibende Kontraktion zu sehen war. Eine ständige Abnahme der Kontraktion, ohne Plateauphase bzw. kurz dauernder Plateauphase, war ein Hinweis auf nicht zu verwendete Darmpräparate. Weil diese bei der Auswertung später nicht verwendet werden konnten. Die Testsubstanz wurde alle 45 Minuten hinzugefügt, aber erst dann, als sich die Kontrollphase eingestellt hatte.

3.6.1.4. Aorta

Abbildung 18: Aortastücke



Die ringförmig geschnittene Aorta wurde ohne dass sie beschädigt wird in die Aufhängevorrichtung der Apparatur II eingebracht. Dann wurde die Halterung mit der Aorta in das Bad mit Nährlösung gegeben, sodass das Organ mindestens 1 cm unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche lag. Man schaltete den Amplifier und den Schreiber ein. Dann wurde das Organ bei 10 mV auf 10 cm vorgespannt, das entsprach in etwa 19,6 mN. Nach einer 20 Minuten langen Gewöhnungsphase wurde das Gerät auf 5 mV geändert und der dadurch verschobene Nullpunkt am Millimeterpapier mit dem Feintrieb in Ordnung gebracht.

Somit konnte die Aufzeichnung gestartet werden und der Austausch der Tyrode durch eine Kaliumchlorid Lösung erfolgen. Die Kaliumchlorid Lösung unterschied sich im Gegensatz zu der des Ileums. In dem Fall beträgt sie 90 mmol und wird durch das Lösen von 0,67 g KCl in einem 100 ml Messkolben mit Nährlösung angefertigt.

Die Kaliumchlorid Lösung ruft eine unmittelbare Kontraktion hervor die am Beginn sehr rasch erfolgt und sich dann in den nächsten 45 Minuten langsam wieder auf einem konstanten Niveau begab. Die Höhe der Kontraktionskraft nahm man als Ausgangs- bzw. Referenzwert. Danach konnte die Substanzzugabe nach dem schon mehrmals erwähnten Pipettierschema erfolgen.

3.6.1.5. Arteria pulmonalis

Die Vorbereitung für den Versuchsvorgang der Arteria pulmonalis entsprach dem der Aorta. Zum Unterschied wurde die Vorspannung bei 5 mV vorgenommen und war einer Kraft von 9,81 mN gleichzustellen. Die Abnahme der chemisch hervorgerufenen Kontraktion nach Gabe der Testsubstanz wurde dann durch einen Kurvenverlauf auf dem Millimeterpapier anschaulich gemacht.

3.6.2. Wirkmechanismus der Substanz in Kombination mit Antagonisten am Darm

Der Darm wurde verwendet, weil an diesen die Substanz MAH8 HCl die stärkste Wirkung zeigte.

3.6.2.1. Versuchsablauf mit Glibenclamid und Nitro-L-Arginin

Die Darmstücke wurden wie schon besprochen isoliert und nach der ebenfalls erwähnten Methode präpariert. Die Vorspannung betrug 4,92 mN bei 5 mV. Das Erreichen der maximalen Kontraktion und der steady state Phase war von Bedeutung, bevor mit der Antagonisten Zugabe begonnen wurde. Mit Hilfe der Antagonisten konnte der mögliche Wirkmechanismus der Substanz überprüft werden. Es wurde jeweils 100 µl Antagonisten-Stammlösung eingespritzt, damit man eine Endkonzentration von 100 µmol/l im Organbad erhält. Die Stammlösung wurde frisch vor Arbeitsbeginn angefertigt, indem die erforderliche Substanzmenge mit 100 ml Lösungsmittel gemischt wurde. Das Ganze erfolgte nach einem bestimmten Schema, welche in der unteren Tabelle ersichtlich ist. Sowohl bei Glibenclamid als auch bei Nitro-L-Arginin Versuchen wurde mit einer Konzentration von 100 µmol/l gearbeitet. Nach 45 Minuten konnte man anschließend 25 µmol/l der Testsubstanz MAH8 HCl hinzufügen und nach weiteren 45 Minuten ist man zum Versuchsende gelangt.

Tabelle 4: Herstellung der Antagonisten Stammlösung

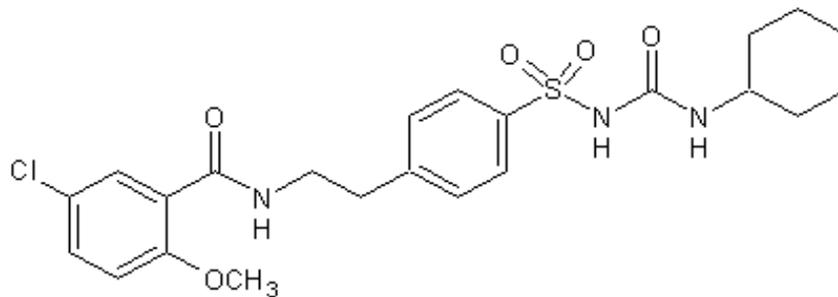
Substanz	Molare Masse (g/mol)	Einwaage der Testsubstanz (100 µmol/l) / Organbad	Lösungsmittel 100µl
Nitro-L-Arginin	219,20	0,55 mg	60 mM KCl-Lösung
Glibenclamid	494,0	1,24 mg	DMSO

3.7. Verwendete Antagonisten

Es wurden zwei spezielle Antagonisten für die Überprüfung des Wirkmechanismus verwendet.

3.7.1. Glibenclamid

Abbildung 19: Glibenclamid (MG = 494,0 g/mol)

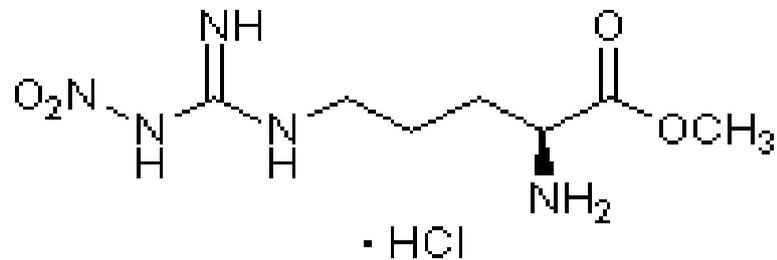


Glibenclamid gehört zur Gruppe der Sulfonylharnstoff-Derivaten und wird auch wegen seiner blutzuckersenkenden Wirkung als orales Antidiabetikum angewendet. Seine Funktion liegt darin, dass es die Kaliumkanäle von B-Zellen des Pankreas blockiert, wodurch es zu einer Abnahme der Kaliumpermeabilität und damit verbunden auch des Membranpotentials kommt. Daraufhin werden dann spannungsabhängige Calciumkanäle geöffnet. Es kommt zu einer Erhöhung der Calciumionenkonzentration intrazellulär und somit zu einer gesteigerten Exozytose von Insulin.

Zu den Nebenwirkungen von Glibenclamid zählen vor allem gastrointestinale Beschwerden aber auch allergische Reaktionen. In ganz seltenen Fällen kann es zu Leukopenie und Thrombozytopenie kommen. Bei Zuckererkrankten kann die Gabe von Glibenclamid, welches zu den stark wirksamen Medikamenten gehört, zu schweren hyperglykämischen Zuständen führen (Mutschler et al. 2008).

3.7.2. Nitro-L-Arginin

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



Das Nitro-L-Arginin ist ein NO-Antagonist, weil es die NO-Synthase kompetitiv inhibiert. Stickstoffmonoxid (NO) wurde früher auch als „Endothelium-derived relaxing factor“ genannt. Es ist ein endogener Stimulator der Guanylatcyclase und durch dessen Aktivierung steigt ebenfalls das intrazelluläre cyclische Guanosinmonophosphat an. Dadurch kommt es zur vermehrten Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischem Retikulum, und somit zur Relaxation der glatten Muskulatur. Wenn aber das Nitro-L-Arginin diesen Mechanismus blockiert, dann kommt es zu keiner Erschlaffung der Gefäße. Der Effekt von Nitro-L-Arginin wurde mit Hilfe verschiedener Methoden untersucht und es wurde nachgewiesen, dass die Kontraktilität des Darms beispielsweise deutlich erhöht wurde (Mutschler et al. 2008).

3.8. Auswertung und Statistik

3.8.1. Atrium dexter

Beim rechten Vorhof wurde ein Augenmerk auf die Chronotropie = Schlagfrequenz (Schläge/Minute) gelegt. Nach der Kontrollphase wurde die Substanz zugegeben und man konnte dann die Veränderung bezogen auf die Anzahl der Herzschläge beobachten. Die Messung erfolgte in einem fünf Minuten Takt über eine Länge von sechs Zentimetern. Der Schreiber hielt am Millimeterpapier die Ausschläge fest, die in diesem Bereich gezeichneten Kästchen wurden gezählt und mit fünf multipliziert, damit erhielt man die Schlagfrequenz pro Minute. Somit konnte man einen positiven oder negativen chronotropen Effekt auf den Vorhof nachweisen, bei kumulativer Zugabe des Wirkstoffs.

3.8.2. *Musculus papillaris*

Die Experimente für den Papillarmuskel waren für die Bestimmung der Kontraktionskraft in mN angegeben. Während des Versuches wurden in fünf Minuten Rhythmus die Amplituden mit einem Lineal vermessen und der Mittelwert in Zentimeterangaben aufgeschrieben. Dieser Wert wurde dann mit dem Eichfaktor des Kraftwandlers multipliziert, um dadurch die tatsächliche Größe der Kontraktion zu erhalten. Der ermittelte Kontrollwert war am Anfang 0% und dadurch konnte dann jede Inotropieveränderung erfasst werden.

3.8.3. *Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum*

Bei den Versuchen an der Aorta, Arteria pulmonalis und am terminalen Ileum war eine denkbare dilatierende Wirkung der Testsubstanz ersichtlich. Nach Zugabe einer Kaliumchlorid Lösung, erreichte das Organ eine maximale Kontraktion, nach einer gewissen Zeit zeigte sich dann eine Plateauphase, ein sogenanntes „steady state“. Damit die Auswertung richtig erfolgt, mussten beim Einspritzen die unterschiedlichen Substanzkonzentrationen am Millimeterpapier gekennzeichnet werden.

Es wurden die Abstände zur Nulllinie in Zentimeter ermittelt und dann mit dem Eichfaktor multipliziert, welcher abhängig von der Einstellung der mV Angaben am Schreiber war. Wenn die Messung bei 5 mV erfolgt hat, war 1 cm mit 0,98 mN gleichzusetzen, wobei man diesen Wert dann noch bei 2 mV mit 0,2 und bei 10 mV mit 2 multiplizieren musste. Die Markierung der Konzentrationsänderung auf der Kurve am Millimeterpapier diene ebenfalls als Hilfsmittel für die weitere Auswertung, weil immer der Moment der nächsten Einspritzung als Beendigung der vorhergehenden angesehen wurde. Um den Kontrollwert (0%) zu ermitteln, musste man das Lineal bei der Markierung der gekennzeichneten ersten Zugabe der Substanz (3 μ l) anlegen.

3.8.4. Statistik

Dadurch, dass die Substanz MAH8 HCl in Wasser löslich war, konnten die ermittelten Werte ohne Abzug des Lösungsmittels übernommen werden. Die Schlagfrequenz (f) und die Kontraktionskraft (f_c) waren in mN bzw. in Schläge/Minute, als auch in Prozent berechnet. Aus den ermittelten Messdaten konnte dann der arithmetische Mittelwert und der Standardfehler ausgerechnet werden, hier wurden nur die mN Werte verwendet, um einer weiteren Streuung der Ergebnisse bzw. eine höhere Signifikanz entgegen zu wirken. Als Hilfe wurde ein spezielles Programm verwendet, das sogenannte „Sigma Plot 9.0“, welches dann weitere statistische Berechnungen wie zum Beispiel den EC_{50} Wert ermöglichte. Dieser Wert zeigt jene Konzentration in mmol/l dar, bei der die Kontraktionskraft oder die Schlagfrequenz die Hälfte ihres Kontrollwertes ausmacht.

Um es graphisch vereinfacht darstellen zu können, wurden anschauliche Konzentrations-Wirkungskurven erstellt und daraus ist der EC_{50} Wert gut ersichtlich. Außerdem wurden die Messwerte bezüglich ihrer Signifikanz beurteilt. Für die Ermittlung der Irrtumswahrscheinlichkeit wurde ein „Student-t-Test“ vollzogen, um gepaarte Beobachtungen durchführen zu können. Als signifikant bzw. sehr signifikant einzustufen waren Werte mit der Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 5\%$ ($P < 0,05$) bzw. $< 1\%$ ($P < 0,01$), und die Werte $< 0,1\%$ ($P < 0,001$) als hochsignifikant. Bei den Werten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $> 5\%$ ($P > 0,05$) handelte sich um nicht signifikante Werte.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der Testsubstanz MAH8 HCl

4.1.1. Wirkung von MAH8 HCl auf den Vorhof

Die Testsubstanz wurde in Bezug auf die Schlagfrequenz des Atrium cordis dexter im Verlauf von vier Versuchen untersucht. Nach den Versuchen konnte mit Hilfe einer Berechnung des arithmetischen Mittels ein Kontrollwert (entspricht 0%) von $206,25 \pm 15,46$ Schläge pro Minute errechnet werden. Die Substanz zeigt mit immer größerer Zugabe an Wirksubstanz eine immer deutlich werdende negativ chronotrope Wirkung. Bei allen vier Versuchen im maximalen Konzentrationsbereich von $100 \mu\text{mol/l}$ verlor das Vorhofpräparat seine Aktivität und die Schlagfrequenz sank auf 0 herab.

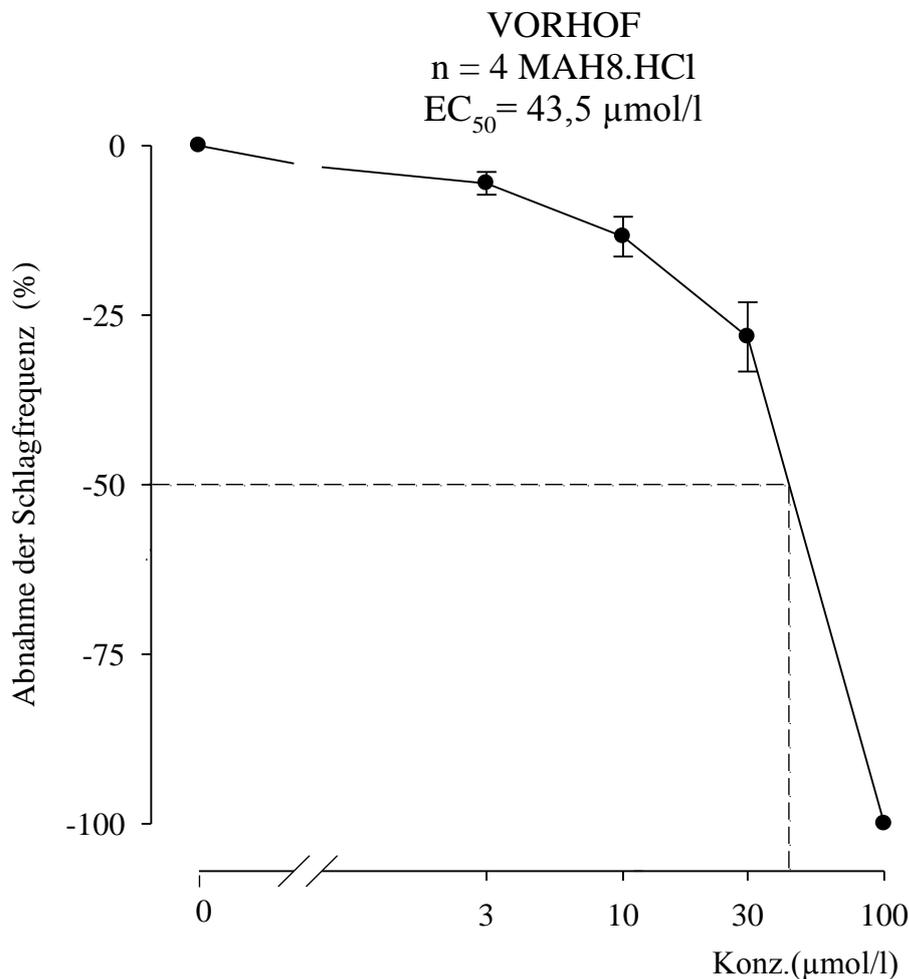
Tabelle 5: Wirkung von MAH8 HCl auf das Atrium dexter

MAH8 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	f \pm SEM (x/min)	f \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$206,25 \pm 15,46$	0 ± 0	4	-
3	$190,00 \pm 13,69$	$-5,57 \pm 1,68$	4	n.s.
10	$178,75 \pm 15,05$	$-13,43 \pm 2,94$	4	0,05
30	$147,50 \pm 13,31$	$-28,21 \pm 5,11$	4	0,01
100	0 ± 0	$-100,00 \pm 0,00$	4	0,001

Legende zu Tabelle 5:

In der Tabelle sind ersichtlich die errechneten arithmetischen Mittelwerte in Anzahl/min als auch in %, und deren Standardfehler. Der Buchstabe klein f bezieht sich hier auf die Schlagfrequenz/Minute.

Diagramm 1: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH8 HCl am rechten Vorhof

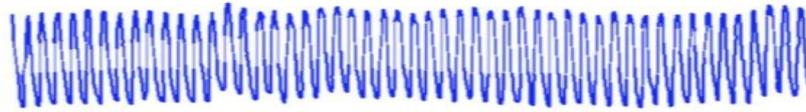


Legende zu Diagramm 1:

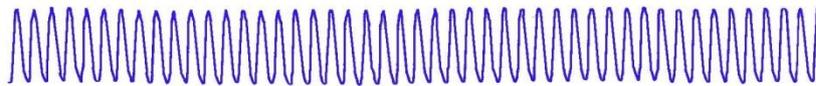
In diesem Diagramm kann man die Kurve sehen, die den Einfluss des Wirkstoffs MAH8 HCl auf die Frequenz der Schläge und deren Abnahme zeigt. Auf der x-Achse sieht man die Konzentration der Substanz in µmol/l und auf der y-Achse ist die Abnahme der Schlagfrequenz in Prozent dargestellt. Die schwarzen Punkte weisen auf die arithmetischen Mittelwerte hin und dessen Balken kennzeichnen ihre Standardfehler. Mittels strichlinierter Linie ist der EC₅₀-Wert ersichtlich, welcher auf die 50%ige Abnahme der Schlagfrequenz bezogen auf den Kontrollwert deutet.

Abbildung 21: Originalaufzeichnung der Wirkung von MAH8 HCl auf den rechten Vorhof

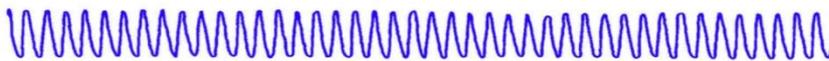
Kontrolle



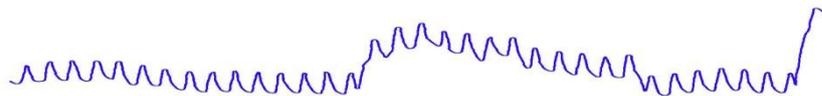
3 $\mu\text{mol/l}$



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



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



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



1 cm=0,98 mN



12 sec



Legende zur Abbildung 21:

Auf der Originalabbildung kann man die Abnahme der Schlagfrequenz eines rechten Vorhofes nach kumulativer Zugabe des Wirkstoffs MAH8 HCl sehen.

4.1.2. Wirkung von MAH8 HCl auf den isolierten Papillarmuskel

Bei der Untersuchung des Wirkstoffs auf den isolierten Papillarmuskel wurden ebenfalls vier Versuche durchgeführt. Erst nach dem Erreichen einer konstanten Kontraktionskraft des Papillarmuskels konnte die Zugabe der Substanz nach dem Pipettierschema erfolgen. Die Substanz MAH8 HCl wies schon bei der ersten Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ eine starke Wirkung auf. Durch immer weitere Zugabe der Substanz nahm die Kontraktionskraft deutlich ab und erreichte einen Wert von $-90,01 \pm 2,94$ % des Kontrollwertes. Beim Versuch mit dem Papillarmuskel konnte ein EC_{50} -Wert sehr schnell erreicht werden und betrug 5,45 $\mu\text{mol/l}$.

Tabelle 6: Wirkung von MAH8 HCl auf den Musculus papillaris

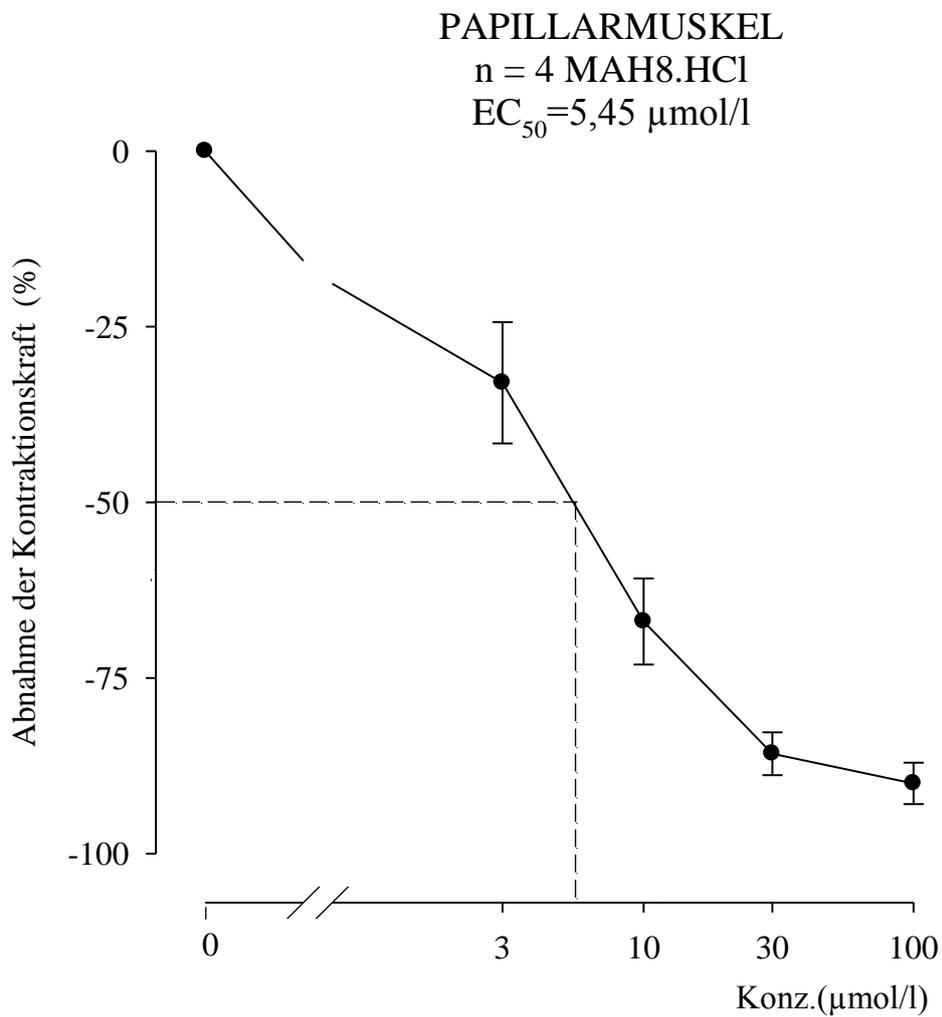
MAH8 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$0,98 \pm 0,12$	0 ± 0	4	-
3	$0,66 \pm 0,12$	$-32,99 \pm 8,64$	4	0,05
10	$0,33 \pm 0,07$	$-66,97 \pm 6,13$	4	0,01
30	$0,14 \pm 0,03$	$-85,79 \pm 3,04$	4	0,001
100	$0,10 \pm 0,03$	$-90,01 \pm 2,94$	4	0,001

Legende zu Tabelle 6:

In dieser Tabelle sind von vier Versuchen der arithmetische Mittelwert und ihre Standardfehler angegeben, wobei die Werte sich immer auf die Kontrollmessung beziehen.

Die Bezeichnung f_c steht für die Kontraktionskraft welche sowohl in mN als auch in % angegeben ist.

Diagramm 2: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH8 HCl am Papillarmuskel

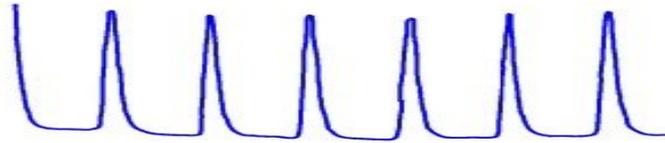


Legende zu Diagramm 2:

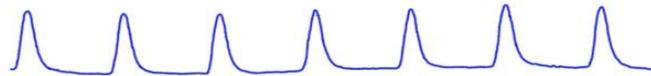
In der Konzentrations- Wirkungskurve kann der Effekt der Substanz besser dargestellt werden. Im Bereich der x-Achse sind die Konzentrationen der Substanz in µmol/l angegeben und auf der y-Achse wurde die Abnahme der Kontraktionskraft in % dargestellt.

Abbildung 22: Originalaufzeichnung der Wirkung von MAH8 HCl auf den Papillarmuskel

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 22:

In der Originalabbildung sieht man deutlich beim Versuch mit dem Papillarmuskel die Verkleinerung der Amplitude durch die kumulative Zugabe der Testsubstanz. Jede Zugabe der Substanz wurde 45 Minuten lang getestet, wobei alle 5 Minuten eine Aufzeichnung der Amplitude erfolgte.

4.1.3. Wirkung von MAH8 HCl auf die Aorta

Es wurden vier Versuche an der Aorta gemacht. Der Kontrollwert lag bei $12,76 \pm 2,21$ mN und entsprach 0%. In Bezug auf die Kontraktionskraft sah man noch keine wirkliche Abnahme bei den ersten zwei Konzentrationen. Erst ab einer Konzentration von $30 \mu\text{mol/l}$ im Organbad kam es langsam zu einer dilatierenden Wirkung, die sehr deutlich zu sehen war. Auf die Aorta hatte die Substanz keine besonders stark dilatierende Wirkung, da ein EC_{50} -Wert erst bei einer Konzentration von $91,5 \mu\text{mol/l}$ erreicht werden konnte.

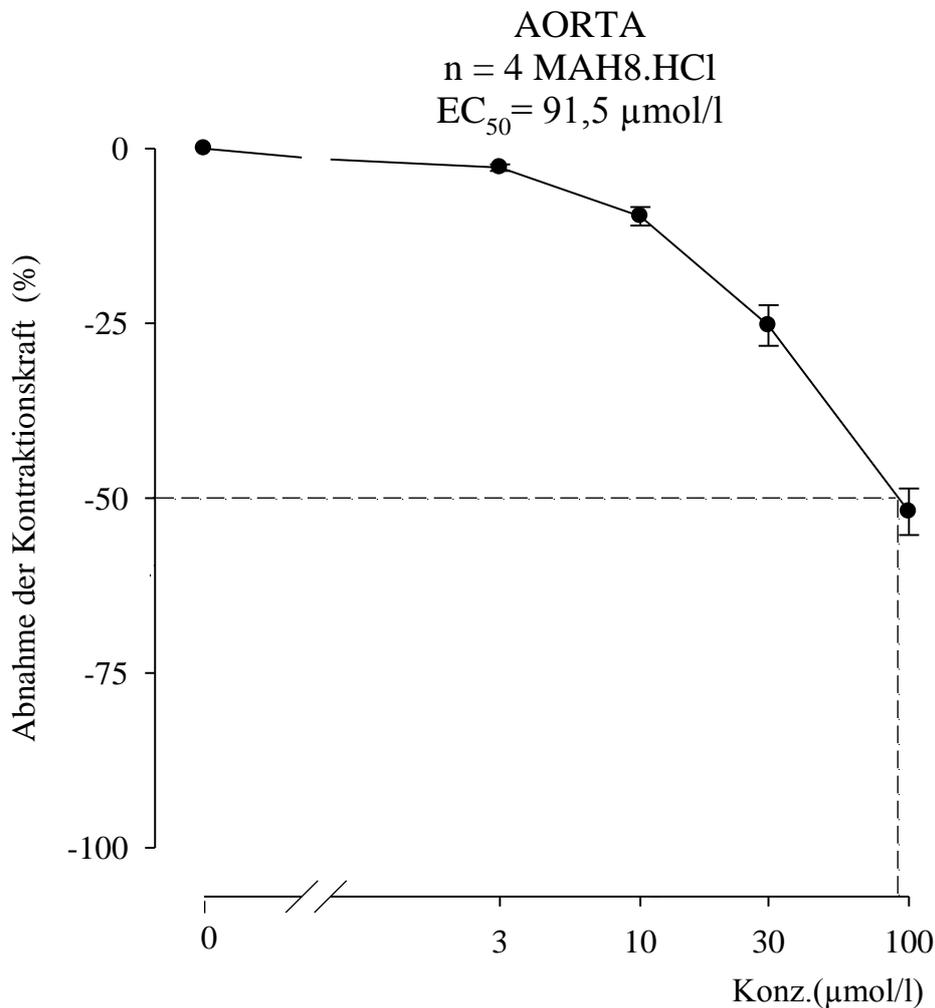
Tabelle 7: Wirkung von MAH8 HCl auf die Aorta

MAH8 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$12,76 \pm 2,21$	0 ± 0	4	-
3	$12,41 \pm 2,14$	$-2,73 \pm 0,46$	4	n.s.
10	$11,52 \pm 2,01$	$-9,69 \pm 1,32$	4	0,05
30	$9,49 \pm 1,69$	$25,31 \pm 2,90$	4	0,05
100	$6,41 \pm 1,38$	$51,94 \pm 3,33$	4	0,01

Legende zu Tabelle 7:

In der Tabelle kann man anhand der vier Versuche, die ermittelten arithmetischen Mittelwerte und den Standardfehler ablesen. Die Bezeichnung f_c steht für die Kontraktionskraft.

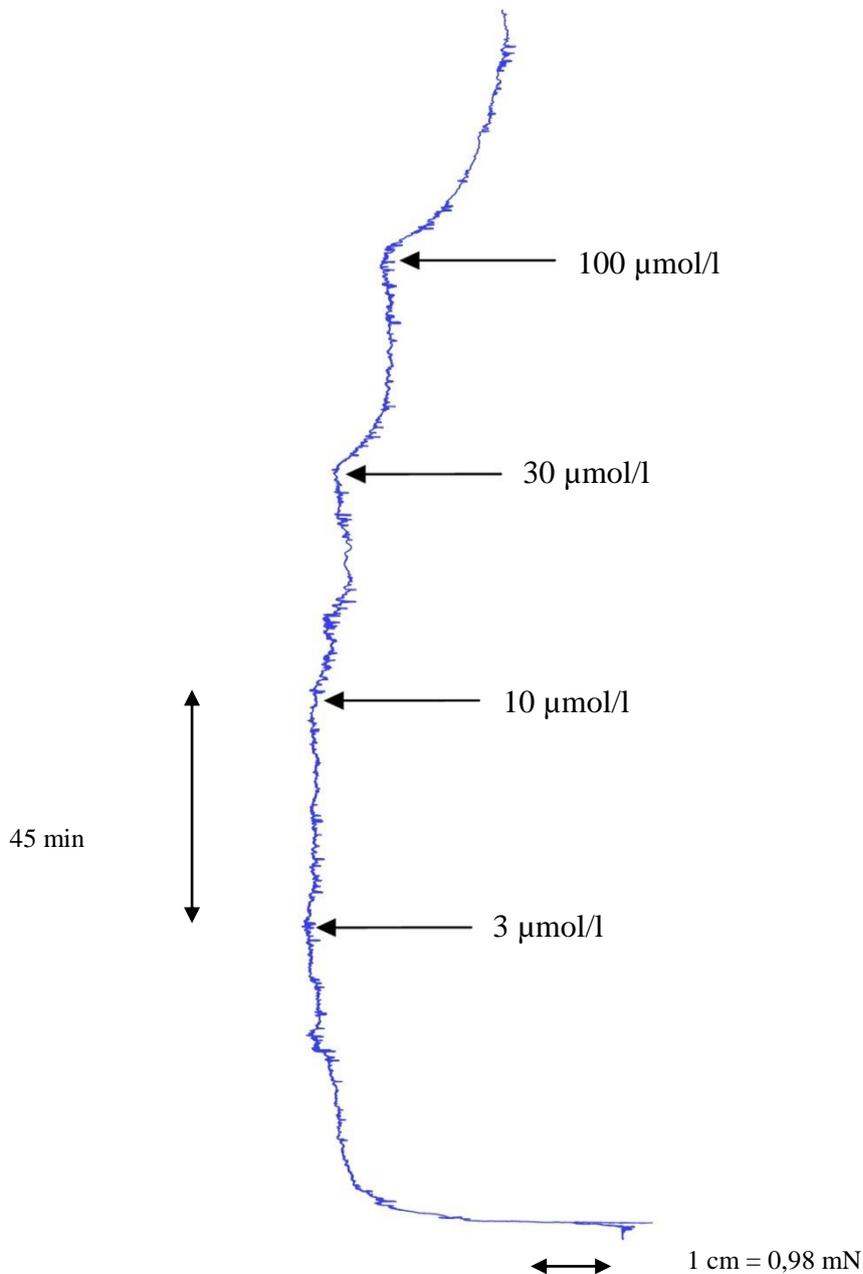
Diagramm 3: Konzentrations- Wirkungskurve von MAH8 HCl bei der Aorta



Legende zu Diagramm 3:

Bei dieser Graphik kann man gut erkennen, dass bei den ersten zwei Konzentrationen kaum eine dilatierende Wirkung an der Aorta zu sehen ist. Die Konzentrationen in µmol/l sind auf der x-Achse aufgetragen und die dilatierende Wirkung auf das Organ ist über die Ordinate der y-Achse in Prozent angegeben. Der EC₅₀-Wert wurde erst bei 91,5 µmol/l erreicht und ist durch die strichlinierte Linie sichtbar.

Abbildung 23: Originalaufzeichnung der Wirkung von MAH8 HCl auf die Aorta



Legende zu Abbildung 23:

Die Abbildung zeigt die dilatierende Wirkung der Substanz auf die Aorta. 45 Minuten lang dauerte der Intervall der Konzentrationsänderung. Die Pfeile zeigen die zugegebenen Substanzmengen nach dem Pipettierschema. Zuerst 3 µl, dann 7 µl, entspricht einer Konzentration von 10 µmol/l, dann 20 µl, entspricht 30 µmol/l und am Ende die Zugabe von 70 µl, um eine Endkonzentration von 100 µmol/l im Organbad zu erhalten.

4.1.4. Wirkung von MAH8 HCl auf die Arteria pulmonalis

Um die Vasodilatation an der Arteria pulmonalis festzustellen, wurden vier Präparate untersucht. Die Substanz wurde alle 45 Minuten in den Konzentrationen von 3, 10, 30, 100 $\mu\text{mol/l}$ zugegeben. Der Kontrollwert wurde aus allen vier Versuchen ermittelt und beträgt, $14,05 \pm 1,56$ mN, das entspricht den 0%-Wert. Die Abnahme der Kontraktionskraft verlief am Anfang langsam, bei den ersten zwei Konzentrationen ist eine schwach dilatierende Wirkung zu sehen. Erst bei einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ ist eine stärkere negativ inotrope Wirkung gegeben. Im Unterschied zu der Aorta konnte jedoch bei der Arteria pulmonalis der EC_{50} -Wert nicht erreicht werden.

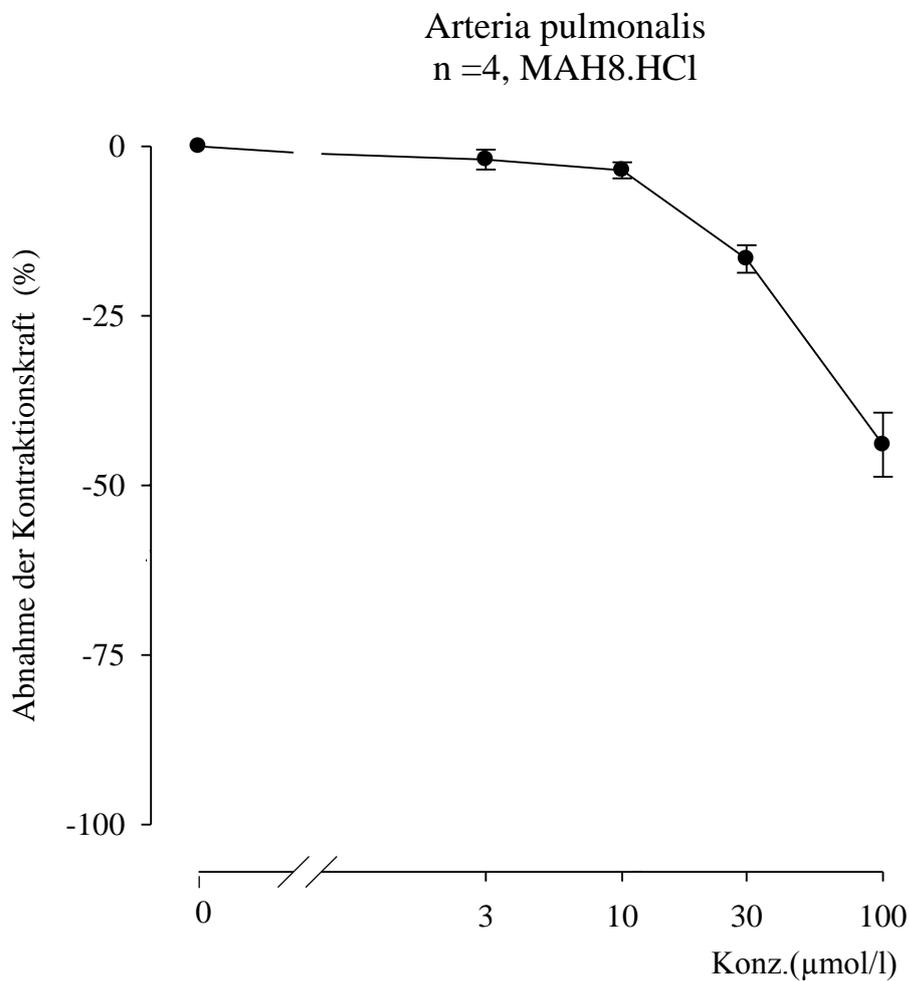
Tabelle 8: Wirkung von MAH8 HCl auf die Pulmonalarterie

MAH8 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$14,05 \pm 1,56$	0 ± 0	4	-
3	$13,74 \pm 1,55$	$-1,95 \pm 1,47$	4	n.s.
10	$13,50 \pm 1,47$	$-3,54 \pm 1,19$	4	n.s.
30	$11,66 \pm 1,27$	$-16,60 \pm 2,03$	4	0,05
100	$7,94 \pm 1,22$	$-44,01 \pm 4,73$	4	0,01

Legende zu Tabelle 8:

In der Tabelle sind die arithmetische Mittelwerte und deren Standardfehler aus vier Versuchen, sowohl in mN als auch in Prozent angegeben.

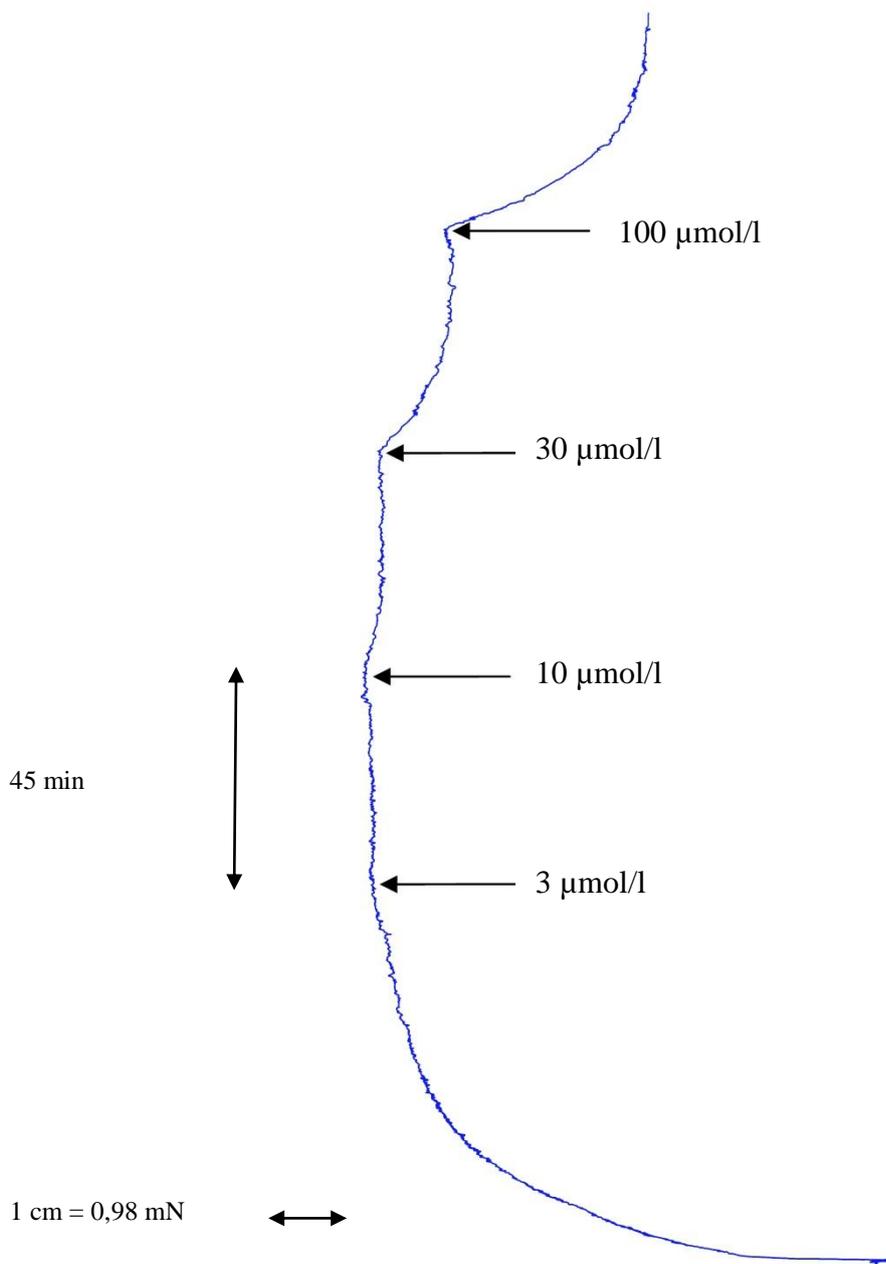
Diagramm 4: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH8 HCl bei der Arteria pulmonalis



Legende zu Diagramm 4:

Hier kann durch die graphische Darstellung einer Konzentrations-Wirkungskurve der Effekt von MAH8 HCl auf die Arteria pulmonalis gezeigt werden. Auf der x-Achse ist die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ zu sehen und auf der y-Achse ist die Abnahme der Kontraktionskraft ersichtlich. Die schwarzen Punkte weisen auf die errechneten arithmetische Mittelwerte und die Balken stellen den Standardfehler dar.

Abbildung 24: Originalaufzeichnung der Wirkung von MAH8 HCl auf die Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 24:

Die Kurve zeigt eine vasodilatierende Wirkung von MAH8 HCl auf die Arteria pulmonalis. Die dargestellten Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Substanzzugabe nach dem Pipettierschema. Nach der letzten Substanzzugabe von 70 µl beträgt dadurch die Endkonzentration im Organbad 100 µmol/l.

4.1.5. Wirkung von MAH8 HCl auf den Darm

Es wurden mehrere Versuchsabläufe bezüglich der dilatierenden Wirkung von MAH8 HCl auf das terminale Ileum gemacht. Vier Versuche waren funktionsfähig und konnten für die Beurteilung verwendet werden. Der 0%-Wert ergab sich aus dem Mittelwert und entsprach $12,62 \pm 0,92$ mN. Bei der Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ konnte eine leicht dilatierende Wirkung erzielt werden, bei weiterer Zugabe der Substanzmenge kam es zu einer starken Vasodilatation. Bei 100 $\mu\text{mol/l}$ war nur noch - 96,75 \pm 3,25 % des Kontrollwertes der Kontraktion zu vermerken. Der EC_{50} -Wert wurde bei 20,5 $\mu\text{mol/l}$ erreicht.

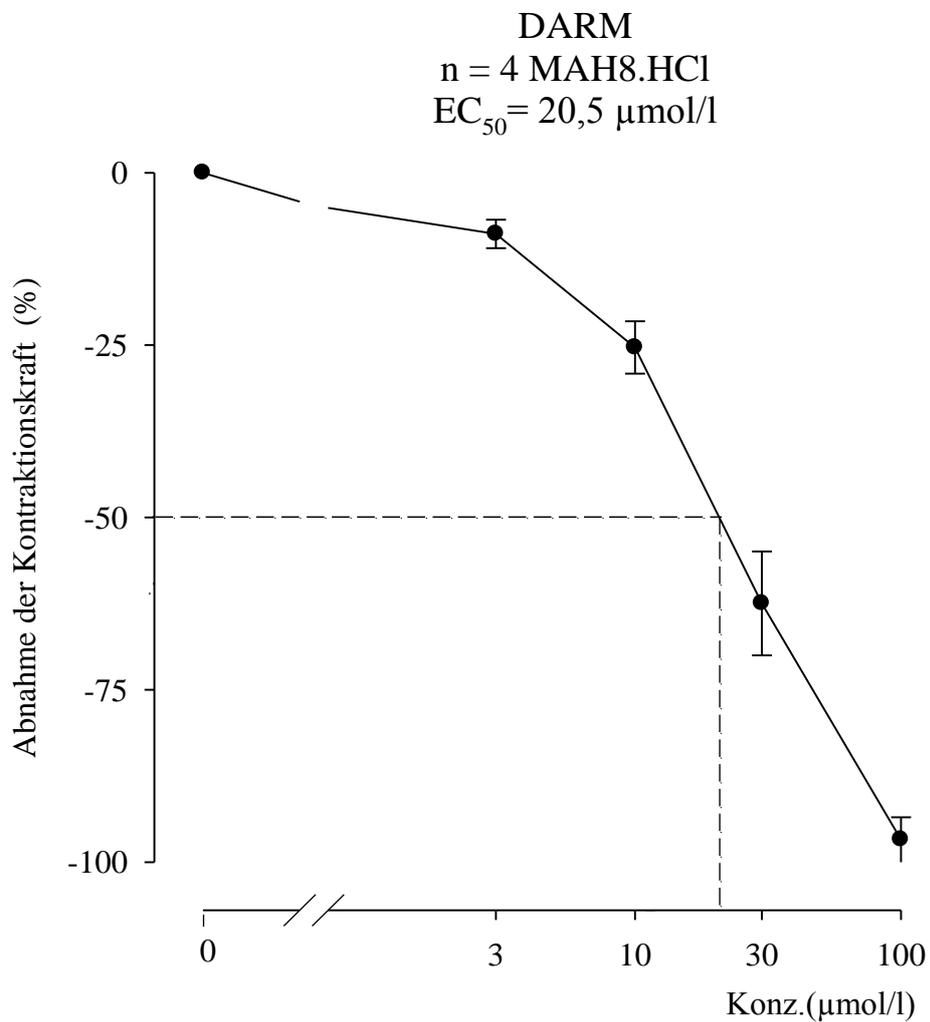
Tabelle 9: Wirkung von MAH8 HCl auf das terminale Ileum

MAH8 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$12,62 \pm 0,92$	0 ± 0	4	-
3	$11,5 \pm 0,90$	$-8,88 \pm 2,05$	4	n.s.
10	$9,45 \pm 0,92$	$-25,35 \pm 3,80$	4	0,05
30	$4,86 \pm 1,13$	$-62,47 \pm 7,54$	4	0,01
100	$0,37 \pm 0,37$	$-96,75 \pm 3,25$	4	0,001

Legende zu Tabelle 9:

In der Tabelle sind die aus vier Versuchen ermittelten Mittelwerte notiert und die jeweiligen Standardfehler. Die Werte der verschiedenen Konzentrationen beziehen sich immer auf die Kontrolle. Sie sind in mN und in Prozent angegeben.

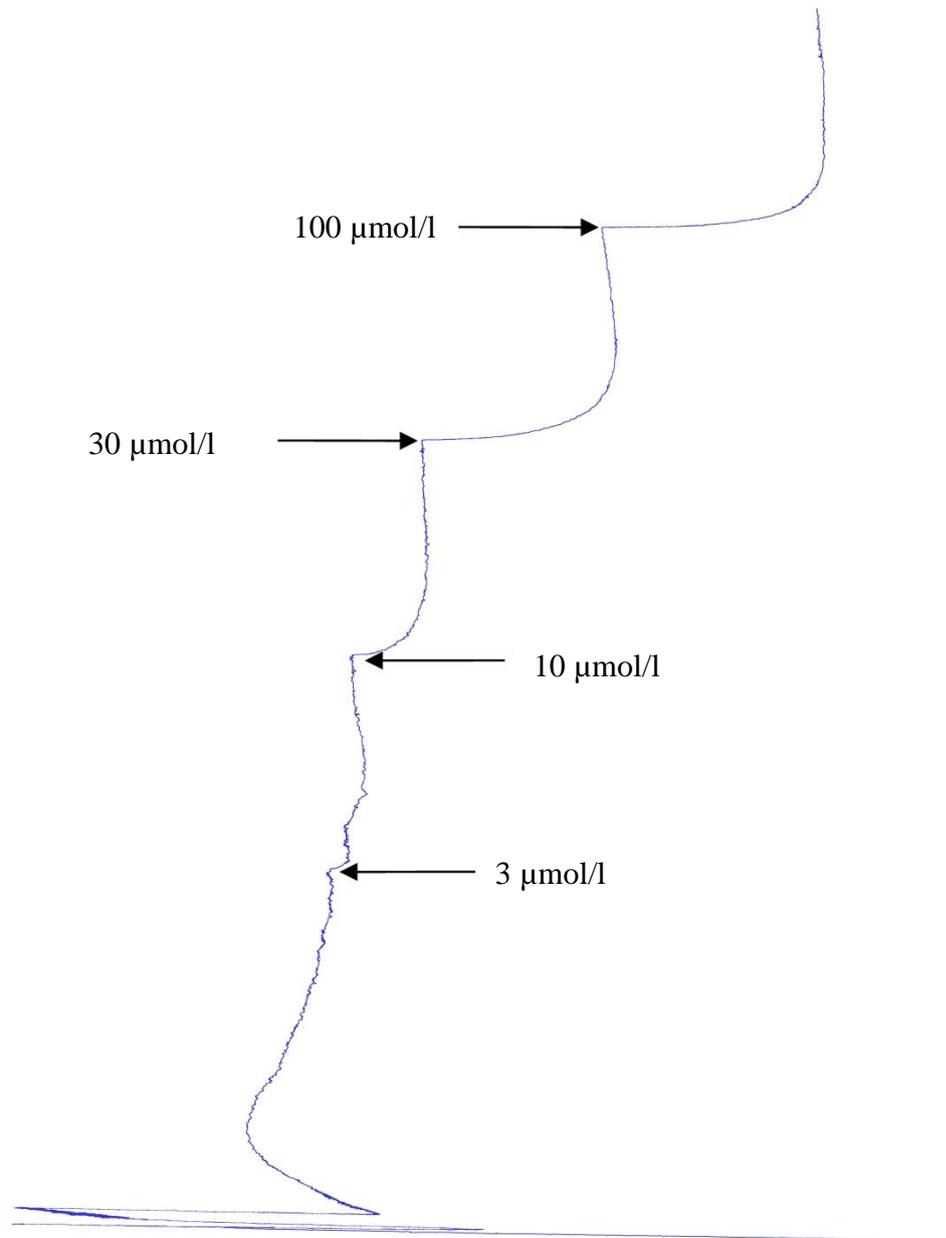
Diagramm 5: Konzentrations- Wirkungskurve von MAH8 HCl beim terminalen Ileum



Legende zu Diagramm 5:

In der graphischen Darstellung ist die Änderung der Kontraktionskraft auf das terminale Ileum nach kumulativer Zugabe der Testsubstanz ersichtlich. Auf der x-Achse ist die Konzentration in µmol/l dargestellt und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktion in Prozent angegeben.

Abbildung 25: Originalaufzeichnung der Wirkung von MAH8 HCl auf dem terminalen Ileum



Legende zu Abbildung 25:

Mit Hilfe der Originalaufzeichnung des Detektors konnte die Vasodilatation sichtbar dargestellt werden. Sehr gut zu sehen ist die starke Abnahme der Kontraktion bei der Substanzzugabe von 20 µl (30 µmol/l) und 70 µl (100 µmol/l). Die Pfeile zeigen die Position der Substanzzugabe in den jeweiligen Konzentrationen.

4.2. Untersuchung des Wirkmechanismus von MAH8 HCl auf den Darm

Um die Wirkung und den Effekt der Substanz auf den Darm besser nachvollziehen zu können, wurden bestimmte Versuche mit zwei verschiedenen Antagonisten durchgeführt. Zum Einsatz kamen Nitro-L-Arginin und Glibenclamid.

4.2.1. Wirkung von MAH8 HCl in Kombination mit Nitro-L-Arginin

Am Anfang wurde das Darmpräparat mit Kaliumchlorid Lösung versetzt, um ein Erreichen der maximalen Kontraktionskraft zu ermöglichen. Die Kontrollphase ergab $11,79 \pm 3,30$ mN. Zuerst wurden 100 μ l Nitro-L-Arginin zugesetzt und nach 45 Minuten erst die Substanz MAH8 HCl in einer Konzentration von 25 μ mol/l. Nach Gabe von Nitro-L-Arginin konnte man eine leichte Zunahme der Kontraktionskraft von $12,15 \pm 3,54$ mN wahrnehmen. Als die Zugabe der Substanzmenge erfolgte, konnte man sofort eine Abnahme der Kontraktionskraft des Organs beobachten, auf einen Wert von $9,89 \pm 3,45$ mN. In diesem Versuch sollte erläutert werden, ob die vasodilatierende Wirkung von MAH8 HCl über das NO-System erfolgte.

Tabelle 10: Wirkung von MAH8 HCl mit Nitro-L-Arginin auf die Kontraktionskraft des Darms

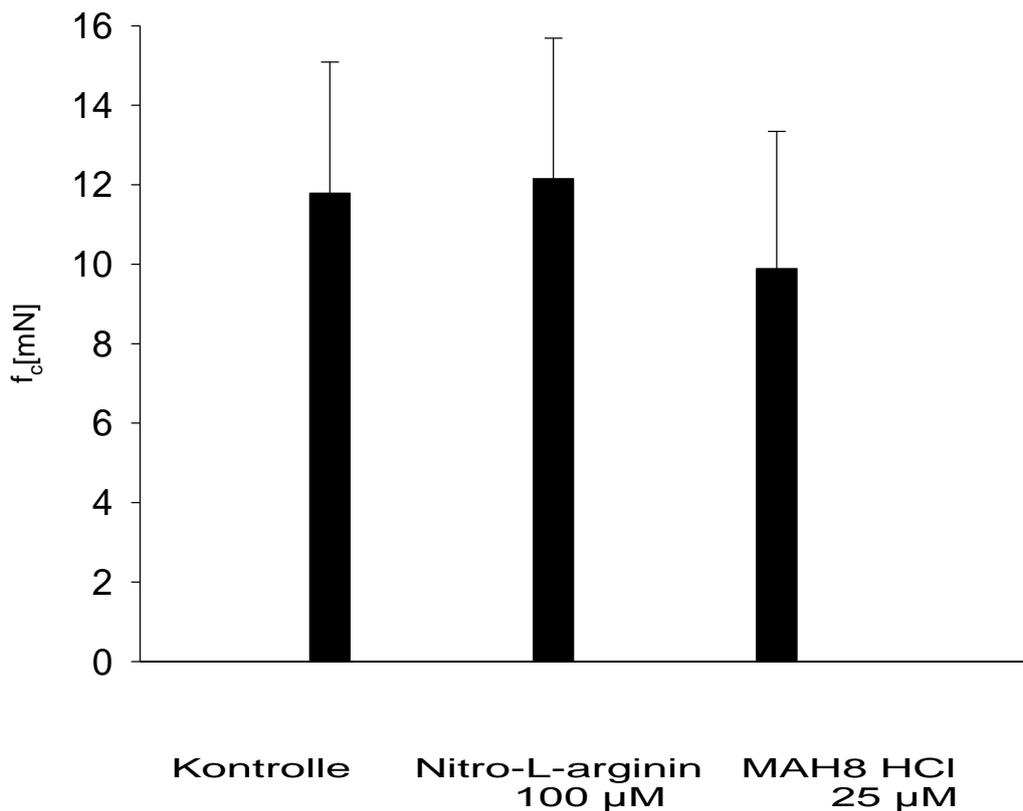
Konz. (μ mol/l)	$f_c \pm$ SEM (mN)	Anzahl der Versuche	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$11,79 \pm 3,30$	3	-
100 μ M Nitro-L-Arginin	$12,15 \pm 3,54$	3	-
+ 25 μ M MAH8 HCl	$9,89 \pm 3,45$	3	n.s.

Legende zu Tabelle 10:

In der Tabelle sind die arithmetische Mittelwerte und dessen Standardfehler von der Kontrolle, Nitro-L-Arginin und der Substanzzugabe MAH8 HCl zu sehen. Insgesamt wurden drei Versuche gemacht.

Diagramm 6: Graphische Darstellung der Wirkung von Nitro-L-Arginin auf die Kontraktionskraft des Darms und folgend in Kombination mit MAH8 HCl

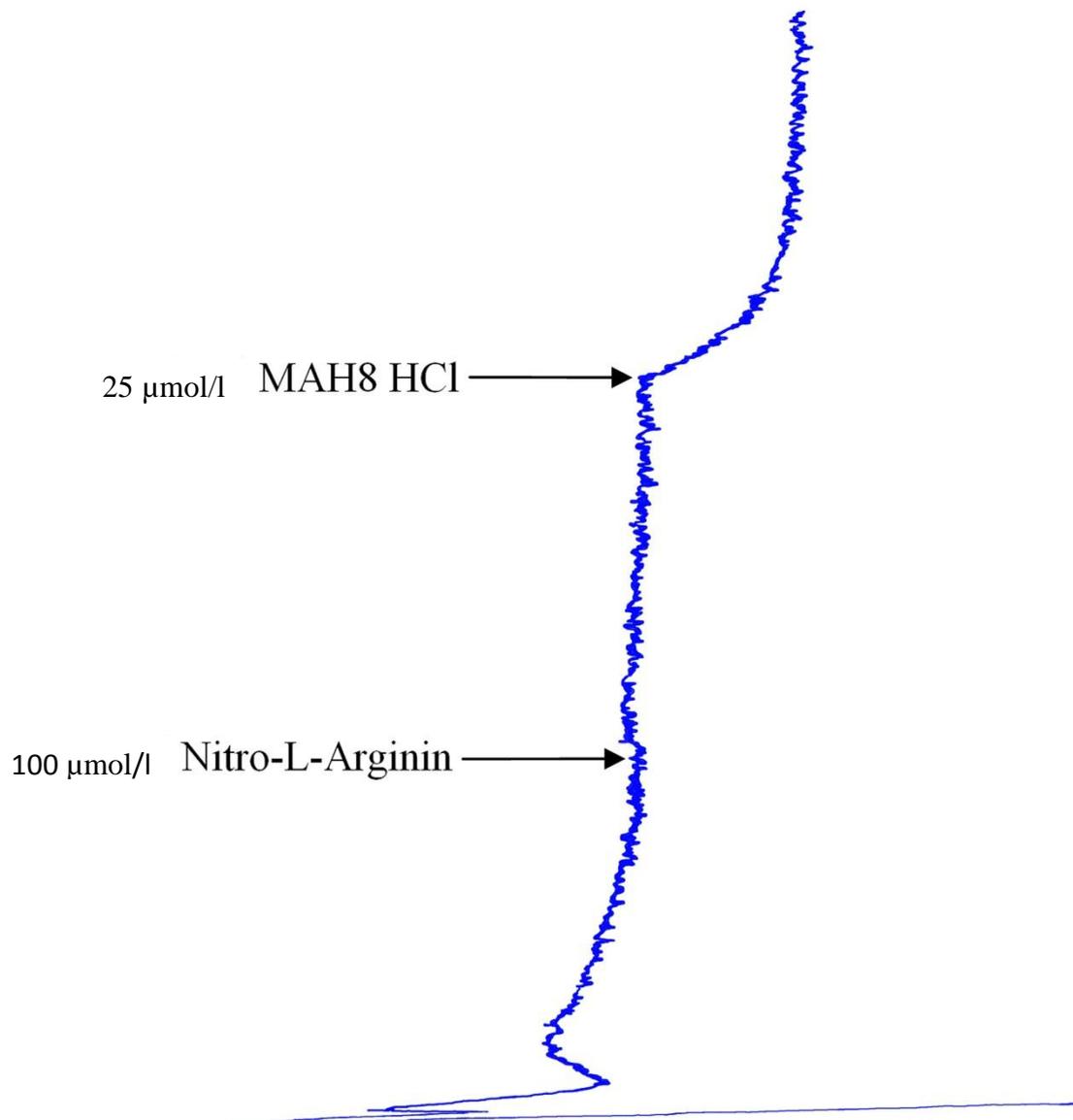
**Terminales Ileum, Nitro-L-arginin
MAH8 HCl, 25 $\mu\text{mol/l}$
n=3**



Legende zu Diagramm 6:

In dieser Graphik kann man die Kontraktionskraft in mN und die Konzentration der Testsubstanz MAH8 HCl in $\mu\text{mol/l}$ ablesen. Die Balken weisen auf die errechneten arithmetischen Mittelwerte aus drei Versuchen und deren Standardfehler als strichförmige Verlängerungen hin. Von links der erste Balken zeigt den Kontrollwert der maximalen Kontraktion, der zweite den Effekt der durch Zugabe von Nitro-L-Arginin erzielt wurde und der dritte die Reaktion des Darms nach Zugabe der Substanz.

Abbildung 26: Originalaufzeichnung der Wirkung auf den Darm mit Nitro-L-Arginin und der Testsubstanz zur Untersuchung des Wirkmechanismus



Legende zu Abbildung 26:

In dieser Graphik ist die kurze Zunahme der Kontraktion im Verlauf von Nitro-L-Arginin Einspritzung zu sehen. Gut ersichtlich ist die darauf folgende Abnahme der Kontraktion nach Zugabe der Testsubstanz. Die Pfeile zeigen auf den Zeitpunkt der Substanzzugabe.

4.2.2. Wirkung von MAH8 HCl in Kombination mit Glibenclamid

Bei dem Versuch mit Glibenclamid sollte nachgewiesen werden, ob die Wirkung der Testsubstanz MAH8 HCl durch eine Öffnung der ATP abhängiger Kaliumkanäle erfolgt. Zuerst wurden 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid eingespritzt und nach einen 45 Minuten Intervall wurden dann 25 $\mu\text{mol/l}$ der Substanz MAH8 HCl hinzugefügt und die Veränderung in Bezug auf die Kontraktilität des Organs mit dem Schreiber erfasst. Bei diesem Versuch konnte eine starke Abnahme der Kontraktionskraft auf einen Wert von $1,89 \pm 1,57$ mN nachgewiesen werden.

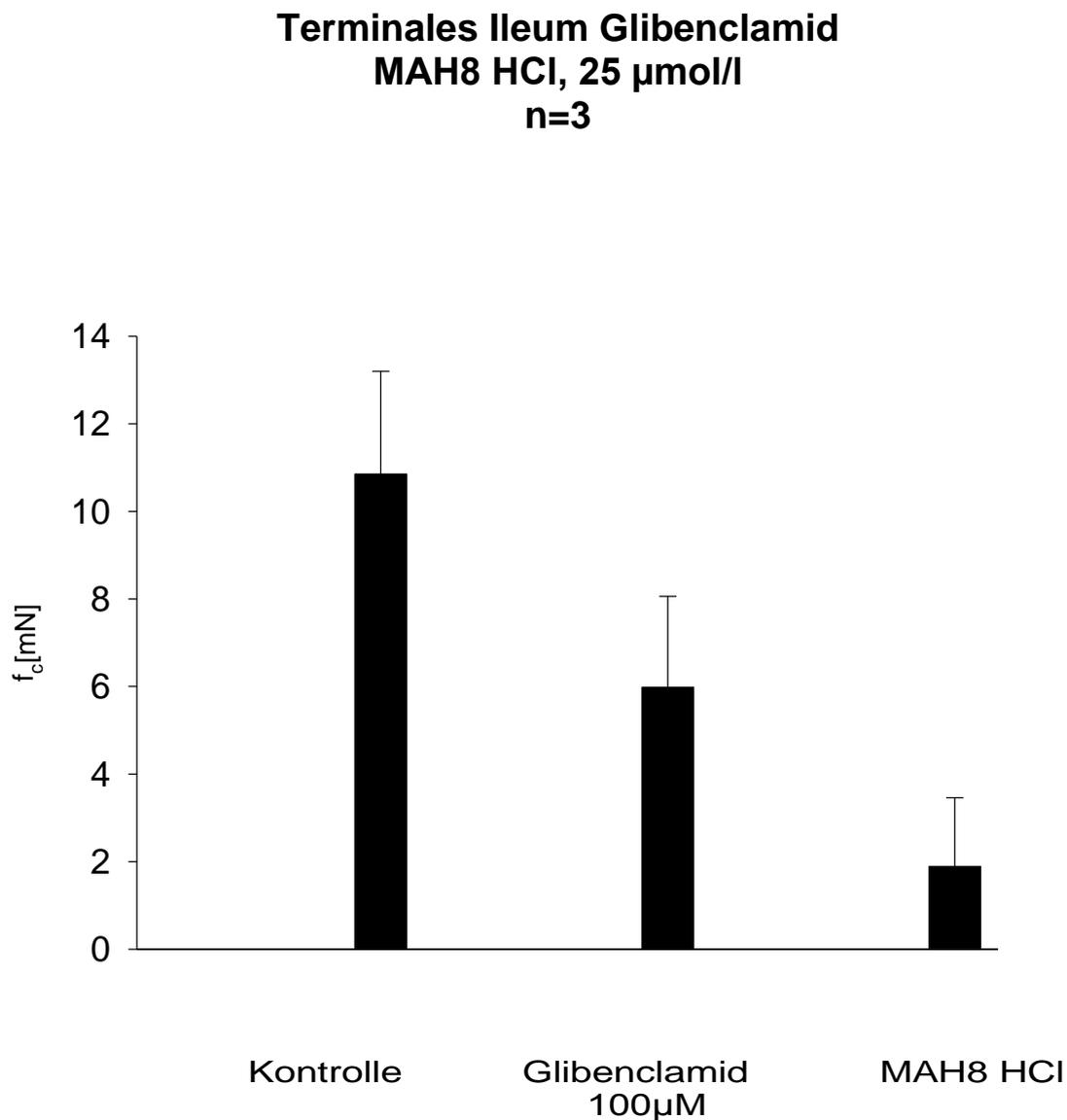
Tabelle 11: Wirkung von MAH8 HCl mit Glibenclamid auf die Kontraktionskraft des Darms

Konz. ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$10,85 \pm 2,35$	3	-
100 μM Glibenclamid	$5,98 \pm 2,08$	3	-
+ 25 μM MAH8 HCl	$1,89 \pm 1,57$	3	n.s.

Legende zu Tabelle 11:

Mit Hilfe dieser Tabelle kann man die errechneten arithmetischen Mittelwerte (f_c) und deren Standardfehler (SEM) ablesen.

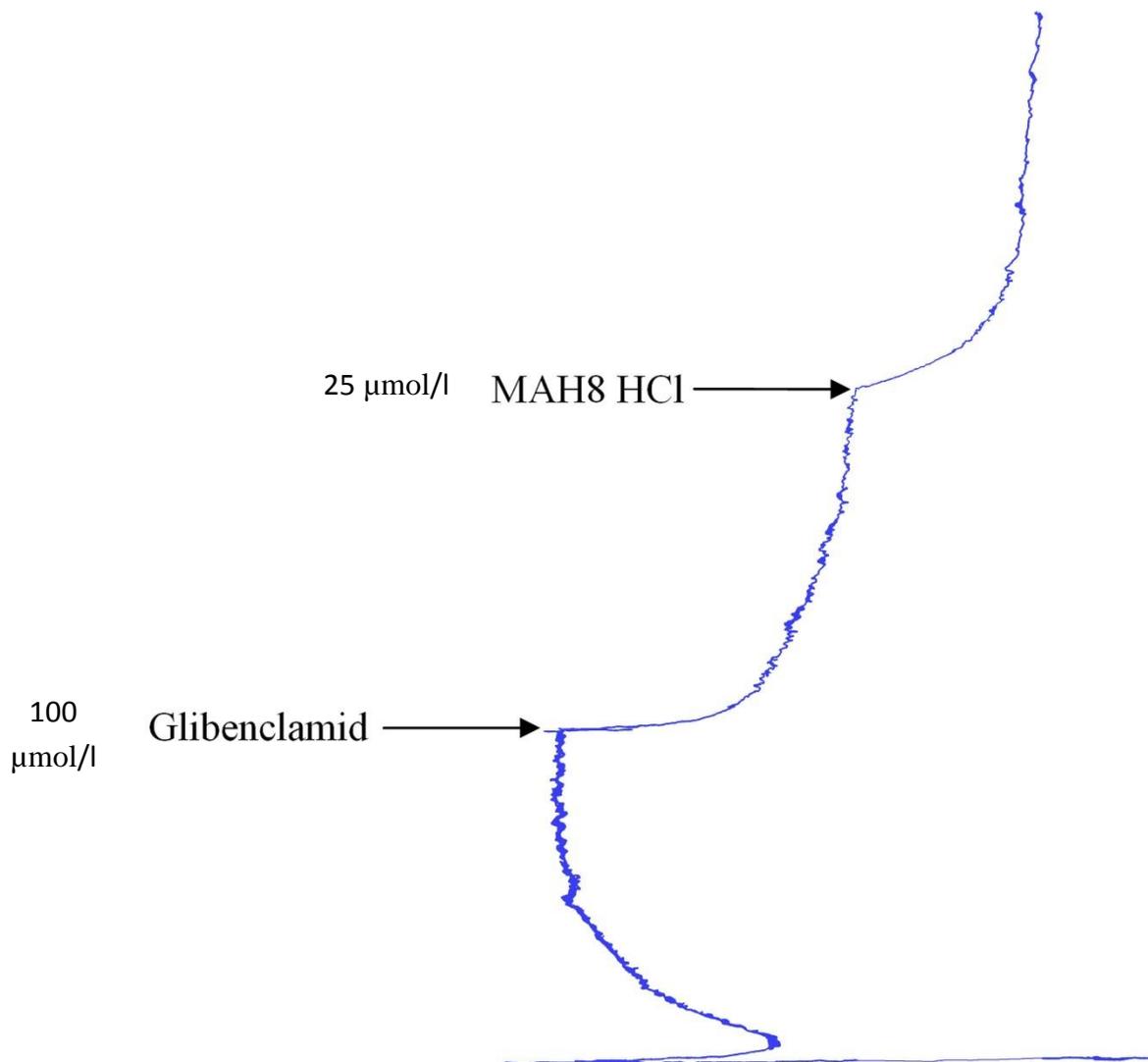
Diagramm 7: Graphische Darstellung der Wirkung von Glibenclamid auf die Kontraktionskraft des Darms und folgend in Kombination mit MAH8 HCl



Legende zu Diagramm 7:

Aus dem Diagramm kann man die Veränderung der Kontraktilität des Darms nach Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid sehen und außerdem wird die Auswirkung bei Zufügen der Testsubstanz MAH8 HCl auf die Darmpräparate dargestellt. Auf der x-Achse sind die Konzentrationen der einzelnen Substanzen in $\mu\text{mol/l}$ gegeben und auf der y-Achse die Kontraktionskraft in mN abgebildet. Die Balken mit strichförmiger Verlängerung zeigen die aus drei Versuchen ermittelten arithmetische Mittelwerte und deren Standardfehler.

Abbildung 27: Originalaufzeichnung der Wirkung auf den Darm mit Glibenclamid und der Testsubstanz zur Untersuchung des Wirkmechanismus



Legende zu Abbildung 27:

Darstellung einer Originalaufzeichnung des Wirkmechanismus mit 100 μmol/l Glibenclamid und 25 μmol/l Testsubstanz. Sowohl bei der Zugabe vom Antagonisten als auch bei der Testsubstanz kommt es zu einer starken Abnahme der Kontraktilität des Darmpräparates. Die angegebenen Pfeile symbolisieren den Zeitpunkt der Substanzzugabe.

5. Diskussion

Diese Diplomarbeit umfasst die Untersuchung einer neu synthetisierten Substanz MAH8 HCl und deren Wirkung an den verschiedenen Organen von Meerschweinchen. Im Kapitel 4 kann man die Ergebnisse herauslesen, welche hier zusammengefasst und näher bewertet werden.

Es wird eine Gegenüberstellung der Daten der glattmuskulären Organe und der Herzmuskelpräparate aufgestellt und die Wirkung der Testsubstanz MAH8 HCl auf diese bezugnehmend beurteilt.

Tabelle 12: Wirkung von MAH8 HCl auf die glatte Muskulatur

Organpräparat	MAH8 HCl Kontraktionskraft f_c (%) \pmSEM bei 100 μmol/l	EC₅₀ (μmol/l)
Aorta	-51,94 \pm 3,33	91,5
Arteria pulmonalis	-44,01 \pm 4,73	> 100
Terminales Ileum	-96,75 \pm 3,25	20,5

Die Tabelle zeigt gut die unterschiedliche Wirkung der Substanz auf die glatte Muskulatur der jeweiligen Organe. Beim terminalen Ileum kam es schon in der Konzentration von 30 μ mol/l zur Hälfte der Abnahme der Kontraktionskraft, wobei es bei 100 μ mol/l fast zur vollständigen Dilatation geführt hat. Mit Hilfe einer graphischen Darstellung einer Konzentrations-Wirkungskurve konnte der EC₅₀-Wert von 20,5 μ mol/l ermittelt werden. Somit hatte die Substanz eine gute vasodilatierende Wirkung auf das Darmpräparat. Die Ermittlung der Irrtumswahrscheinlichkeit zeigte Werte von $P < 0,05$, die als signifikant einzustufen sind.

Die Aorta weist bei einer Konzentration von 91,5 μ mol/l erst eine zur Hälfte gesenkte Kontraktionskraft auf. Die Irrtumswahrscheinlichkeit ergab signifikante Werte von < 5 %. Außerdem zeigt die Substanz eine geringe Wirkung auf die Arteria pulmonalis, bei der sogar kein EC₅₀-Wert erreicht werden konnte. In den ersten zwei Konzentrationen 3, 10 μ mol/l gab es nur eine geringe Dilatation, erst bei 30 μ mol/l konnte eine stärkere Abnahme von -16,69 \pm 2,03 % bezogen auf den Kontrollwert erzielt werden. Konzentrationen > 100 μ mol/l würden erst zu einem EC₅₀ Wert führen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit P ergab bei den ersten zwei Konzentrationen (3, 10 μ mol/l) nicht signifikante Werte.

Anhand der Ergebnisse war es weiteres von Bedeutung den genauen Wirkmechanismus der Substanz MAH8 HCl aufzuklären. Es standen uns zwei verschiedene Antagonisten zur Verfügung, wobei je drei Versuche am Darm durchgeführt wurden. Nitro-L-Arginin fungiert als ein Antagonist des NO-Systems, bei einer Zugabe von 100 µmol/l des Nitro-L-Arginins kam es zu einer leichten Kontraktionszunahme, diese wurde durch die Gabe von 25 µmol/l MAH8 HCl in eine eindeutige Abnahme der Kontraktionskraft von $12,15 \pm 3,54$ mN auf $9,89 \pm 3,45$ mN umgelenkt. Die vasodilatierende Wirkung könnte eventuell teilweise durch eine NO Freisetzung erfolgen.

Der zweite Versuch erfolgte mit Glibenclamid, indem 100 µmol/l des Antagonisten zugefügt wurden und danach 25 µmol/l der Testsubstanz MAH8 HCl. Es soll aufgeklärt werden, ob die Wirkung der Testsubstanz durch die Öffnung der ATP abhängiger Kaliumkanäle zustande kommt. Beim Versuch führte Glibenclamid zu einer deutlichen Dilatation des Darmpräparates ($5,98 \pm 2,08$) und die Zugabe der Testsubstanz erreichte eine weitere Abnahme der Kontraktionskraft ($1,89 \pm 1,57$ mN) bezogen auf den Kontrollwert von $10,85 \pm 2,35$ mN.

Dementsprechend kann gesagt werden, dass die Wirkung der Substanz MAH8 HCl allerdings nur gering auf eine Öffnung der Kaliumkanäle zurückzuführen ist. Es wurde gezeigt, dass die Testsubstanz wahrscheinlich noch einen weiteren nicht vollständig aufgeklärten Wirkmechanismus besitzt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit P ergab bei den Ergebnissen mit Antagonisten nicht signifikante Werte.

Abbildung 13: Wirkung von MAH8 HCl auf die Herzmuskulatur

Organpräparat	MAH8 HCl Kontraktionskraft f_c (%) ±SEM bei 100 µmol/l	EC₅₀ (µmol/l)
Rechter Vorhof	$-100,00 \pm 0,00$	43,50
Papillarmuskel	$-90,01 \pm 2,94$	5,45

In der Tabelle kann man die Ergebnisse der Untersuchungen an den Herzmuskelpräparaten näher betrachten, und man sieht sofort, dass die Wirkung der Substanz auf die glatte Muskulatur der Herzpräparate stark ist. Als Ergebnis der Untersuchung kam die negativ chronotrope und negativ inotrope Wirkung auf die Herzmuskelpräparate heraus. Besonders beim Papillarmuskel ist ersichtlich, dass schon bei niedriger Konzentration die Abnahme der Kontraktionskraft erfolgt.

Indem ein EC_{50} -Wert von $5,45 \mu\text{mol/l}$ erreicht wurde. Schon bei $30 \mu\text{mol/l}$ nahm die Kontraktionskraft von 0% Kontrollwert auf $-85,79 \pm 3,04 \%$ ab, mehr als die Hälfte des Papillarmuskels war vollständig erschlafft.

In Bezug auf die Vorhofpräparate nahm im Bereich der ersten vier Konzentrationen ($3, 10, 30 \mu\text{mol/l}$) die Schlagfrequenz immerzu ab. Der EC_{50} -Wert wurde im Gegensatz zum Papillarmuskel erst im Konzentrationsbereich von $43,5 \mu\text{mol/l}$ erreicht. Ausgehend vom Kontrollwert setzte die Schlagfrequenz des Vorhofes bei $100 \mu\text{mol/l}$ vollständig aus. Hier war eine negativ chronotrope Wirkung zu beobachten, wobei bei allen vier Versuchspräparaten bei $100 \mu\text{mol/l}$ die autonome Aktivität ausblieb. Der Mittelwert aller vier Versuche in dieser Konzentration betrug $-100,00 \pm 0,00 \%$ bezogen auf den Kontrollwert. Die Irrtumswahrscheinlichkeit zeigte sowohl beim Vorhof als auch beim Papillarmuskel statistisch signifikante Werte $< 5 \%$ auf.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Schwefelwasserstoff zur Vasodilatation führt, die von einer physiologisch relevanten Konzentrationsmenge abhängig ist. Mehrere Forschungsergebnisse zeigten, dass H_2S (genauso wie CO und NO) ein intrinsischer, vasoaktiver und gasförmiger Faktor ist. Ein Unterschied zu CO und NO ist der, dass die Vasodilatation von Schwefelwasserstoff einen minimalen Endothel abhängigen Effekt und einen großen Einfluss auf die glatte Muskulatur besitzt. Der Wirkmechanismus von CO und NO für die Relaxation ist die Aktivierung des cGMP-Wegs. Dagegen wirkt H_2S hauptsächlich durch die Öffnung von K_{ATP} Kanäle in vaskulären glatten Muskelzellen und zum Teil durch eine Kaliumleitfähigkeit in Endothelzellen (Zhao et al. 2001).

6. Zusammenfassung

In dieser Diplomarbeit wurde die biologische Aktivität der Testsubstanz MAH8 HCl an isolierten Organen von Meerschweinchen überprüft.

Die Versuche wurden an den Organen mit glatter Muskulatur (Aorta, Arteria pulmonalis und terminales Ileum) und an den Herzmuskelpräparaten (Atrium cordis dexter und Musculus papillaris) vollzogen. Mit Hilfe der Ergebnisse konnte die genaue Wirkstärke der Substanz und ein möglicher Wirkmechanismus ermittelt werden.

Die Testsubstanz MAH8 HCl hatte eine stark negativ chronotrope Wirkung auf den rechten Vorhof. Der EC_{50} Wert lag bei $43,5 \mu\text{mol/l}$, und das Vorhofpräparat verlor seine autonome Aktivität bei allen vier Versuchen in der Endkonzentration von $100 \mu\text{mol/l}$. Bereits in sehr niedriger Konzentration kam es beim Papillarmuskel zur Abnahme der Kontraktionskraft und der EC_{50} Wert wurde bereits bei $5,45 \mu\text{mol/l}$ erreicht.

Außerdem wies die Substanz eine vasodilatierende bzw. spasmolytische Wirkung auf alle drei glattmuskulären Präparate auf, wobei die kleinste Veränderung an der Arteria pulmonalis festzustellen war. Die zwei Organe (Aorta, Terminales Ileum) ergaben einen durchschnittlichen EC_{50} Wert von $56 \mu\text{mol/l}$. Wegen des starken Effekts auf den Darm durch die Testsubstanz, wurde außerdem noch eine Untersuchung bezüglich Wirkmechanismus mit zwei verschiedenen Antagonisten Nitro-L-Arginin und Glibenclamid durchgeführt. Es wurde nachgeprüft, ob die vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz durch das NO-System bzw. durch die Öffnung der ATP abhängiger Kaliumkanäle erfolgt.

Bei der Zersetzung der Testsubstanz MAH8 HCl wird möglicherweise Schwefelwasserstoff (H_2S) freigegeben. *In vitro* Studien wird veranschaulicht, dass H_2S eine relaxierende Auswirkung auf die glatten Muskelzellen hat. Aus den Versuchen mit den Antagonisten konnte geschlossen werden, dass die Wirkung zum Teil aufgrund dieser Mechanismen zustande kommt. Am Zustandekommen der Wirkung der untersuchten Substanz spielen wahrscheinlich noch andere Mechanismen eine Rolle.

7. Literaturverzeichnis

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

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

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

Forth W, Henschler d, Rummel W, Förstermann U, Starke K (2005, 9. Auflage) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer.

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.

Koenitzer JR, Isbell TS, Patel HD, Benavides GA, Dickson 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.

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

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

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

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

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.

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

Wang R, Wang ZZ, Wu L (1997a) Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. *Br J Pharmacol* 121: 927-934.

Wang R, Wu L, Wang ZZ (1997b) The direct effect of carbon monoxide on K_{Ca} channels in vascular smooth muscle cells. *Pflügers Arch* 434: 285-291.

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 Journal* Vol. 20 No. 21: PP 6008-6016.

8. Curriculum Vitae

Name: Avdic Milada

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 25. Mai 1983

Geburtsort: Bileca

Wohnort: Puchsbaumplatz 1/11, 1100 Wien

Staatsangehörigkeit: Bosnien und Herzegowina

Eltern: Avdic Suad und Avdic Sabina

Ausbildung:

1990-1992 Volksschule (in Bosnien und Herzegowina)

1992-1994 Öffentliche Volksschule, Kirchenplatz 2/3, 1230 Wien

1994-1998 Mittelschule mit ökologischem Schwerpunkt,
Anton Baumgartner-Straße 119, 1230 Wien

1998-2003 Bundeshandelsakademie und Bundeshandelsschule,
Pernerstorfergasse 77, 1100 Wien

Oktober 2003 Universität Wien, Beginn des Studiums Pharmazie

Berufliche Erfahrungen:

2003-2004 Tschibo/Eduscho, 1060 Wien

2005-2008 Aida Konditorei, 1010 Wien

2008-2009 Esprit Shop, 1200

2010-2012 DaVinci-Apotheke, 1100 Wien