



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Biologische Aktivität eines neu synthetisierten
Thiokohlensäurederivats (MAH4 HCl) an isolierten
Organen von Meerschweinchen

Verfasserin

Özlem Çetinkaya

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

Für meine Familie und Bernhard

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinen Eltern Firdes und Mehmet Çetinkaya, meinen Geschwistern Eylem, Eylen, Özden und Murat sowie meinem Verlobten Bernhard bedanken, die während des ganzen Studiums hinter mir gestanden sind.

Bei meinem Betreuer Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik bedanke ich mich von ganzem Herzen für die wertvollen Impulse und für die großartige, gleichsam menschliche wie kompetente Betreuung.

Weiters 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

Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch an meine FreundInnen Alma Seydinovic, Milada Avdic und Hamdi Canan für die tatkräftige Unterstützung richten. Mit ihnen war das Lernen in der AKH-Bibliothek viel unterhaltsamer. Sie waren immer in guten und schlechten Zeiten bei mir und sie werden immer in meinem Herzen einen großen Platz haben.

Anschließend danke ich meiner Schwiegerfamilie Mastal für die große Unterstützung beim Korrekturlesen der Diplomarbeit.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Das Herz | 1 |
| 1.2 | Hypertonie | 4 |
| 1.3 | Schwefelwasserstoff..... | 6 |
| 2 | Zielsetzung | 9 |
| 3 | Material und Methodik | 10 |
| 3.1 | Testsubstanz | 10 |
| 3.1.1 | MAH4 HCl | 10 |
| 3.1.2 | Lösungsmittel | 11 |
| 3.2 | Versuchstiere | 12 |
| 3.3 | Physiologische Elektrolytlösung | 12 |
| 3.4 | Verwendete Organe | 13 |
| 3.4.1 | Die Präparation..... | 14 |
| 3.4.1.1 | Verwendete Materialien | 14 |
| 3.4.1.2 | Rechter Vorhof | 14 |
| 3.4.1.3 | Die Lungenarterie..... | 15 |
| 3.4.1.4 | Papillarmuskel (Musculus papillaris) | 15 |
| 3.4.1.5 | Dünndarm (Ileum Terminalis)..... | 17 |
| 3.4.1.6 | Aorta (Aorta descendens)..... | 17 |
| 3.5 | Verwendete Apparaturen..... | 19 |
| 3.5.1 | Apparatur 1 | 19 |
| 3.5.2 | Apparatur 2..... | 21 |
| 3.5.3 | Kraftwandler..... | 23 |
| 3.5.4 | Versorgung mit Carbogen | 24 |
| 3.6 | Durchführung der Versuche | 25 |
| 3.6.1 | Wirkung der Substanzen auf die isolierten Meerschweinchenorgane | 25 |
| 3.6.1.1 | Atrium Dexter (Rechter Vorhof) | 25 |
| 3.6.1.2 | Musculus papillaris(Papillarmuskel) | 26 |
| 3.6.1.3 | Terminales Ileum (Dünndarm) | 27 |
| 3.6.1.4 | Aorta descendes..... | 27 |
| 3.6.1.5 | Arteria pulmonalis (Lungenarterie) | 28 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.6.2 | Untersuchungen des Wirkmechanismus von MAH 4HCL am Darm | 28 |
| 3.6.2.1 | Untersuchungen mit Glibenclamid und Nitro-L-Arginin | 28 |
| 3.7 | Auswertung der Daten und Statistik..... | 30 |
| 3.7.1 | Atrium dexter | 30 |
| 3.7.2 | Musculus papillaris..... | 30 |
| 3.7.3 | Aorta, Arteria pulmonalis, Terminalis Ileum | 30 |
| 3.7.4 | Statistik..... | 31 |
| 4 | <i>Ergebnisse</i> | 32 |
| 4.1 | Ergebnisse der Testsubstanz MAH 4HCl..... | 32 |
| 4.1.1 | Atrium cordis dexter..... | 32 |
| 4.1.2 | Musculus papillaris..... | 36 |
| 4.1.3 | Aorta descendens..... | 39 |
| 4.1.4 | Arteria pulmonalis | 42 |
| 4.1.5 | Terminales Ileum..... | 45 |
| 4.2 | Untersuchung des Wirkmechanismus der Testsubstanz MAH4 HCl auf den Darm..... | 48 |
| 4.2.1 | Wirkung von MAH4 HCl in Kombination mit NO-L-Arginin auf den Darm | 48 |
| 4.2.2 | Wirkung von MAH4 HCl in Kombination mit Glibenclamid auf den Darm | 51 |
| 5 | <i>Diskussion</i> | 54 |
| 6 | <i>Zusammenfassung</i> | 57 |
| 7 | <i>Literaturverzeichnis</i> | 58 |
| 8 | <i>Lebenslauf</i> | 61 |

1 Einleitung

1.1 Das Herz

Das Herz liegt im vorderen unteren Teil des Mittelfellraums. Das menschliche Herz ist in zwei Teile, das rechte und das linke Herz, gegliedert, die je aus einem kleineren Vorhof (Atrium) und einer größeren Kammer (Ventrikel) bestehen.

Die Vorhöfe sind durch eine Scheidewand (Septum atriorum) voneinander getrennt. In den linken Vorhof münden die Lungenvenen und in den rechten Vorhof die großen Hohlvenen. Die Abgrenzung der Kammern von den Vorhöfen ist von außen durch eine Furche zu erkennen.

Eine durch den Sulcus coronarius gesetzte Ebene bildet die Herzbasis. In dieser Ebene sind Herzklappen angeordnet, man benennt sie deshalb auch als Ventilebene. Die Ventrikel werden durch die Kammerscheidewand (Septum interventriculare) voneinander getrennt.

Das Herz ist von einer serösen Hülle, dem Perikard (Herzbeutel), umgeben. Der Herzbeutel besteht aus zwei durch einen Flüssigkeitsfilm getrennte und gegeneinander verschiebbare Blätter. Das die Herzoberfläche überziehende innere Blatt wird als Epikard bezeichnet.

Die Herzwand besteht aus drei Schichten. Innere Schicht ist das Endokard, in der Mitte befindet sich das Myokard und außen liegt das Epikard.

Die Herzklappen. Sie besitzen eine Ventilfunktion, verhindern bei der Kontraktion der Herzmuskulatur den Rückstrom des Blutes.

Die Atrioventrikularklappen oder Segelklappen befinden sich zwischen den Vorhöfen und Kammern. Die Klappe zwischen rechtem Vorhof und rechter Kammer nennt man Trikuspidalklappe. Die zwischen linkem Vorhof und linker Kammer wird Mitralklappe genannt. Um ein Umschlagen der Segelklappen in die Vorhöfe zu verhindern, sind die Klappen durch Sehnenfäden über die Papillarmuskeln mit dem Myokard verbunden. An den Ausströmungsöffnungen der Kammern befinden sich Taschenklappen. Die Klappe zwischen rechter Kammer und Truncus pulmonalis wird Pulmonalklappe und die Klappe zwischen linker Kammer und Aorta Aortenklappe genannt (Mutschler et al. 2001).

Das Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystem des Herzens. Das Herz gehört zu den rhythmisch arbeitenden Organen, die unter geeigneten Bedingungen auch außerhalb des Körpers ihre Arbeit durchführen können. Es ist durch sein Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystem dazu befähigt. Außerdem greifen Sympathikus und Parasympathikus regulierend in die Herztätigkeit ein, ohne sie ursprünglich auszulösen.

Normalerweise werden die Erregungen im Sinusknoten gebildet. Der Sinusknoten ist der Schrittmacher des Herzens und befindet sich an der Einmündungsstelle der oberen Hohlvene in den rechten Vorhof. Die Erregung wird zum AV-Knoten (Atrioventrikularknoten) übergeleitet. Der AV-Knoten liegt am Übergang vom Vorhof zur Kammer. Die weitere Erregungsübertragung erfolgt über das His-Bündel, die Kammerschenkel und die Verzweigungen des Erregungsleitungssystem (Purkinje-Fasern) in den Kammern.

Durch dieses System ist das Herz gegen einen Stillstand gesichert. Fällt der Sinusknoten als primärer Schrittmacher mit 60-80 Impulsen/Minute aus, dann erfolgt die Erregungsbildung mit geringerer Frequenz von ca. 50-60 Impulsen/Minute im sekundären Zentrum, dem AV-Knoten. Wenn die Erregungsleitung auch im Atrioventrikularknoten unterbrochen ist, wird die Erregungsbildung von tertiären Zentren mit einer sehr langsamen Frequenz von etwa 15-25 Impulsen/Minute (Kammarrhythmus) übernommen.

Ruhepotential. Die Myokardfasern weisen ein Ruhepotential zwischen dem Zellinneren (negativ) und dem Extrazellularraum (positiv) auf. Die Größe des Membranpotentials ergibt ca. -90 mV. Es stellt hauptsächlich ein Kaliumdiffusionspotential dar.

Aktionspotentiale und Refraktärzeit. Die Aktionspotentiale werden in den sog. Schrittmacherzellen gebildet, die zur spontanen Depolarisation befähigt sind.

In den Schrittmacherzellen folgt auf ein Aktionspotential sofort eine erneute spontane langsame Depolarisation aufgrund einer Abnahme der Kalium-Permeabilität. Wenn das Schwellenpotential erreicht ist, entsteht das nächste fortgeleitete Aktionspotential.

Die Depolarisation verläuft in den Schrittmacherzellen des Sinusknotens rascher als in anderen Zellen des Erregungsleitungssystems. Daher wird der Rhythmus der Herzaktion von diesen Zellen bestimmt (aktueller Schrittmacher). Bei Ausfällen des Sinusknotens werden andere Zellen des Systems den Rhythmus der Herzaktion bestimmen (potentielle Schrittmacher). Die spontane Depolarisation wird durch sympathische Impulse beschleunigt und durch parasympathische Impulse verlangsamt (Mutschler et al. 2001).

Fasern des Arbeitsmyokards sind nicht wie die Schrittmacherzellen zur spontanen Depolarisation befähigt. Bei ihnen kann ein Aktionspotential nur durch Depolarisation von einer benachbarten Stelle ausgelöst werden. Es kommt zu Depolarisation durch eine Erhöhung der Natrium-Permeabilität. Ein rascher Potentialanstieg erfolgt von etwa -90 mV zu +30 mV. An diese schnelle Aufstiegsphase schließt sich ein längerdauerndes Plateau an. Bei der Plateau-Phase wird die Membranleitfähigkeit für Calciumionen erhöht und für Kaliumionen erniedrigt. Dadurch ist der Effekt eines langsamen Calcium-Einstroms und eines Kalium-Ausstroms etwa gleich. Wenn die Calcium-Leitfähigkeit ab- und Kalium-Leitfähigkeit zunimmt, kommt es zu vollständiger Repolarisation.

Während der ganzen Aktionspotentialdauer ist die Herzmuskelfaser absolut refraktär, erst gegen Ende wird die Faser relativ refraktär. Refraktärzeiten schützen das Herz vor einer Dauerkontraktion durch schnell aufeinanderfolgende Reize bzw. Erregungen.

Elektromechanische Kopplung. Es wird durch den Erregungsprozess, der sich über das Herz ausbreitet, die Kontraktion der Herzmuskelfasern ausgelöst. Man bezeichnet die Aktivierung des kontraktile Apparates durch das Aktionspotential hier als elektromechanische Kopplung. Die Calciumionen nehmen hier eine Schlüsselstellung ein: Nachdem sie aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt werden, diffundieren sie zu den kontraktile Elementen und aktivieren die Prozesse, die zur Verkürzung der Fasern führen.

Im Gesamtprozess hat das Aktionspotential eigentlich eine doppelte Aufgabe. Es setzt Calciumionen frei (Triggereffekt) und bewirkt den Calciumionen-Einstrom für eine Auffüllung der Speicher (Mutschler et al.2001).

1.2 Hypertonie

Hypertonie ist jene die Norm überschreitende, anhaltende Steigerung des arteriellen Blutdrucks. Als optimaler Blutdruck wurden 120 mm Hg systolisch und 80 mm Hg diastolisch festgelegt.

Tabelle 1. Klassifizierung von Blutdruckbereichen (in mm Hg)

| Klassifikation | Systolisch (mm Hg) | Diastolisch (mm Hg) |
|--------------------------|--------------------|---------------------|
| Optimal | < 120 | < 80 |
| Normal | < 130 | < 85 |
| Hoch-Normal | 130 – 139 | 85 – 89 |
| Milde Hypertonie | 140 – 159 | 90 – 99 |
| Mittelschwere Hypertonie | 160 – 179 | 100 – 109 |
| Schwere Hypertonie | > 180 | > 140 |

Blutdruck ist die Resultante aus Herzzeitvolumen und peripherem Widerstand. Hypertonie kann durch ein erhöhtes Herzzeitvolumen, einen erhöhten peripheren Widerstand oder durch eine Erhöhung beider Parameter bedingt sein.

Hypertoniefolgen. Ein längerdauernder erhöhter Gefäßwiderstand führt durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren zu einer Intima- und Mediaverdickung und damit zu einer zusätzlichen Widerstandserhöhung. Hypertonie ist eine der wichtigsten Ursachen der Arteriosklerose, als deren Folge kann es am Gehirn zum apoplektischen Insult, am Herzen zur koronaren Herzkrankheit, Linksherzhypertonie sowie Herzinsuffizienz und an den Nieren zur Niereninsuffizienz kommen.

Hypertonieformen. Nach klinischen und organpathogenetischen Aspekten werden folgende Hypertonieformen unterschieden:

- Primäre Hypertonie: synonym essentielle, genuine Hypertonie.
- Sekundäre Hypertonie: als Folge pathologischer Organveränderungen.
 - renal: renal, renovaskulär
 - kardiovaskulär
 - endokrin
 - neurogen

Die Ursachen und die Entstehung der Hypertonieformen, der primären oder genuinen Hypertonie, sind noch weitgehend unbekannt. Eine Vielzahl von auslösenden Faktoren wird diskutiert, z.B familiäre Belastung, Bewegungsarmut, häufige Stresssituationen, Überernährung u.a.

Bei familiärer Belastung liegt ein genetischer Defekt zugrunde, der eine verminderte Ausscheidung von Natriumionen durch die Niere zur Folge hat. Um dem entgegenzuwirken, wird aus dem Hypothalamus das natriuretische Hormon freigesetzt. Das hemmt die renale Na^+/K^+ -ATPase und als Folge der Hemmung wird die Natriumionenausscheidung und die extrazelluläre Natriumionenbilanz normalisiert.

Das natriuretische Hormon wirkt auch an der glatten Gefäßmuskulatur, wo es ebenfalls die Na^+/K^+ -ATPase hemmt, die den Natrium-Auswärtstransport unterhält. Die Folge ist eine Erhöhung der Na^+ -Konzentration in den Muskelzellen, die zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration und damit zu einem erhöhten Gefäßtonus führt.

Auch der erhöhte Sympathikustonus und eine verminderte Bildung körpereigener vasodilatierender Substanzen (u.a. NO, Prostaglandin E, Bradykinin) sind für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der essentiellen Hypertonie bedeutsam. Bei Übergewichtigen ist Hypertonie öfter zu sehen als bei Normalgewichtigen.

Therapeutische Maßnahmen bei Hypertonie.

- Nicht-pharmakologische Maßnahmen zur Blutdrucksenkung:
 - Einstellen des Rauchens
 - Senkung des Alkoholkonsums auf < 30 g/Tag
 - Einschränkung der Kochsalzzufuhr
 - verstärkte körperliche Betätigung und Abbau von Stressfaktoren
 - Gewichtsreduktion bei Übergewichtigen
- Die medikamentöse Therapie eines Bluthochdrucks ist mit zahlreichen, sehr unterschiedlich wirkenden Substanzen möglich(Mutschler et al.2001)

Mittel der ersten Wahl sind derzeit:

- ACE- Hemmer
- Diuretika
- Calciumantagonisten
- β -Adrenozeptoren
- AT₁-Rezeptorblocker

Andere Antihypertensiva:

- Selektive α_1 -Rezeptorblocker
- Antisymphotonika,
- Dihydralazin, Hydralazin,
- Nitroprussidnatrium,
- Kaliumkanalöffner (Minoxidil)

1.3 Schwefelwasserstoff

Summenformel H₂S, Molekulargewicht ist 34,08 g/mol. Seit Jahrzehnten ist er als giftiges Gas gut bekannt (Winder und Winder 1983, Smith und Gosselin 1979).

Während Schwefelwasserstoff in niedrigeren Konzentrationen an seinem typischen Geruch leicht bemerkt werden kann, riecht er in höheren Konzentrationen süßlich. Da es dabei rasch zu einer Lähmung des Geruchsinns kommt, wird er nicht wahrgenommen (Mutschler et al. 2001).

Der genaue Wirkmechanismus einer Schwefelwasserstoffvergiftung ist noch nicht bekannt. In höheren Konzentrationen blockiert er die aus diesem im Organismus gebildete Hydrogensulfid-Ionen, die eisenhaltigen Atmungsenzyme. Dadurch ist anzunehmen, dass er eine Störung des Zellstoffwechsels mit konsekutiver Hypoxie bewirkt (Mutschler et al. 2001).

Bei der akuten Vergiftung durch das Schwefelwasserstoffgas kommt es zu einer zentralen Atemlähmung. Die Vergiftung verläuft langsam und es kommt zur Reizung der Augen und Atemwege, zu Übelkeit, Erbrechen, Krämpfen und Atemnot. Wenn der Vergiftete überlebt, kann es sein, dass Schäden des Myokards und des Zentralnervensystems zurückbleiben (Mutschler et al. 2001).

Die Behandlung ist von den Symptomen abhängig und erfolgt durch künstliche Beatmung. Neuerdings wird 4-DMAP (Diethylaminophenol) zur Bildung von Methämoglobin empfohlen, das eine höhere Affinität zu Hydrogensulfid-Ionen als die Cytochromoxidase besitzt (Mutschler et al. 2001).

Der Schwefelwasserstoff ist auch ein biologisches Gas, das im Körper endogen beim Cystein-Metabolismus entsteht. Diese Reaktion wird von der Cystathionin beta-Synthase (CBS) und/oder der Cystathionin gamma-Lyase (CSE) katalysiert (Stipanuk und Beck 1982, Hosoki et al. 1997).

In Studien an Mäusen, bei denen CSE genetisch ausgeschaltet wurde, verringerte sich Schwefelwasserstoffkonzentration in allen Organen und es kam zu erhöhtem Blutdruck sowie verringerter Gefäßrelaxation (Yang et al. 2008).

Diese Eigenschaft ist ähnlich wie bei anderen körpereigenen Transmittern wie Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenstoffmonoxid (CO) (Wang et al. 1997 a,b).

Deswegen kam man zur Überzeugung, dass Schwefelwasserstoff neben seiner Toxizität auch eine physiologische Rolle in der kardiovaskulären Regulation spielen könnte. Dadurch beschäftigen sich viele Studien damit.

Man fand weiters heraus, dass die relaxierende Wirkung von der auf H₂S isolierten Aorta von Ratten auf der Aktivierung von ATP-abhängigen K⁺-Kanälen zugrunde liegt (Zhao et al. 2001).

ATP-abhängige K⁺ - Kanäle sind Octamer, welche aus vier Untereinheiten des KIR6.1 oder KIR6.2 zusammen mit vier Sulfonylharnstoffrezeptoruntereinheiten (SUR) bestehen (Manna et al. 2009). ATP-abhängige K⁺ - Kanäle sind durch Adenosintriphosphat (ATP) gesteuert. Bei einem ATP-Anstieg kommt es zu einer Schließung der Kanäle (Mutschler et al. 2008).

Es wurde auch gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen Schwefelwasserstoff und dem intrazellulären pH an der vaskulären Regulation besteht (Lee et al. 2007).

Diese unterschiedlichen Studien zeigen, dass die ATP-abhängigen Kaliumkanäle nicht alleine für die physiologische Wirkung von Schwefelwasserstoff verantwortlich sind.

Noch eine sehr interessante Studie beschäftigte sich mit H₂S zur Behandlung einer künstlich biochemisch hervorgerufenen pulmonal arteriellen Hypertonie. Hier beobachtete man, dass

die negativen Effekte nach Applikation von NaHS teilweise wieder aufgehoben werden konnten (Huang et al. 2008).

H₂S ist wieder ein interessanter Therapieansatz zur Behandlung der Orphan Disease pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH).

PAH ist durch einen mittleren pulmonal arteriellen Blutdruck von ≥ 25 mm Hg oder ≥ 30 mm Hg unter Belastung gekennzeichnet (Mutschler et al. 2009).

Die auslösenden Faktoren sind nicht ganz bekannt. Bei einer PAH kommt es pathophysiologisch zu einer Proliferation von Endothel und glatter Muskulatur, ein so genanntes vaskuläres Remodeling, dadurch zu einem Überwiegen vasokonstriktorischer Faktoren und einer verstärkten Thrombogenität bei gleichzeitig verminderter fibrinolytischer Aktivität im pulmonalen Gefäßbett. Deswegen wird das Gefäßvolumen eingeschränkt, es kommt zu einer Erhöhung des Drucks im kleinen Kreislauf, der Erhöhung der Nachlast und schließlich zum Rechtsherzversagen (Mutschler et al. 2009).

Die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) ist ein schweres Krankheitsbild mit einer schlechten Prognose. Eine Heilung ist nur durch Transplantation möglich (Mutschler et al. 2009).

Therapeutisch eingesetzt bei PAH werden:

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

Bezüglich der Behandlung mit PDE5-Hemmern wurden interessante Versuche mit einem Schwefelwasserstoff spendenden Sildenafil-Derivat (ACS6) durchgeführt. Es zeigte eine Erniedrigung von cAMP Spiegel und der PDE5 Aktivität. Aber es wurde nur bezüglich der Therapie des Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) geprüft (Muzaffar et al. 2008).

Wegen seines Wirkmechanismus wären die schwefelwasserstofffreisetzenden Wirkstoffe zur Behandlung der Volkskrankheit der essentiellen Hypertonie geeignet.

2 Zielsetzung

Aufgabenstellung dieser Diplomarbeit war die Wirkung von einer am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie an der Universität Wien neu synthetisierten Substanz, MAH 4HCl, zu testen.

Für die Durchführung der Versuche wurden Meerschweinchen verwendet. Es wurden Inotropie und Chronotropie am Herzen und spasmolytische Wirkung auf die glatte Muskulatur untersucht.

Die Wirkung der Substanz wurde an Präparaten der Aorta, Lungenarterie und Darm sowie an Herzpräparaten, am rechten Vorhof und am Papillarmuskel, getestet. Dadurch konnte festgestellt werden, ob die Substanz an der glatten Muskulatur zu einer Gefäßdilatation führt und wie dies die Chronotropie bzw. Inotropie der Herzmuskulatur beeinflusst. Bei den Versuchen wurden verschiedene Konzentrationen der Testsubstanz verwendet. Für alle Präparate wurde die effektive Konzentration (EC_{50} -Wert) festgestellt.

Bei der Zersetzung des Wirkstoffes (MAH 4HCl) könnte Schwefelwasserstoff freigesetzt werden, der möglicherweise für die vasodilatierende Wirkung verantwortlich sein könnte. Um den Wirkmechanismus der Substanz zu klären wurden an den Darmpräparaten die Versuche durchgeführt. Dazu wurden die KATP-Kanal Blocker, Glibenclamid, und NO-Synthase-Hemmer, NO-L-Arginin als Antagonisten eingesetzt.

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erhalten, wurde immer nach vorgegebenen Arbeitsvorschriften gearbeitet.

3 *Material und Methodik*

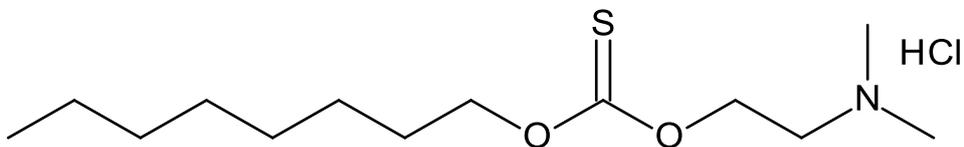
3.1 Testsubstanz

Die zu prüfende Substanz wurde an der Fakultät für Lebenswissenschaften am Department für Medizinische/pharmazeutische Chemie von der Arbeitsgruppe von Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker neu synthetisiert und zum Testen zur Verfügung gestellt.

3.1.1 MAH4 HCl

Abbildung 1: Chemische Struktur von MAH4 HCl

MG: 297,89 g/mol



Octyl [2-(dimethylamino)ethoxy]methanthioat-Hydrochlorid

3.1.2 Lösungsmittel

Um die Versuche durchzuführen, musste die Substanz vorher vollständig im geeigneten Lösungsmittel gelöst werden. MAH4 HCl war sehr schnell und vollständig im dest. Aqua löslich. Die Einwaage wurde immer so gewählt, dass man in den Organbädern nach vollständiger, kumulativer Zugabe eine Konzentration von 100 µmol/l im Gefäß erreichte. Die vorhandenen Organbäder waren mit 8 ml und 25 ml Fassungsvermögen.

Berechnung:

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

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

Die Tabelle 2 zeigt die berechneten und verwendeten Stammlösungen:

Tabelle 2: Stammlösungen

| Substanz | Molare Masse | Volumen Organbad in ml | Einwaage der Testsubstanz (100µmol/l) / Organbad |
|----------|--------------|------------------------|--|
| MAH4 HCl | 297,89 | 8 | 0,24 |
| | g/mol | 25 | 0,74 |

Die Stammlösungen wurden mit Hilfe einer Finnmikropipette je fünfundvierzig Minuten zugefügt und die Wirkung wurde gemessen. Die zugefügten Konzentrationen sind unten in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: 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

Die Versuche wurden an den inneren Organen von Meerschweinchen durchgeführt. Diese wurden genommen, weil die Charakteristik der Ionenkanäle dieser Säugetiere am meisten denen des Menschen ähnelt. Man musste natürlich auch die Größe der Versuchsaapparaturen und die Größe der zu untersuchenden Organe berücksichtigen.

Es wurden Meerschweinchen vom TRIK-Stamm verwendet, um die Versuche durchzuführen. Die Versuchstiere waren beiderlei Geschlechts, waren vier bis acht Wochen alt und ihr Gewicht war zwischen 300 und 800 g.

Die Meerschweinchen wurden am Beginn jedes Versuchstages mit einem Genickschlag getötet, das ist die schnellste und schmerzärmste Methode.

Danach wurden Thorax und Abdomen mit einer OP-Schere geöffnet, zuerst wurde das Herz mit der Lunge entnommen, dann das ungefähr zwanzig cm lange Ileum und am Ende wurde die Aorta entfernt. Die Organe wurden gleich nach Entnahme in eine begaste Nährlösung gelegt und bis zur Präparation dort aufbewahrt.

3.3 Physiologische Elektrolytlösung

Nährstofflösung, gebräuchlich Tyrode, in der man die isolierten Organe bis zur Präparation aufbewahrte und die auch während der Versuche und Präparation zur optimalen Versorgung der Organe diente.

Herstellung nach Reiter (1967) und entsprach einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Tyrode

| 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 | |

Zu Beginn jeder Versuchstage wurden 2 Liter Tyrode frisch vorbereitet. Die Stammlösungen NaCl, KCl, NaHCO₃, MgSO₄, KH₂PO₄, wurde in einem 2 Liter fassenden Messkolben mit 1,5 Liter Aqua dest. gemischt. Danach wurde Glucose dazugegeben, nachdem es sich vollständig gelöst hatte, wurde die Lösung zwanzig Minuten begast. Zum Begasen wurde Carbogen, auch Oxymix genannt, verwendet. Begasen ist wichtig für optimale Versorgung der Organe während der Versuche und Präparation. Die Zeit des Begasens ist wichtig. Man braucht zwanzig Minuten um die optimale Gassättigung zu erreichen. Während dieser Zeit nach ungefähr zehn Minuten wurde tropfenweise CaCl₂ zugegeben. Das musste sehr vorsichtig und langsam tropfenweise sein um eine schwerlösliche Calciumsalzbildung zu verhindern, die eine Trübung der Lösung zufolge hätte. Zum Schluss wurde der Messkolbe bis zur Eichmarke mit dest. Aqua aufgefüllt.

3.4 Verwendete Organe

Wie oben geschrieben: Um die Substanz testen zu können, wurde zu Beginn des Versuchstages ein Meerschweinchen getötet und die Organe Herz, Ileum und Aorta wurden isoliert.

3.4.1 Die Präparation

3.4.1.1 Verwendete Materialien

Um genau zu arbeiten, wurde ein Großteil der Arbeit unter einem Auflichtmikroskop durchgeführt. Zum Präparieren wurde eine Petrischale verwendet, davor wurde darin Kork ausgelegt und mit einem Schlauch fixiert, danach wurde mit Tyrode gefüllt. Um die Objekte in der Petrischale zu fixieren, wurden Präpariernadeln verwendet. Zusätzlich kamen noch Pinzetten, Federgriffscheren und Pipetten zur Anwendung.

Abbildung 2: Präparationswerkzeuge mit einem Auflichtmikroskop



3.4.1.2 Rechter Vorhof

Im ersten Schritt wurde das Herz von seinem umgebenden Gewebe, Fett und Lunge vorsichtig isoliert. Dann wurde das Organ mit zwei Präpariernadeln an zwei Enden fixiert und der Vorhof isoliert. Bei diesem Vorgang musste man sehr vorsichtig arbeiten, um das Organ nicht zu verletzen oder zu überdehnen, da es sonst zum Erlöschen des autonomen Schlages des Vorhofes kommen könnte.

Nachdem man den Vorhof isoliert hatte, wurde er sofort zum Messen weiter präpariert. Er wurde an beiden Enden am Kork fixiert. An jedem der beiden Enden wurde mit einem Faden ein Silberhäkchen eingefädelt und mit einem zweiten Knoten gesichert. Bei der Messung war wichtig, dass man anatomisch gesehen das „obere“ und „untere“ Ende unterscheidet. Dann wurde der fertig präparierte Vorhof in ein Becherglas mit begaster Tyrode gelegt.

3.4.1.3 Die Lungenarterie

Turuncus pulmonalis, auf Deutsch Lungenstamm, wurde hier verwendet. Das ist der Teil, der aus der rechten Herzkammer entspringt. Zuerst wurde ein ca. 1 cm langer Lungenstamm herausgeschnitten und mit Hilfe zweier Präpariernadeln auf der Korkunterlage in der Petrischale befestigt. Das umgebende Fettgewebe wurde vorsichtig entfernt. Danach wurde er in ca. 2-3 mm lange Ringstücke, um 2-3 Stücke zu erhalten. Die fertigen Präparate wurden in ein Becherglas mit Tyrode überführt. Zum Messen wurde kein Silberhäkchen verwendet. Die ringförmigen Stücke wurden direkt am Messgerät eingespannt.

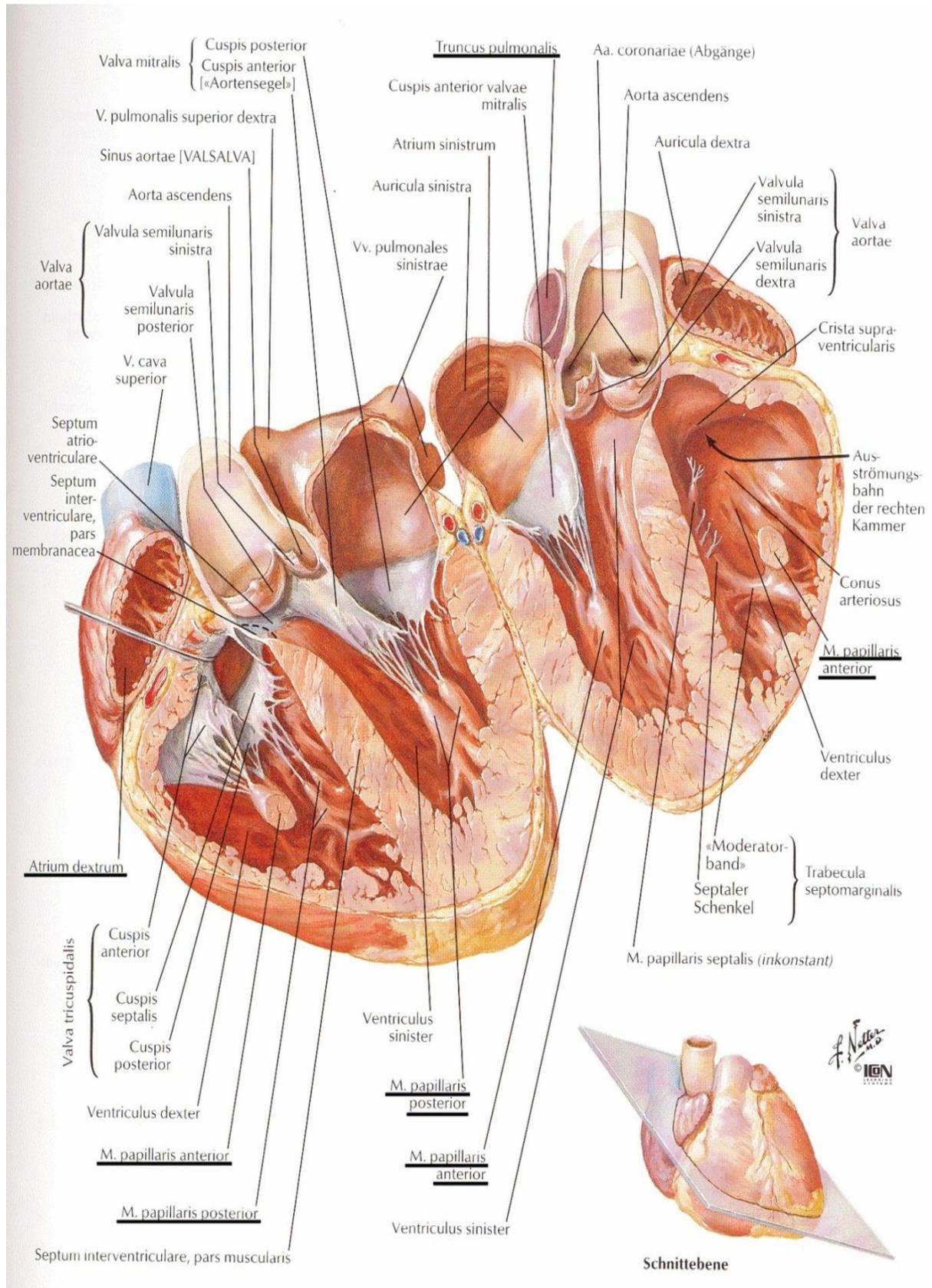
Abbildung 3: Lungenarterie-Präparate



3.4.1.4 Papillarmuskel (*Musculus papillaris*)

Nachdem der Vorhof und Truncus pulmonalis aus dem Herz entfernt waren, wurden die Papillarmuskeln aus beiden Herzkammern isoliert. Das Herz wurde entlang der Septum geöffnet und aufgeklappt. Es wurde an der Korkunterlage in der Petrischale mit Präpariernadeln befestigt. Mit Hilfe von einem Bindfaden wurde ein Silberhäkchen eingefädelt und die Papillarmuskeln aus der Herzwand herausgeschnitten. Hier wurde immer mit einem Auflichtmikroskop gearbeitet um klare Sicht zu erhalten. Man musste darauf achten, dass man Pukinje-Fasern nicht gemeinsam mit dem Präparat isolierte. Diese könnten eine Spontanaktivität aufweisen und die Messung stören. Die Aufbewahrung der Präparate ist gewöhnlich in begaster Tyrode.

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



3.4.1.5 Dünndarm (Ileum Terminalis)

Nach Entnahme des Herzens wurde ein Stück des Darmes, des Terminalis Ileum, isoliert. Der Bauchbereich wurde geöffnet, so dass man mit den Fingern den nötigen Teil des Darmes erreichte und herausschnitt. Auf der Seite des jejunalen Teiles wurde er mit einem Bindefaden gebunden. Gleich wurde er in ein Becherglas mit Tyrode zum Begasen weitergegeben.

Vor der Messung musste er noch präpariert werden. Es wurde ein 1 cm langes Stück herausgeschnitten. Man musste achten, dass beide Enden schräg abgeschnitten sind. Er wurde in der Petrischale mit Präpariernadeln am Kork befestigt. Mit Hilfe eines Bindefadens wurden Silberhäkchen an jedes Ende angehängt. Hier musste man achten, dass das Darmstück nicht zu gedehnt ist, da sonst die Peristaltik des Darmes nicht mehr intakt bleibt. Bei der Bindung mit Faden musste man so vorgehen, dass man die Öffnungen nicht zu band. Es ist wichtig die Darmröhre mithilfe einer Pipette von vorhandenem, restlichen Chymus zu befreien, und bei der Durchführung des Versuches ein optimales Zirkulieren der Substanzlösung zu ermöglichen.

Abbildung 5 : Originalabbildung eines Darmpräparates



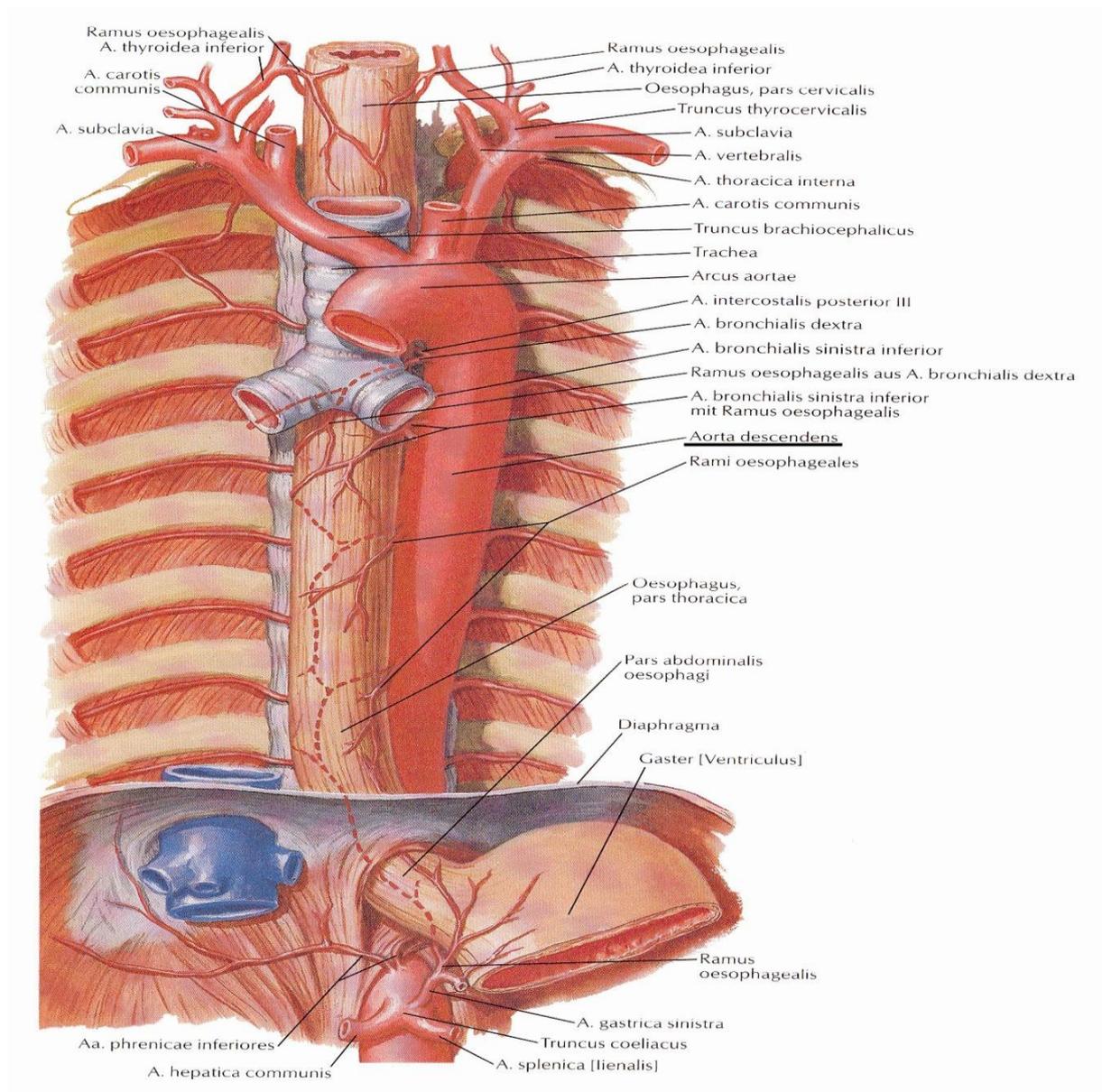
3.4.1.6 Aorta (Aorta descendens)

Am Ende der Präparation wurde die Aorta isoliert. Dafür wurde der Brustkorb ausgedehnt und die Wirbelsäule nach hinten gebogen. So konnte man die Aorta ohne Probleme mit Hilfe einer OP-Schere und einer Pinzette herausschneiden. Man hielt die Aorta am oberen Ende mit Hilfe einer Pinzette fest und schnitt dann vorsichtig am Rückgrat entlang bis man ein ca.

3 cm langes Stück gewonnen hatte. Die Isolierung musste sehr vorsichtig erfolgen, da es zu einer Verletzung und Überdehnung der Aorta kommen könnte.

Anschließend wurde die Aorta wie alle anderen Präparate in eine Petrischale mit Tyrode gelegt und an der Korkunterlage mit zwei Präpariernadeln fixiert. Da musste man achten, dass sie nicht überdehnt wird. Das umgebende Gewebe, Fett und Blut wurden vorsichtig entfernt und man schnitt sie in ungefähr 2 mm lange Stücke. Schadhafte und unregelmäßige Teile wurden entsorgt.

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Aorta (Netter FH 2003)



3.5 Verwendete Apparaturen

Bei den Versuchen wurden zwei verschiedene Apparaturen verwendet.

Bei Apparatur 1 wurden Versuche für die Papillarmuskeln und bei Apparatur 2 Aorta-, Vorhof-, und Darmversuche durchgeführt. Die Organe wurden über einem Silberdraht an Kraftwandler gehängt. Der Kraftwandler wandelte die mechanische Kraft zu einem elektrischen Signal um und leitete es weiter zu einem Amplifier, der das elektrische Signal verstärkte und mit Hilfe eines Schreibers auf ein Millimeterpapier zeichnete.

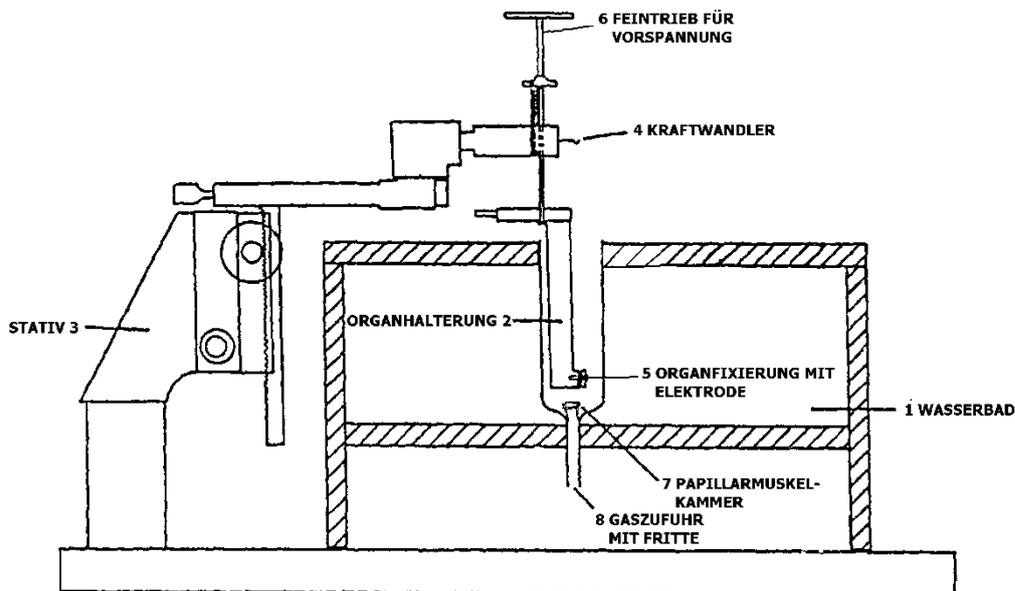
Um die Versuche vergleichen zu können, musste man immer bei gleichen Bedingungen bezüglich Sauerstoffversorgung, Temperatur, pH-Wert, Herstellung und Zusammensetzung der Tyrode arbeiten.

3.5.1 Apparatur 1

Apparatur 1 wurde nur für die Versuche der Papillarmuskeln verwendet.

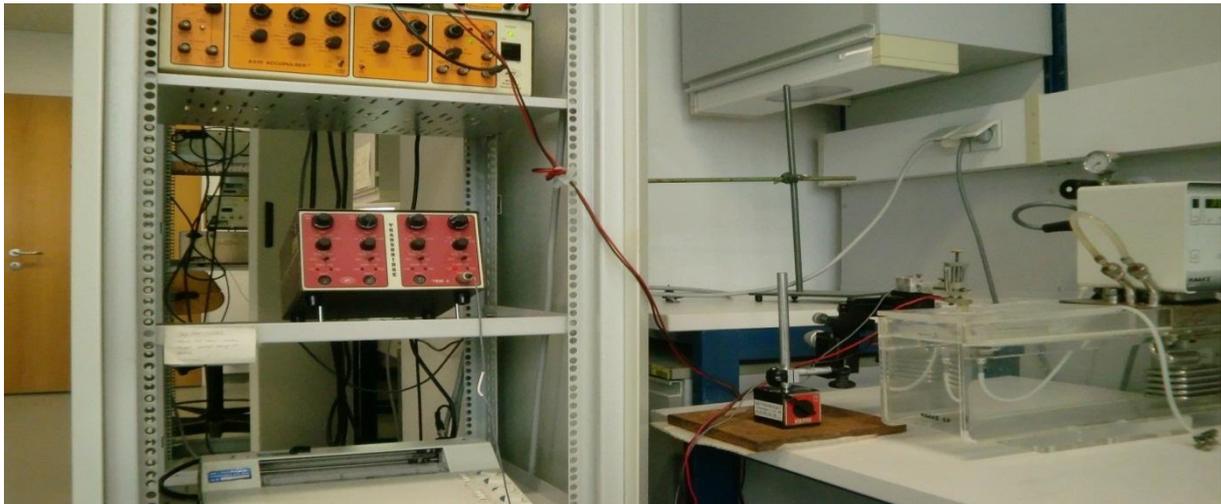
Aufbau: Die Apparatur enthält eine Wasserbadwanne, die aus Acrylglas besteht. In dieses Wasserbad ragt eine Muskelkammer. Weiters gibt es ein Stativ, an dem der Kraftwandler, Feintrieb und Organhalterung befestigt sind. Zur besseren Vorstellung siehe Abbildung 6.

Abbildung 7: Skizze der Apparatur 1



Die Muskelkammer enthält 25 ml, demnach wurde dasselbe Volumen für die Tyrode verwendet. Das Wasserbad wurde thermostatisch konstant auf 35 °C geregelt. Damit wurden physiologische Bedingungen geschaffen. Die Nährlösung musste man auf diesen Wert anpassen, deswegen wurde die Tyrode 10 Minuten vor dem Versuch in die Kammer eingebracht. Die Präparation wurde vorher in Kapitel 3.4.1.4 beschrieben. Das Muskelpräparat wurde mit dem Silberhäkchen über einen Silberdraht mit dem Kraftwandler in Kontakt hingesezt , den Papillarmuskel klemmte man zwischen Elektrode und einer Plexiglasscheibe ein. Dann wurde die Halterung in die Muskelkammer abgesenkt, sodass das Präparat komplett in der Tyrode stand. Die Papillarmuskeln schlagen nicht wie der Vorhof spontan, sondern sie müssen gereizt werden. Dies wurde mit einem Accupulser Stimulator (Model Isostim 301T. WPI, Hamden, CT, USA) geschafft. Die Kontraktion wurde über den Silberchloriddraht auf der Kraftwandler übertragen, bei dem Amplifier verstärkt und an den Flachbettstreiber übertragen.

Abbildung 8: Originalabbildung von Apparatur 1



3.5.2 Apparatur 2

Für die Versuche der Aorta, der Arteria pulmonalis, des terminalen Ileum und des rechten Atrium wurde Apparatur 2 (siehe Abbildung 8) verwendet.

Das Wasserbad wurde auf 37°C gebracht. Bei der Aorta und der Arteria pulmonalis wurden direkt ringförmige Präparate über einen Silberdraht an den Kraftwandler befestigt. Bei Darm und Vorhof wurden vorher zwei Silberhäkchen an zwei Enden befestigt und diese wurden auch mit dem Kraftwandler verbunden. Bei Apparatur 2 wurden die Versuchsobjekte in die Organbäder, die mit der Tyrode gefüllt sind, abgesenkt. Die Organbäder wurden auch auf die Temperatur 37°C eingestellt und begast. Über Feintrieb wurde eine Vorspannung angelegt, dann eine Kontraktion erzwungen und diese Kontraktionen bzw. Veränderungen an diesen in Stromsignale umgewandelt und aufgezeichnet.

Abbildung 9: Skizze Apparatur 2

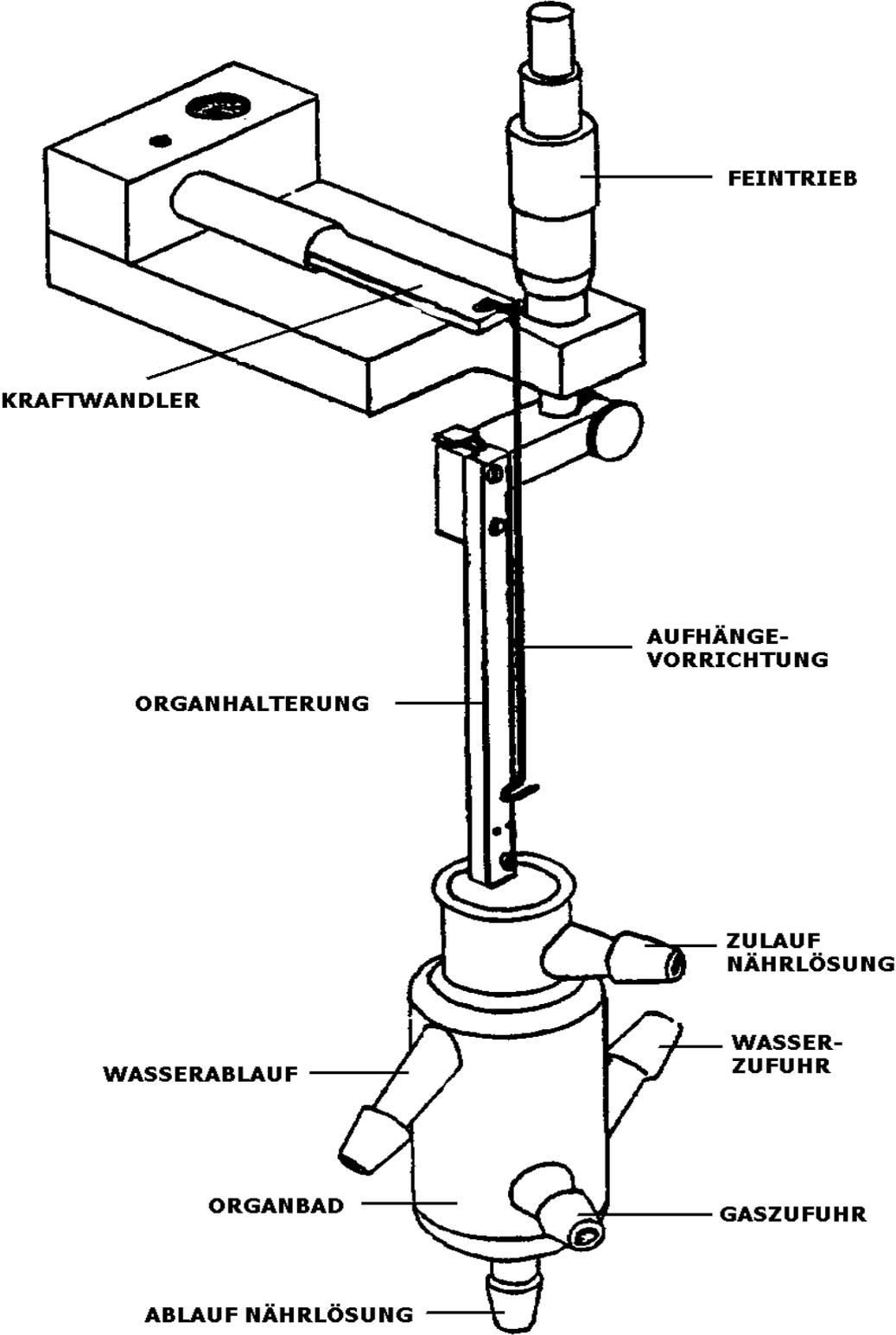
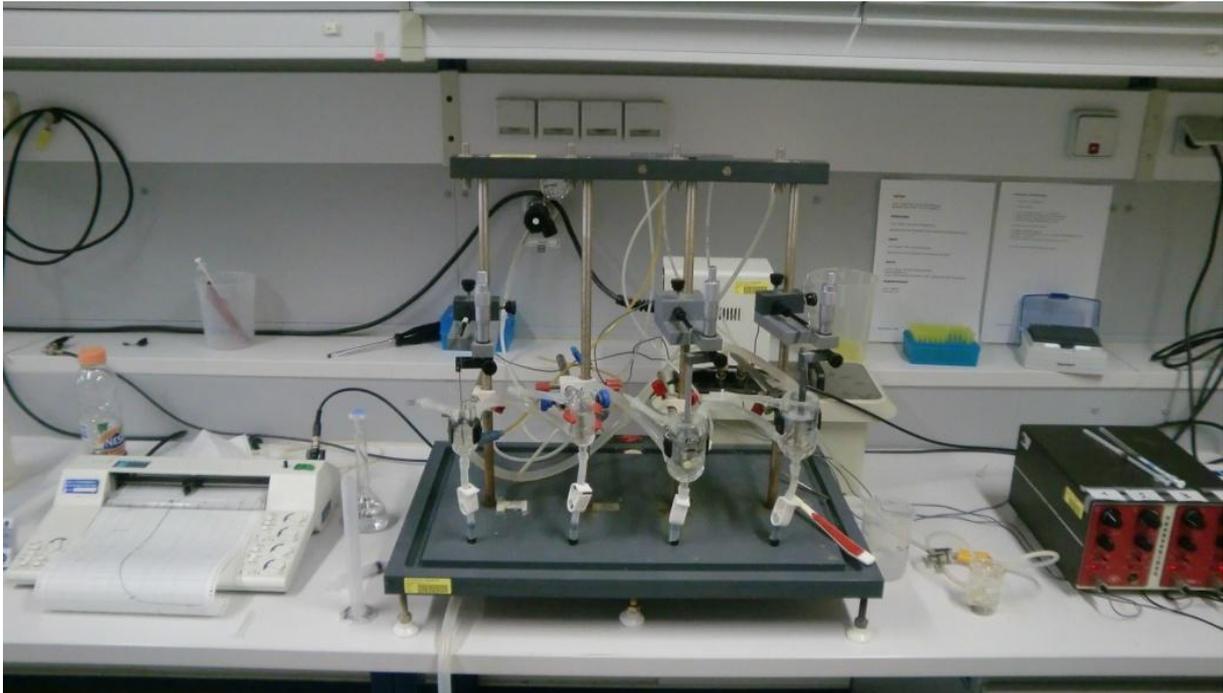


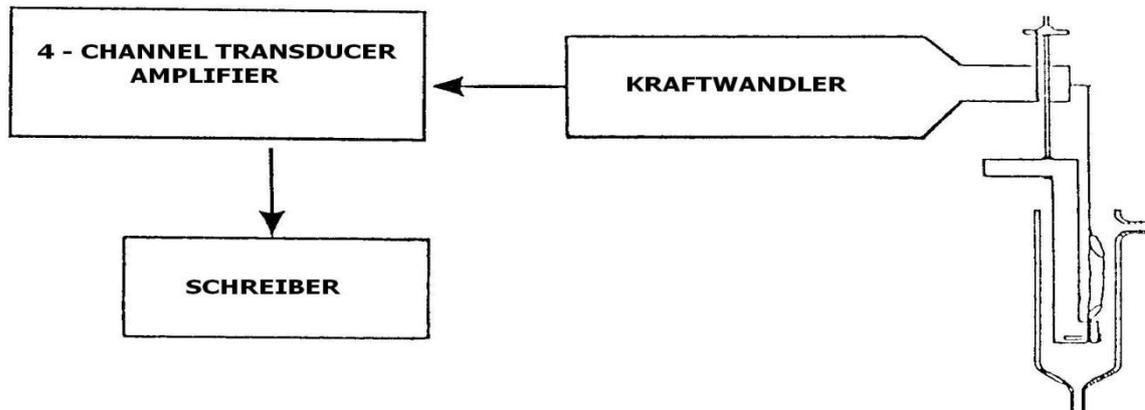
Abbildung 10:Originalabbildung der Apparatur 2



3.5.3 Kraftwandler

Mit Hilfe des Kraftwandlers werden mechanische Veränderungen über eine sogenannte „Wheatstonsche Brücke“ in elektrische überführt, was eine Messung möglich macht. Im Kraftwandler befinden sich Dehnungstreifen. Wenn es bei der Kontraktionskraft der Organe zu Änderungen kam, wurden der Dehnungswiderstand und der Stromfluss auch proportional geändert. So können die Kontraktions,- und Relaxationsveränderungen der Muskeln über einen Verstärker (Transbridge TM, 4-Channel Transducer Amplifier, von der Firma World Precision Instruments (WPI), Sarasota, FL, USA) zu einem Flachbettschreiber (Flatbed Recorder Modell BD 112, Firma Kipp & Zonen) geleitet werden. Dieser überträgt die Impulse auf Millimeterpapier.

Abbildung 11: Skizze des Kraftwandlers



3.5.4 Versorgung mit Carbogen

Bei allen Versuchen war eine ständige Versorgung der Organe mit dem Carbogengas notwendig, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung, eine gleichmäßige Vermischung des Wirkstoffes zu erreichen und um den pH-Wert konstant zu halten. Dies wurde mit Hilfe eines Schlauchsystems, das mit jedem Organbad verbunden war, ermöglicht. Die Glasfritten befanden sich direkt vor dem Einlass in die Bäder. Sie ermöglichten feine Zerstäubung und zusammen mit an den Anfängen der Schläuche befindlichen Klemmen eine optimale Dosierung der Luft.

Abbildung 12: Originalabbildung der Gaszufuhr



3.6 Durchführung der Versuche

Vor Beginn der Versuche musste jedenfalls sichergestellt werden, dass die Gefäße frei von Verunreinigungen waren. Dafür musste man die Organbäder mehrmals mit Aqua dest. durchspülen. Die Rückstände wurden mit Hilfe einer Bürste entfernt. Schließlich spülte man die Organbäder und die dazugehörigen Halterungen mit einer Krebs-Henseleit-Lösung. Dann füllte man die Kammern mit der Lösung.

3.6.1 Wirkung der Substanzen auf die isolierten Meerschweinchenorgane

3.6.1.1 Atrium Dexter (*Rechter Vorhof*)

Die Isolierung und Vorbereitung des Vorhofes wurde vorher in Kapitel 3.4.1.2 beschrieben. Mit Hilfe der beiden Haken wurde das Organ in die Apparatur 2 eingespannt. Das Organ wurde mit Hilfe eines Silberdrahtes am Kraftwandler fixiert. Man musste die Länge des Silberdrahtes so wählen, dass das Organ locker in der Halterung hing. Eine Überdehnung könnte den Sinusknoten und so die Spontanaktivität beeinflussen, und so zu falschen Ergebnissen führen. Dann wurde das Gerät eingeschaltet und die erforderlichen Einstellungen vorgenommen. Der Flachbettschreiber musste auf 5 mV und auf Speed 5 mm/sec eingestellt werden und mittels eines Drehrades auf den Nullpunkt am Millimeterpapier eingestellt werden.

Nachher wurde der Amplifier mittels Kippschalter zugeschaltet und der Schreiber wurde wieder auf den Nullpunkt abgeglichen. Als letzter Schritt der Vorbereitung wurde mit Hilfe des Feintriebs eine Vorspannung des Organs von 10,4 mN vorgenommen. Die Vorspannung diente dazu, immer gleiche Arbeitsbedingungen zu schaffen, weil die Organe eine natürliche Plastizität aufweisen. Bevor man mit Messungen anfangen konnte, musste man noch ungefähr 45 Minuten warten, damit das Organ sich an Messbedingungen anpasste. Die Messung wurde alle fünf Minuten abgelesen, dazu wurde der Schreiber abgesenkt und eine Aufzeichnung der Schlagfrequenz über einen Zeitraum von zwölf Sekunden durchgeführt. Bei 5mm/sec stimmte dies auf dem Millimeterpapier mit sechs Kästchen überein. Jedes Kästchen war 1 cm lang. Wenn die Frequenz über mindestens vier Messungen konstant blieb,

konnte man die Versuchssubstanz dazu geben. Die erste Konzentration wurde zugegeben und gleich gemessen, danach wurde alle fünf Minuten eine Messung durchgeführt. Die Gesamtdauer der Messung beträgt für jede Konzentration 45 Minuten. Dann erfolgte die Zugabe der nächsten Konzentration. Die Zugabe der Substanz musste sehr vorsichtig erfolgen. Das Berühren der Silberdrähte und des Kraftwandlers war zu vermeiden, sonst wurden die Ergebnisse verfälscht.

3.6.1.2 Musculus papillaris(Papillarmuskel)

Der präparierte und eingespannte Muskel wurde ins Organbad abgesenkt und eine Zeit lang zur Gewöhnung belassen. Dann wurde er unter eine Spannung von 3,92 mN gesetzt. Während des Versuches wurde diese Spannung durch Nachjustierung am Feintrieb stets gleichgehalten, da die Kontraktionskraft mit der Ausgangsspannung einherging (Reiter M 1967). Beim Papillarmuskel musste elektronisch gereizt werden, dies wurde mit Hilfe eines Reizgeräts(A3 Accupulser, Firma WPI) bewerkstelligt.

Durch diese Reize kam es bei dem Papillarmuskel zur Kontraktion. Die Kontraktionen konnten auch vorkommen, obwohl das Reizgerät noch nicht zugeschaltet war. Diese Erscheinung war ein Zeichen dafür, dass noch nicht entfernte Purkinjefasern vorhanden waren. Die Purkinjefasern mussten vor Fortsetzen des Versuchs entfernt werden. Die Reize wurden in Form von Rechteckimpulsen von 10 ms^{-1} bei einer Frequenz von 1 Hertz ausgesendet. Die Stromstärke wurde über eine Isolation Unit geregelt. Diese war ungefähr 10% über der minimalen Reizschwelle. Bei zu hoher Stromstärke konnte es zu einer Ausschüttung und Erschöpfung der Catecholaminspeicher kommen, was in weiterer Folge zu einer Verfälschung der Versuchsergebnisse führen konnte (Furchgott RFet al. 1959). Diese Ergebnisse konnte man daran erkennen, dass es zu einer selbstständigen Abnahme der Amplitude des sich kontrahierenden Papillarmuskels kommt, auch als „run down“ bekannt.

Die Einstellung des Schreibers, Geschwindigkeit, die Zeit für Kontrollphase und Aufzeichnungen entsprachen weitgehend der des Vorhofs. Im Unterschied zum Vorhof wurden hier nicht 12 Sekunden gemessen, sondern nur sieben bis neun Amplituden gezeichnet. Die Messung und Substanzzugabe entsprach dem bekannten Schema, nur wurde am Ende jedes Konzentrationsintervalls eine Aufzeichnung bei 20 mm/sec durchgeführt, sodass eine breitere, besser messbare Zeichnung entstand.

3.6.1.3 *Terminales Ileum (Dünndarm)*

Ein mit zwei Silberhäkchen versehener Darm, siehe Kapitel 3.4.1.5. wurde in die Organhalterung eingespannt. Nach Einspannung wurde das Organ ins Organbad abgesenkt und das Gerät aktiviert. Die Vorspannung war beim Darm 4,92 mN zu wählen. Danach wartete man zwanzig Minuten, bis sich das Organ an die Bedingungen anpasst. Hier kam es regelmäßig zu einer Verschiebung der Vorspannung, weil sich die Darmmuskulatur in der warmen Nährstofflösung entspannte und sich auch die Peristaltik änderte. Diese Verschiebung konnte man mit Feintrieb wieder ausgleichen. Dann wurde der Schreiber abgesenkt und die Tyrode über einen Ablaufschlauch abgelassen. Man musste wieder so schnell wie möglich und sehr vorsichtig ein neues Medium ins Organbad geben. Hier wurde als neues Medium 25 ml 60 mmol Kaliumchloridlösung verwendet. Sie wurde mit einem Messzylinder abgemessen und direkt ins Organbad geschüttet. Die Kaliumchloridlösung wurde jeden Tag frisch in einem 100 ml Messkolben durch Lösen von 450 mg KCl in der Tyrode hergestellt.

Durch diese Zugabe von KCl kam es zu einer sofortigen Kontraktion des Darms. Zuerst beobachtete man eine rasche Kontraktion, die ebenso rasch wieder abnahm, sich aber später bei der Hälfte der ursprünglichen Kontraktion einpendelte und konstant blieb. Dann musste man mindestens 45 Minuten abwarten, bis man eine konstante Plateauphase erreichte. Nachdem man eine konstante Plateauphase erreicht hatte, wurde mit Substanzzugabe nach bereits beschriebenen 45-minütigen Schema angefangen.

3.6.1.4 *Aorta descendes*

Die Aortapräparate sind ringförmig, siehe Kapitel 3.4.1.6, dadurch musste man sie nur noch zwischen die zwei Drähte der Aufhängevorrichtung einfädeln. Dabei passt man auf, dass die Stücke ganz ohne Spannung waren. Nach Einfädeln wurde die Aorta ins Organbad abgesenkt und das Gerät eingeschaltet und eine Nullpunkteinstellung durchgeführt. Dann spannte man das Organ bei 10 mV auf 10 cm vor. Wenn man umrechnete, ergab dies einen Zug von 19,6 mN. Dann wurde etwa 20 Minuten gewartet, was für die Entspannung des Organes wichtig war und das Gerät auf 5 mV, dies ergab 9,81 mN, umgestellt. Der Nullpunkt wurde auch hier mittels Feintrieb wieder abgeglichen. Dann wurde wie beim Darm Tyrode abgelassen und Kaliumchloridlösung hineingegeben. Nun der Unterschied zum Darm: hier wurde 670 mg

KCl genommen und in 100 ml Tyrode gelöst. Hier kommt es auch zu einer raschen Kontraktion, die ebenso rasch wieder abnahm. Man wartete etwa 45 Minuten, bis sich eine stabile Plateauphase bildete. Die Substanzzugabe erfolgte wieder nach dem bekannten Schema.

3.6.1.5 *Arteria pulmonalis (Lungenarterie)*

Der Ablauf des Versuches war gleich wie bei der Aorta, der einzige Unterschied lag in der Vorspannung, die immer konstant bei 5 mV, also 9,81 mN, war.

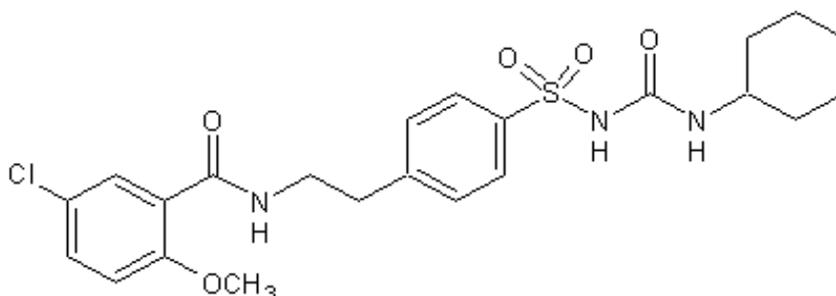
3.6.2 Untersuchungen des Wirkmechanismus von MAH 4HCL am Darm

3.6.2.1 *Untersuchungen mit Glibenclamid und Nitro-L-Arginin*

Der Darm wurde wie beim Kapitel 3.4.1.5 beschrieben präpariert und bei der Apparatur 2 eingespannt. Für Ablauf des Versuches siehe Kapitel 3.6.1.3. Hier wartete man auch bis zur konstanten Plateauphase, dann wurden die Antagonisten Glibenclamid bzw. Nitro-L-Arginin zugesetzt, wobei die Endkonzentration im Organbad 100 µmol/l betrug. Nach 45 Minuten wurden 15 µl Substanzstammlösung zugegeben und weitere 45 Minuten zum Wirken gelassen, wonach der Versuch beendet war.

Glibenclamid

Abbildung 13: Glibenclamid (MG = 494,0 g/mol)

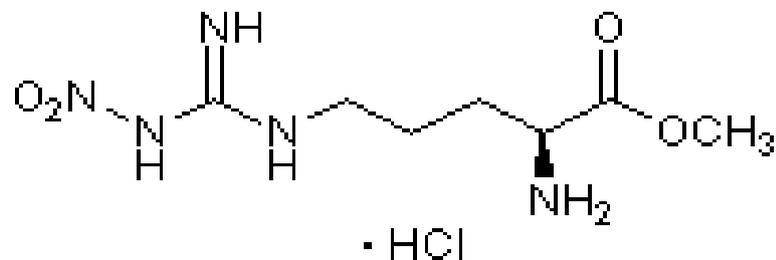


Glibenclamid ist ein Sulfonylharnstoff-Derivat. Es wird auch wegen seiner blutzuckersenkenden Wirkung als orales Antidiabetikum angewendet. Glibenclamid blockiert die Kaliumkanäle von B-Zellen der Pankreas, dadurch kommt es zu einer Abnahme der Kaliumpermeabilität und damit verbunden auch zur Abnahme des Membranpotentials. Dann werden spannungsabhängige Calciumkanäle geöffnet. Es kommt zu einer Erhöhung der Calciumionenkonzentration in den Zellen und so zu einer gesteigerten Freisetzung von Insulin.

Die Nebenwirkungen von Glibenclamid sind vor allem gastrointestinale Beschwerden und allergische Reaktionen. In seltenen Fällen kann es zu Leukopenie und Thrombozytopenie kommen. Bei Zuckererkrankten kann die Einnahme von Glibenclamid zu schweren hyperglykämischen Zuständen führen (Mutschler et al. 2008).

Nitro-L-Arginin

Abbildung 14: Nitro-L-Arginin (MG = 219,20 g/mol)



Das Nitro-L-Arginin ist ein NO-Antagonist. Es inhibiert kompetitiv die NO-Synthase. Es stimuliert endogen die Guanylatcyclase und durch deren Aktivierung steigt auch das intrazelluläre cyclische Guanosinmonophosphat an. Dann kommt es zur vermehrten Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischem Retikulum, und dadurch zur Relaxation der glatten Muskulatur. Das Nitro-L-Arginin blockiert diesen Mechanismus, dann kommt es zu keiner Erschlaffung der Gefäße. Die Wirkung von Nitro-L-Arginin wurde mit Hilfe verschiedener Methoden untersucht und es wurde nachgewiesen, dass die Kontraktilität des Darms deutlich erhöht wurde (Mutschler et al. 2008).

3.7 Auswertung der Daten und Statistik

3.7.1 Atrium dexter

Durch diese Versuche wurde die Chronotropie, auf Deutsch Schlagfrequenz des Sinusknoten, festgestellt. Durch Zusatz der Testsubstanz wurden die Veränderungen in der Anzahl der Schläge beobachtet. Durch den Versuchsablauf, siehe Kapitel 3.6.1.1, erhielt man die Ausschläge und somit gleichzeitig die Frequenz für 12 Sekunden. Man kam auf die Schläge pro Minute, wenn man mit 5 multipliziert. Am Ende der kumulativen Zugaben konnte man je nach Substanz eine neutrale, positiv oder negativ chronotrope Wirkung auf den Vorhof nachweisen.

3.7.2 Musculus papillaris

Hier wurden die Änderungen der Kontraktionskraft bei Papillarmuskel in mN zu ermitteln. Um die Ergebnisse rationaler darzustellen, rechnete man diese in Prozent um.

Die Amplituden wurden vermessen und die erhaltenen Werte in Zentimeter notiert. Die Papillarmuskeln wurden ausschließlich bei 2 mV und 5 mV vermessen. Die erhaltenen Werte wurden mit 0,4 (2 m) und 0,98 (5mV) multipliziert und so standardisiert. Der konstante Wert wurde vor Substanzzugabe ermittelt und mit 0% angenommen, so konnte man die Abnahme in Prozent errechnen.

3.7.3 Aorta, Arteria pulmonalis, Terminalis Ileum

Ziel der Versuche war, die spasmolytische Wirkung der Substanzen auf diese Organe festzustellen, nachdem die Organe mit Hilfe von KCl maximal kontrahiert worden waren. Die Substanz wurde je 45 Minuten dazugegeben, vor und nach Zugabe musste in der Kurve markiert werden. So konnte jede Veränderung beobachtet und berechnet werden. Der Wert vom Nullpunkt bis zur Plateauphase wurde als Referenz angenommen und man maß am Ende jede Einwirkzeit der verschiedenen Konzentrationen den verringerten Abstand zur

Nulllinie. Man konnte so die Werte anteilig vergleichen. Dafür musste man einen Eichfaktor berücksichtigen, der 5 mV für 1 cm bzw. 0,98 mN entsprach. Wenn man bei 2 mV arbeitete, musste der Wert mit 0,2 und bei 10 mV mit 2 multipliziert werden.

3.7.4 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Kontraktionskraft und der Schlagfrequenz wurden die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM), berechnet. Zur Berechnung dieser statistischen Werte und EC50 wurde das Programm „Sigma Plot 9.0“ verwendet. Dieses Programm erklärt die mittlere effektive Konzentration des Wirkstoffes in mmol/l, bei der die Hälfte des Kontrollwertes erreicht wird. Um die Irrtumswahrscheinlichkeit zu beobachten, wurde der „Student-t-Test“ für gepaarte Beobachtungen durchgeführt. Werte kleiner als 0,1% ($P \leq 0,001$) waren hochsignifikant und Werte von $\leq 5\%$ ($P \leq 0,05$), $\leq 1\%$ ($P \leq 0,01$) signifikant. Die Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $> 5\%$ ($P > 0,05$) handelte sich um nicht signifikante Werte.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Testsubstanz MAH 4HCl

Als Indikatoren wurden die Schlagfrequenz (Schläge/min) und die Kontraktionskraft (mN) verwendet, um die Wirkung der Testsubstanz darzustellen. Die Ergebnisse sind auch in Prozenten (%) gerechnet. Die Resultate konnte man graphisch darstellen und damit die effektive Konzentration (EC_{50}) in $\mu\text{mol/l}$ ermitteln. Die EC_{50} ist die Konzentration, bei der die Kontraktionskraft bzw. die Schlagfrequenz nur noch 50 % des Ausgangswertes beträgt.

4.1.1 Atrium cordis dexter

Um die Wirkung der Testsubstanz auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofes zu ermitteln, wurden vier Versuche durchgeführt. Die gesammelten Werte wurden arithmetisch gemittelt und ein Kontrollwert (= 0%) von $180 \pm 8,66$ Schläge pro Minute festgelegt. Die Änderung der Schlagfrequenz nach der kumulativen Substanzzugabe konnte mit dem Kontrollwert verglichen werden. Die Substanz zeigte eine schwache negativ chronotrope Wirkung bei der Konzentration von $10 \mu\text{mol/l}$. Die negativ chronotrope Wirkung wurde durch die weitere Zugabe der Testsubstanz immer deutlicher. Bei der Konzentration von $30 \mu\text{mol/l}$ war die Frequenz um $-15,27 \pm 3,87$ % kleiner als in der Kontrollphase. Bei der Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ kam es zu einem Herzstillstand, d.h. keine Erregungsbildung mehr in den Sinusknoten.

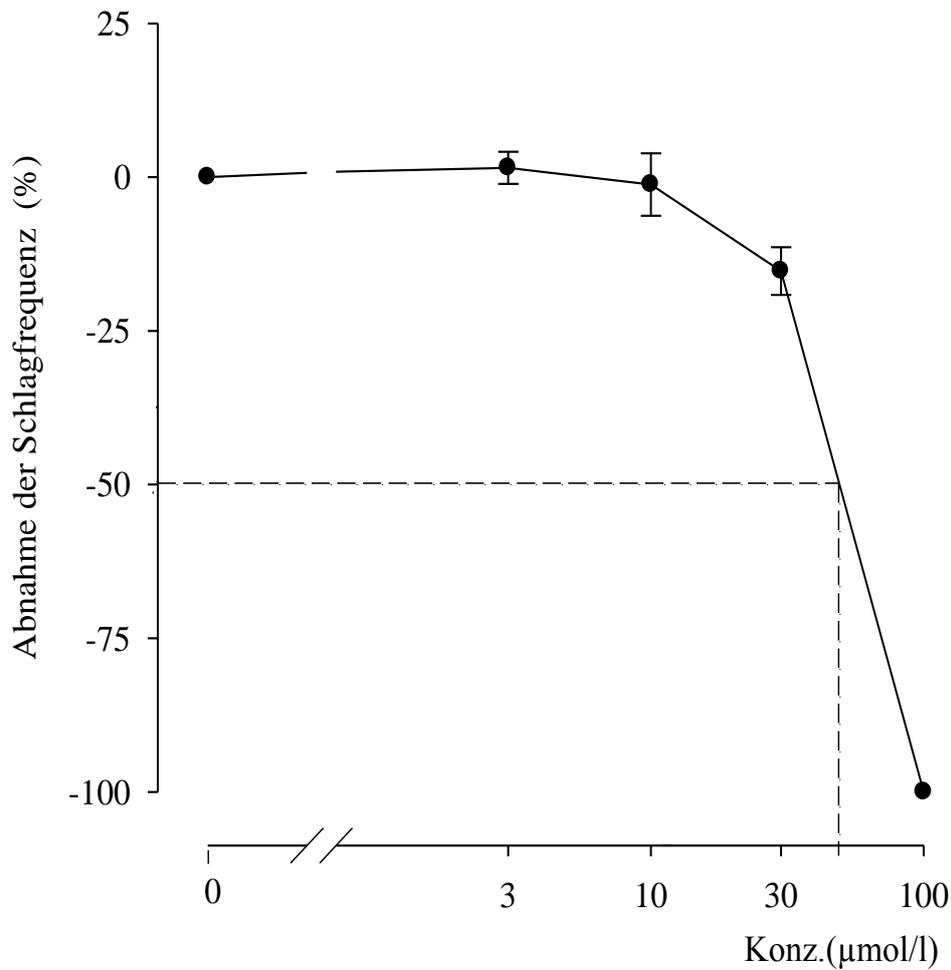
Tabelle 5: Versuchsergebnisse von MAH 4HCl am rechten Vorhof

| MAH4HCL ($\mu\text{mol/l}$) | f \pm SEM (x/min) | f \pm SEM (%) | Anzahl der Versuche n | Irrtumswahrscheinlichkeit (P) |
|---|---|---------------------------------------|--------------------------------------|--|
| Kontrolle | 180 \pm 8,66 | 0 \pm 0 | 4 | - |
| 3 | 182,50 \pm 8,54 | 1,52 \pm 2,60 | 4 | n.s |
| 10 | 177,50 \pm 12,50 | -1,18 \pm 5,08 | 4 | n.s |
| 30 | 152 \pm 9,24 | -15,27 \pm 3,87 | 4 | 0,05 |
| 100 | 0 \pm 0 | -100 \pm 0 | 4 | 0,001 |

In der Tabelle 5 sind arithmetische Mittelwerte (f) in Schlägen/min und in Prozent sowie deren Standardfehler (SEM) für die jeweilige Konzentration angegeben. n ist die Anzahl der Versuche.

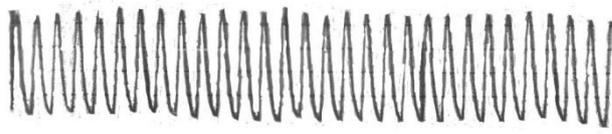
Diagramm 1 : Konzentration-Wirkungskurve von MAH4 HCl am rechten Vorhof

VORHOF
n = 4 MAH 4 HCL
EC₅₀ = 49 µmol/l

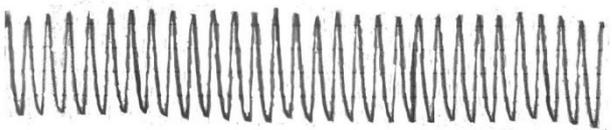


Dieses Diagramm zeigt die Änderung der Schlagfrequenz in Abhängigkeit der Substanzmenge in der Organkammer. Auf der y-Achse wurde die Schlagfrequenz in % und auf der x-Achse die Konzentration der Testsubstanz eingetragen. Der EC₅₀-Wert wurde durch strichlierte Linien dargestellt und beträgt 49 µmol/l. Die Punkte zeigen die berechneten Mittelwerte der Schlagfrequenz bei den entsprechenden Konzentrationen und die Balken deren Standardfehler.

Abbildung 15: Originalaufzeichnung der chronotropen Wirkung von MAH4 HCl



Kontrolle



3 µmol/l



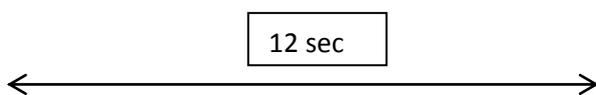
10 µmol/l



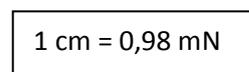
30 µmol/l



100 µmol/l



12 sec



1 cm = 0,98 mN

Die negativ chronotrope Wirkung kann man an der Zahl der Schläge ablesen.

4.1.2 Musculus papillaris

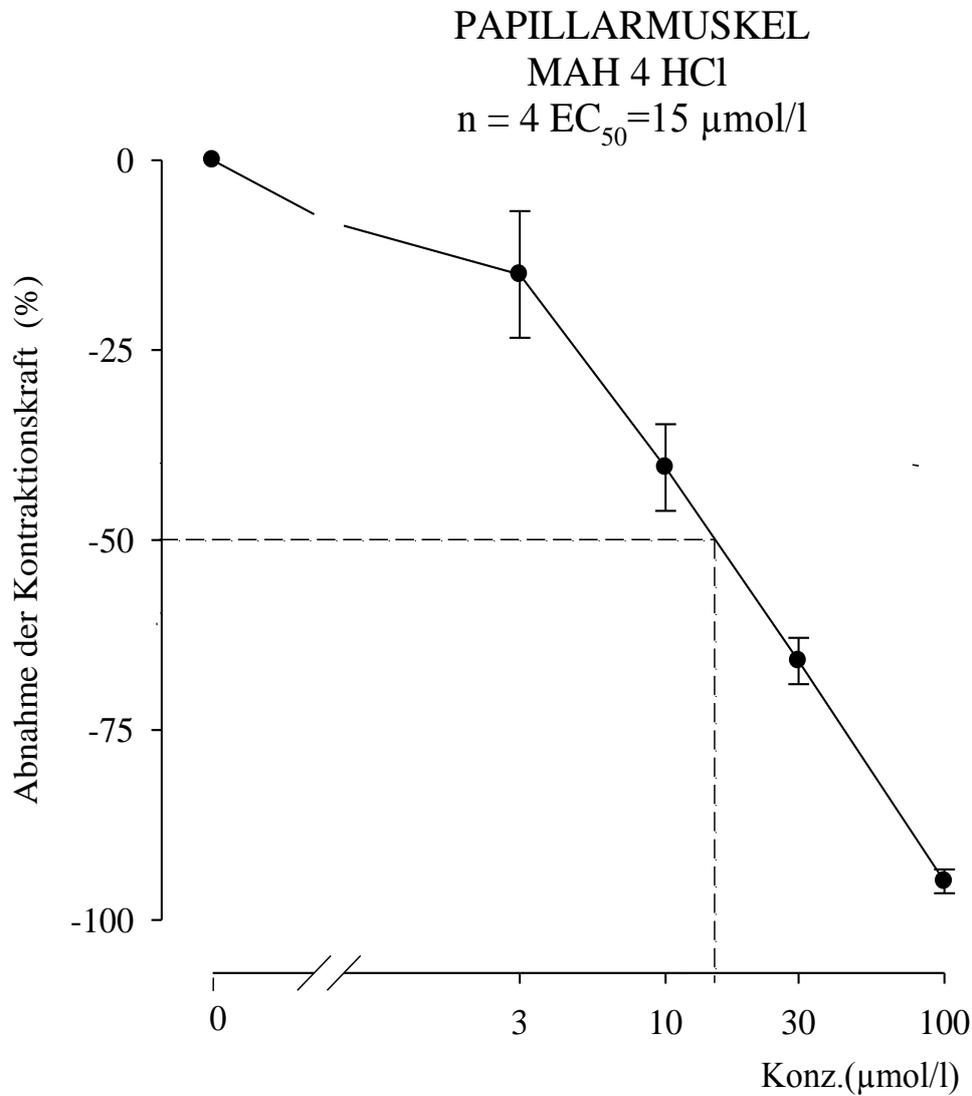
Für die Beurteilung der inotropen Wirkung am Papillarmuskel wurden vier Versuche durchgeführt. Kontrollwert war $1,58 \pm 0,45$ mN. Durch die Substanzzugabe kam es zu Abnahme der Kontraktionskraft. Bei der Konzentration von $3 \mu\text{mol/l}$ betrug diese Abnahme $-15,05 \pm 8,34$ % und wurde immer größer. Bei der Endkonzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ betrug die Kontraktionskraft noch $0,08 \pm 0,02$ mN bzw. $-94,92 \pm 1,58$ % des Kontrollwertes.

Tabelle 6: Wirkung von MAH 4HCl auf den Papillarmuskel

| MAH4HCL ($\mu\text{mol/l}$) | $f_c \pm \text{SEM}$ (mN) | $f_c \pm \text{SEM}$ (%) | Anzahl der Versuche n | Irrtumswahrscheinlichkeit (P) |
|----------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| Kontrolle | $1,58 \pm 0,45$ | 0 ± 0 | 4 | - |
| 3 | $1,23 \pm 0,43$ | $-15,05 \pm 8,34$ | 4 | 0,05 |
| 10 | $0,99 \pm 0,36$ | $-40,46 \pm 5,70$ | 4 | 0,01 |
| 30 | $0,57 \pm 0,19$ | $-65,92 \pm 3,05$ | 4 | 0,01 |
| 100 | $0,08 \pm 0,02$ | $-94,92 \pm 1,58$ | 4 | 0,001 |

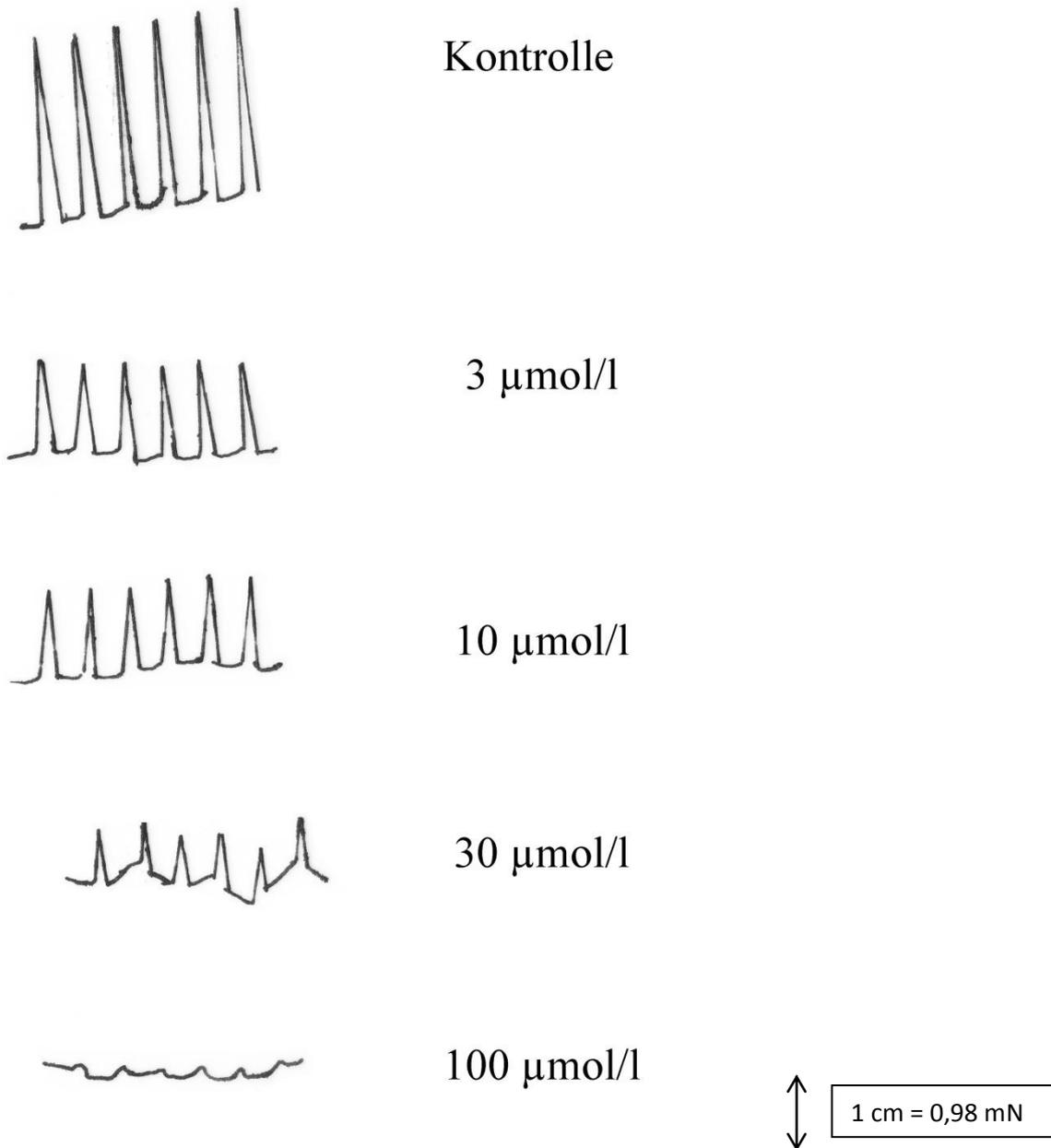
In dieser Tabelle werden die arithmetischen Mittelwerte (f_c) und deren Standardabweichung (SEM) bei der anwesenden Konzentration sowohl in mN als auch in Prozent dargestellt.

Diagramm 2: Konzentration-Wirkungskurve von MAH4 HCl am Papillarmuskel



Dieses Diagramm zeigt die Änderung der Kontraktionskraft in Abhängigkeit von der Substanzmenge in der Organkammer. Auf der y-Achse wurde die Abnahme der Kontraktionskraft in % und auf der x-Achse die Konzentration der Testsubstanz in µmol/l eingetragen. Der EC₅₀-Wert wurde durch strichlierte Linien dargestellt und beträgt 15 µmol/l. Die Punkte zeigen die berechneten Mittelwerte der Kontraktionskraft bei den entsprechenden Konzentrationen und die Balken deren Standardfehler.

Abbildung 16: Originalaufzeichnung der inotropen Wirkung von MAH4 HCl



Die Abnahme der Kontraktionskraft sieht man deutlich bei der Länge der Amplitude. Die Länge der Amplitude nimmt mit zunehmender Konzentration der Testsubstanz in der Organkammer ab, was auf negativ inotroper Wirkung der Testsubstanz beruht.

4.1.3 Aorta descendens

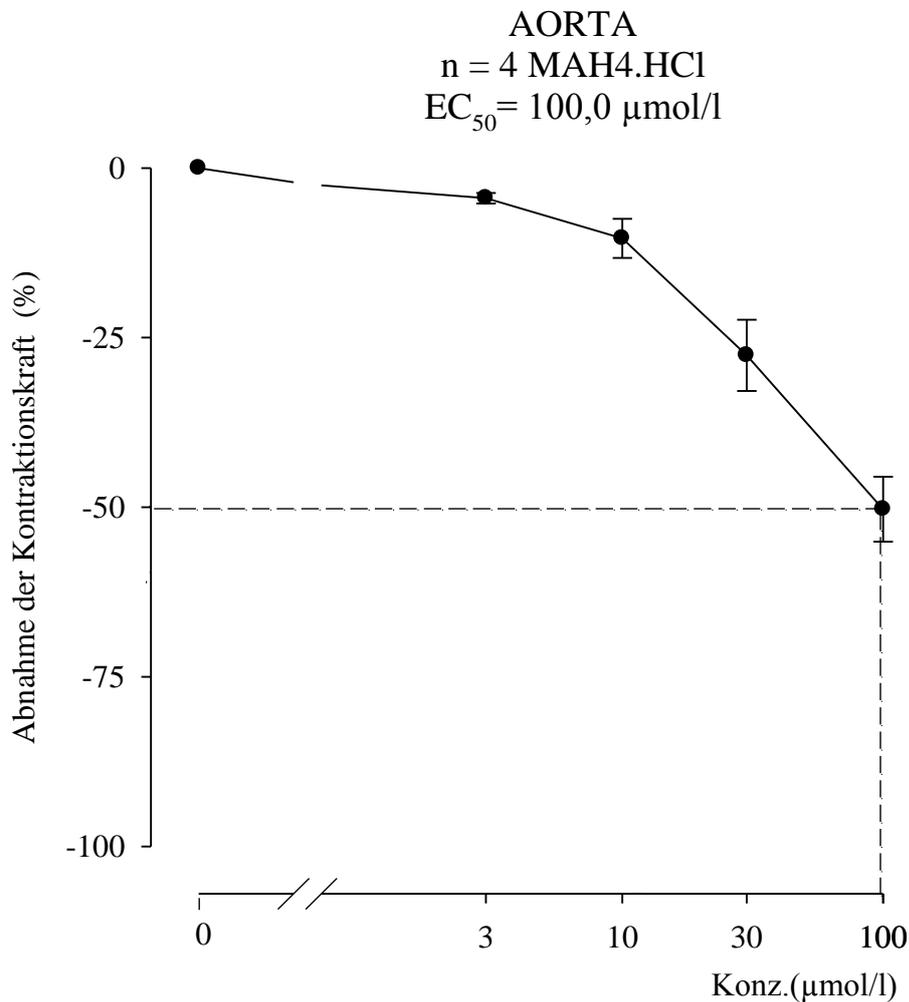
Hier wurde die dilatierende Wirkung von MAH 4HCl auf die glatte Muskulatur der Aorta untersucht. Dafür wurden vier Versuche durchgeführt. Der Kontrollwert beträgt $11,31 \pm 0,57$ mN. Durch die kumulative Substanzzugabe war am Anfang keine signifikante Dilatation festzustellen. Ab der Konzentration von $30 \mu\text{mol/l}$ konnte man die Dilatation der glatten Muskulatur deutlicher sehen. Bei der Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ betrug die Kontraktionskraft $5,69 \pm 0,77$ mN bzw. ist um $-50,30 \pm 4,79$ % des Kontrollwertes abgefallen.

Tabelle 7: Wirkung von MAH 4HCl auf die Aorta

| MAH 4HCL ($\mu\text{mol/l}$) | fc \pm SEM (mN) | fc \pm SEM (%) | Anzahl der Versuche n | Irrtumswahrscheinlichkeit (P) |
|-----------------------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| Kontrolle | $11,31 \pm 0,57$ | 0 ± 0 | 4 | - |
| 3 | $10,82 \pm 0,62$ | $-4,45 \pm 0,78$ | 4 | n.s |
| 10 | $10,17 \pm 0,76$ | $-10,37 \pm 2,87$ | 4 | 0,05 |
| 30 | $8,19 \pm 0,85$ | $-27,63 \pm 5,25$ | 4 | 0,05 |
| 100 | $5,69 \pm 0,77$ | $-50,30 \pm 4,79$ | 4 | 0,01 |

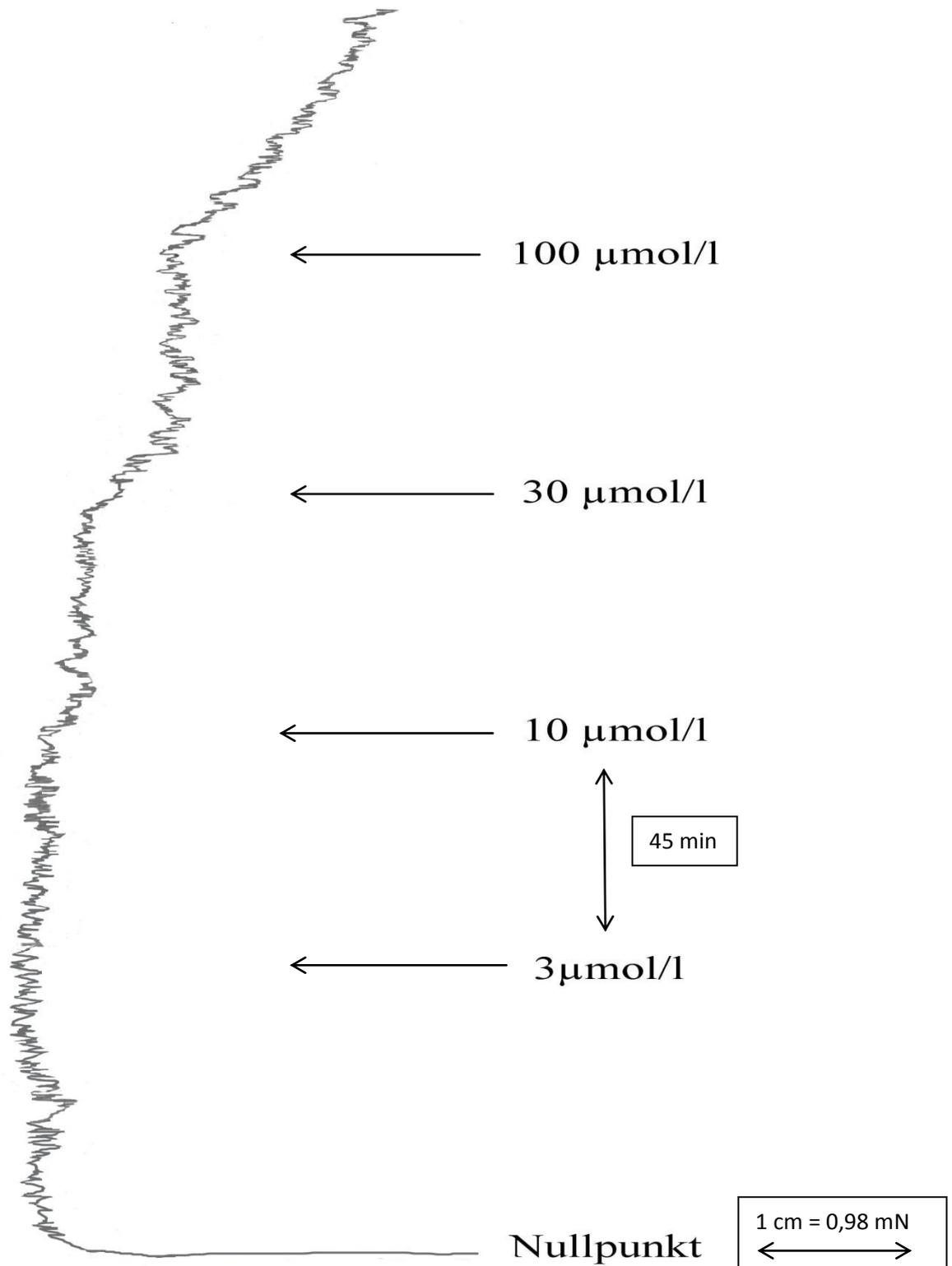
In der Tabelle 7 sind arithmetische Mittelwerte (f) von vier Versuchen in mN und in Prozent sowie deren Standardfehler (SEM) für die jeweilige Konzentration angegeben. n ist die Anzahl der Versuche.

Diagramm 3: Konzentration-Wirkungskurve von MAH4 HCl an der Aorta



Dieses Diagramm zeigt die Änderung der Kontraktionskraft in Abhängigkeit der Substanzmenge in der Organkammer. Auf der y-Achse wurde die Abnahme der Kontraktionskraft in % und auf der x-Achse die Konzentration der Testsubstanz in µmol/l eingetragen. Der EC₅₀-Wert wurde durch strichlierte Linie dargestellt und beträgt 100,0 µmol/l. Die Punkte zeigen die berechneten Mittelwerte der Kontraktionskraft bei den entsprechenden Konzentrationen und die Balken deren Standardfehler.

Abbildung 17: Originalaufzeichnung der vasodilatierenden Wirkung von MAH4 HCl



In der vorliegenden Kurve sieht man die langsame Abnahme der Kontraktionskraft. Die Pfeile zeigen die jeweiligen Einspritzzeitpunkte. Die Abstände zwischen diesen Zeitpunkten betragen 45 Minuten.

4.1.4 Arteria pulmonalis

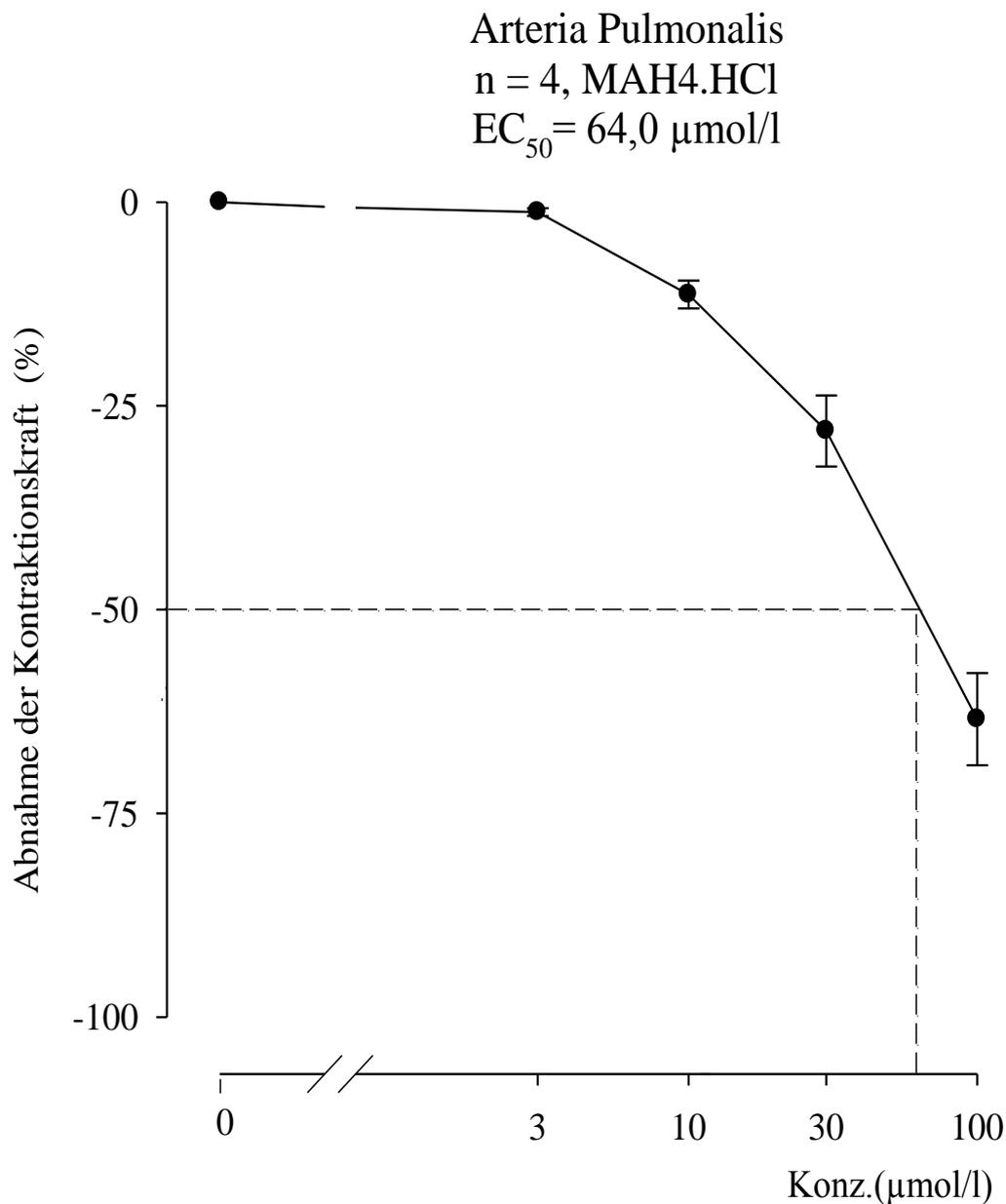
Hier wurde die dilatierende Wirkung von MAH4 HCl auf die Lungenarterie untersucht. Dafür wurden vier Versuche durchgeführt. Der Kontrollwert beträgt $12,86 \pm 2,16$ mN. Durch die kumulative Substanzzugabe war am Anfang keine signifikante Dilatation zu sehen. Ab der Konzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ kam es zur raschen Dilatation der glatten Muskulatur. Bei der Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ betrug die Kontraktionskraft $4,80 \pm 1,11$ mN bzw. ist um $-63,45 \pm 5,66$ % des Kontrollwertes abgefallen.

Tabelle 8: Wirkung von MAH 4HCL auf die Lungenarterie

| MAH4HCL ($\mu\text{mol/l}$) | fc \pm SEM (mN) | fc \pm SEM (%) | Anzahl der Versuche n | Irrtumswahrscheinlichkeit (P) |
|----------------------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| Kontrolle | $12,86 \pm 2,16$ | 0 ± 0 | 4 | - |
| 3 | $12,69 \pm 2,12$ | $-1,22 \pm 0,48$ | 4 | n.s |
| 10 | $11,49 \pm 2,08$ | $-11,35 \pm 1,71$ | 4 | 0,05 |
| 30 | $9,31 \pm 1,62$ | $-28,08 \pm 4,36$ | 4 | 0,05 |
| 100 | $4,80 \pm 1,11$ | $-63,45 \pm 5,66$ | 4 | 0,01 |

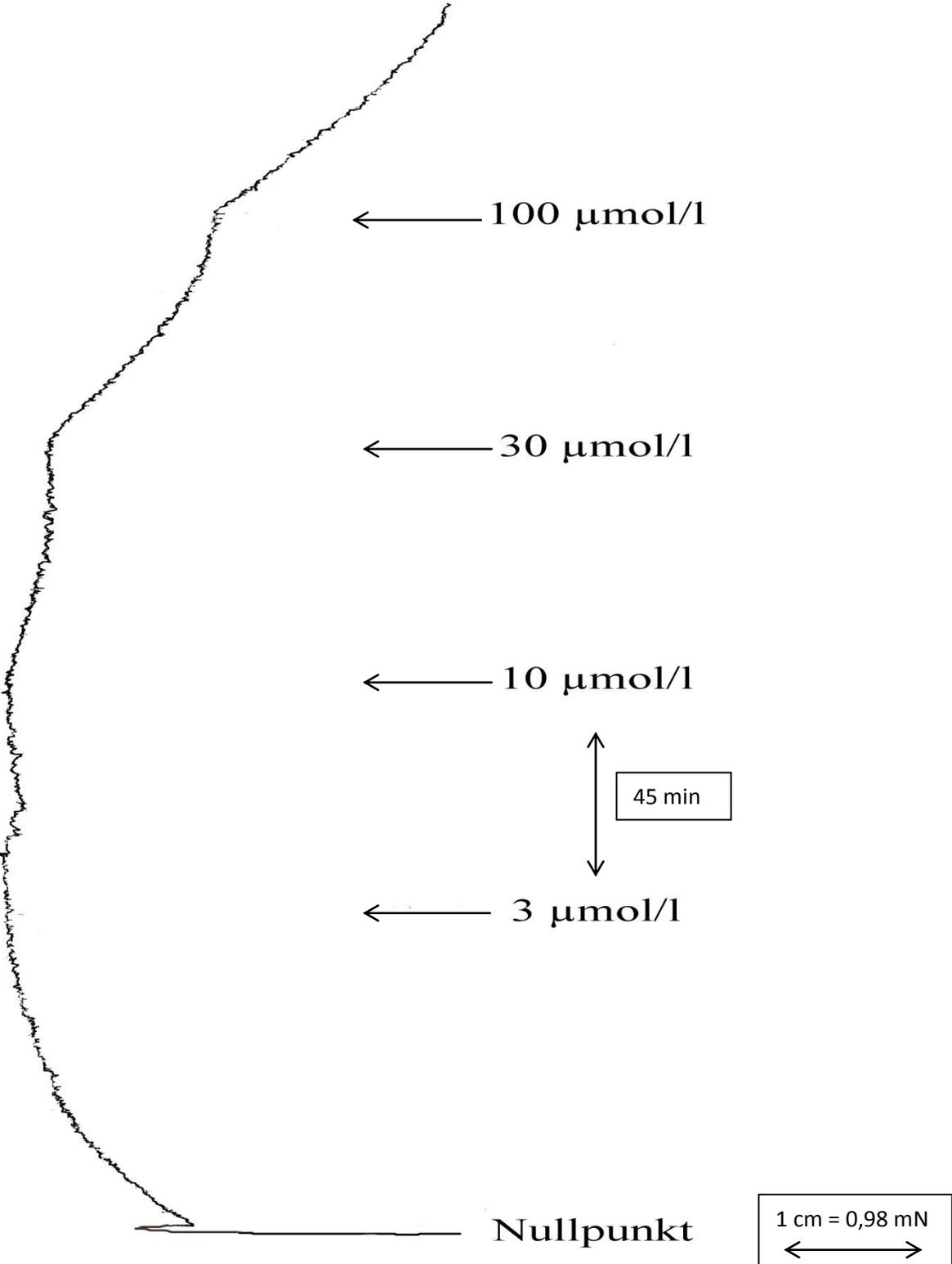
In dieser Tabelle sind die Mittelwerte der Kontraktionsänderung, die Standardfehler und die entsprechenden Prozente angegeben.

Diagramm 4: Konzentration-Wirkungskurve von MAH4 HCl an der Lungenarterie



Dieses Diagramm zeigt die Änderung der Kontraktionskraft in Abhängigkeit der Substanzmenge in der Organkammer. Auf der y-Achse wurde die Abnahme der Kontraktionskraft in % und auf der x-Achse die Konzentration der Testsubstanz in $\mu\text{mol/l}$ eingetragen. Der EC_{50} -Wert wurde durch strichlierte Linie dargestellt und beträgt $64,0 \mu\text{mol/l}$. Die Punkte zeigen die berechneten Mittelwerte der Kontraktionskraft bei den entsprechenden Konzentrationen und die Balken deren Standardfehler.

Abbildung 18: Originalaufzeichnung der vasodilatierenden Wirkung von MAH4 HCl



Bei dieser Abbildung wird die Abnahme der Kontraktionskraft mit zunehmender MAH 4HCl-Konzentration in der Organkammer dargestellt.

4.1.5 Terminales Ileum

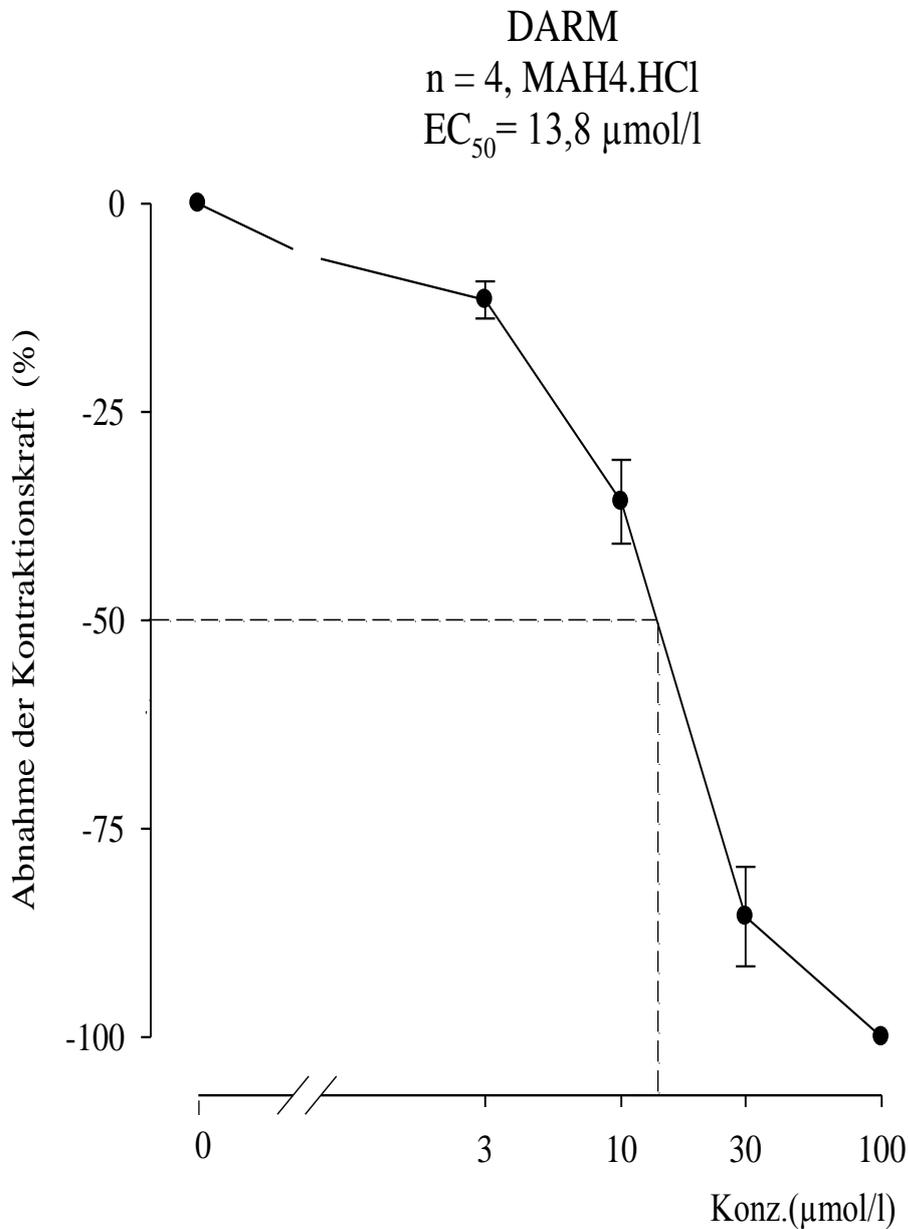
Hier wurde die spasmolytische Wirkung von MAH4 HCl auf die glatte Muskulatur des Terminalen Ileums untersucht. Dafür wurden vier Versuche durchgeführt. Der Kontrollwert beträgt $12,70 \pm 2,01$ mN. Durch die kumulative Substanzzugabe kam es zur raschen Dilatation des Darmes. Den spasmolytischen Effekt der Testsubstanz sieht man gleich ganz am Anfang bei der Konzentration von $3 \mu\text{mol/l}$. Bei der Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ betrug die Kontraktionskraft 0 ± 0 mN bzw. ist um -100 ± 0 % des Kontrollwertes abgefallen.

Tabelle 9: Wirkung von MAH 4HCl auf die Terminalen Ileum

| MAH4HCL ($\mu\text{mol/l}$) | fc \pm SEM (mN) | fc \pm SEM (%) | Anzahl der Versuche n | Irrtumswahrscheinlichkeit (P) |
|----------------------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| Kontrolle | $12,70 \pm 2,01$ | 0 ± 0 | 4 | - |
| 3 | $11,30 \pm 1,90$ | $-11,57 \pm 2,23$ | 4 | 0,05 |
| 10 | $8,09 \pm 1,31$ | $-35,77 \pm 5,03$ | 4 | 0,05 |
| 30 | $1,79 \pm 0,94$ | $-85,56 \pm 5,97$ | 4 | 0,01 |
| 100 | 0 ± 0 | -100 ± 0 | 4 | 0,001 |

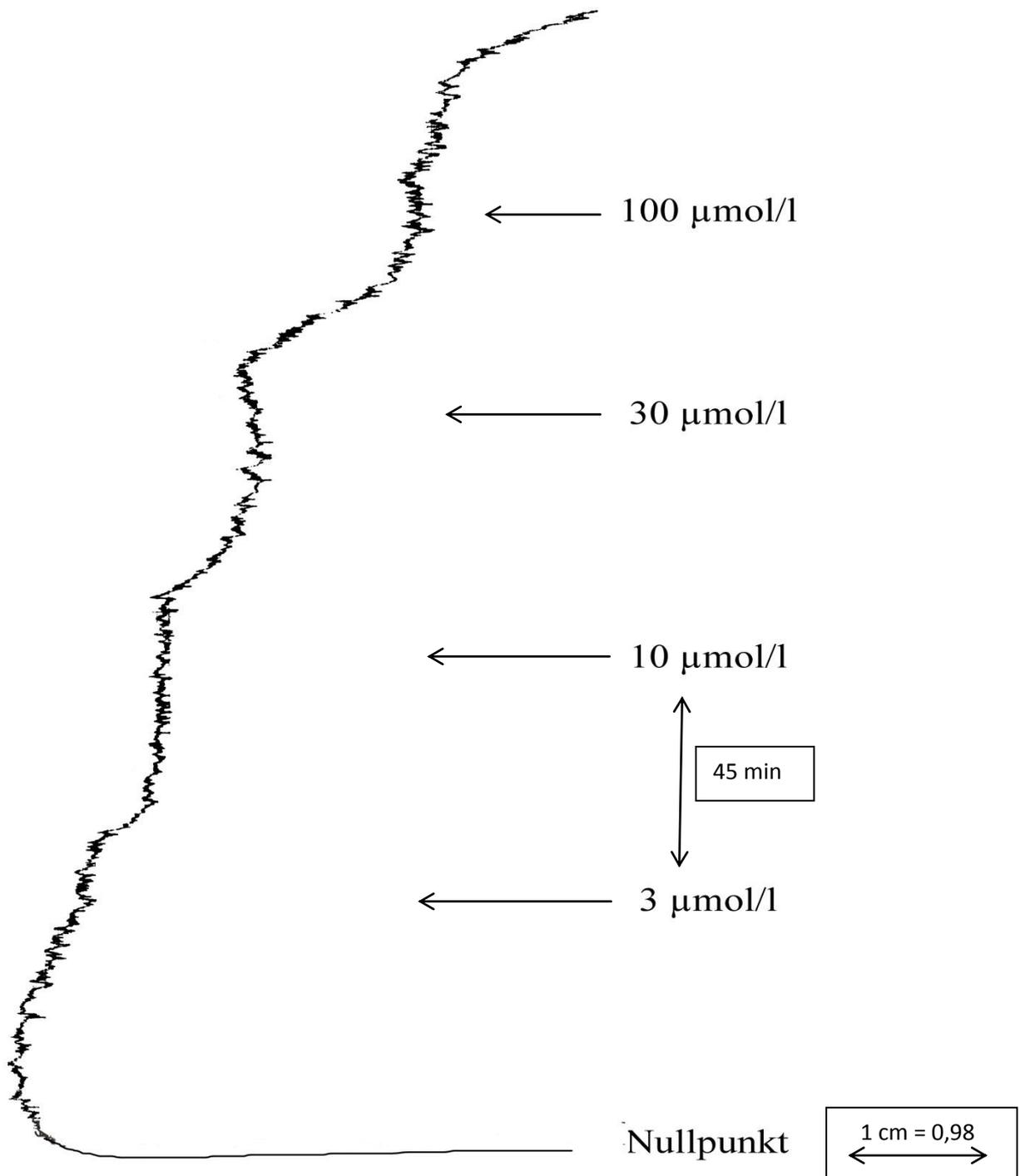
In der Tabelle 9 sind arithmetische Mittelwerte (f) von vier Versuchen in mN und in Prozent sowie deren Standardfehler (SEM) für die jeweilige Konzentration angegeben. n ist die Anzahl der Versuche.

Diagramm 5 : Konzentration-Wirkungskurve von MAH4 HCl am Dünndarm



Dieses Diagramm zeigt die spasmolytische Aktivität von MAH4 HCl am Dünndarm in Abhängigkeit der Substanzmenge in der Organkammer. Auf der y-Achse wurde die Abnahme der Kontraktionskraft in % und auf der x- Achse die Konzentration der Testsubstanz in µmol/l eingetragen. Der EC₅₀- Wert wurde durch strichlierte Linie dargestellt und beträgt 13,8 µmol/l. Die Punkte zeigen die berechneten Mittelwerte der Kontraktionskraft bei den entsprechenden Konzentrationen und die Balken deren Standardfehler.

Abbildung 19: Originalaufzeichnung der spasmolytischen Wirkung von MAH4 HCl



Bei dieser Originalzeichnung sieht man den spasmolytischen Effekt des MAH4 HCl am Dünndarm. Die Testsubstanz wirkt gleich bei erster Substanzzugabe ($3 \mu\text{mol/l}$) spasmolytisch. Die Pfeile zeigen die jeweiligen Einspritzzeitpunkte. Die Abstände zwischen diesen Zeitpunkten betragen 45 Minuten.

4.2 Untersuchung des Wirkmechanismus der Testsubstanz MAH4 HCl auf den Darm

Die Testsubstanz MAH4 HCl zeigte die stärkste relaxierende Wirkung auf die glatte Darmmuskulatur, deswegen war es sinnreich, den Darm auf den möglichen Wirkmechanismus mit Hilfe der Antagonisten Glibenclamid und NO-L-Arginin zu prüfen.

4.2.1 Wirkung von MAH4 HCl in Kombination mit NO-L-Arginin auf den Darm

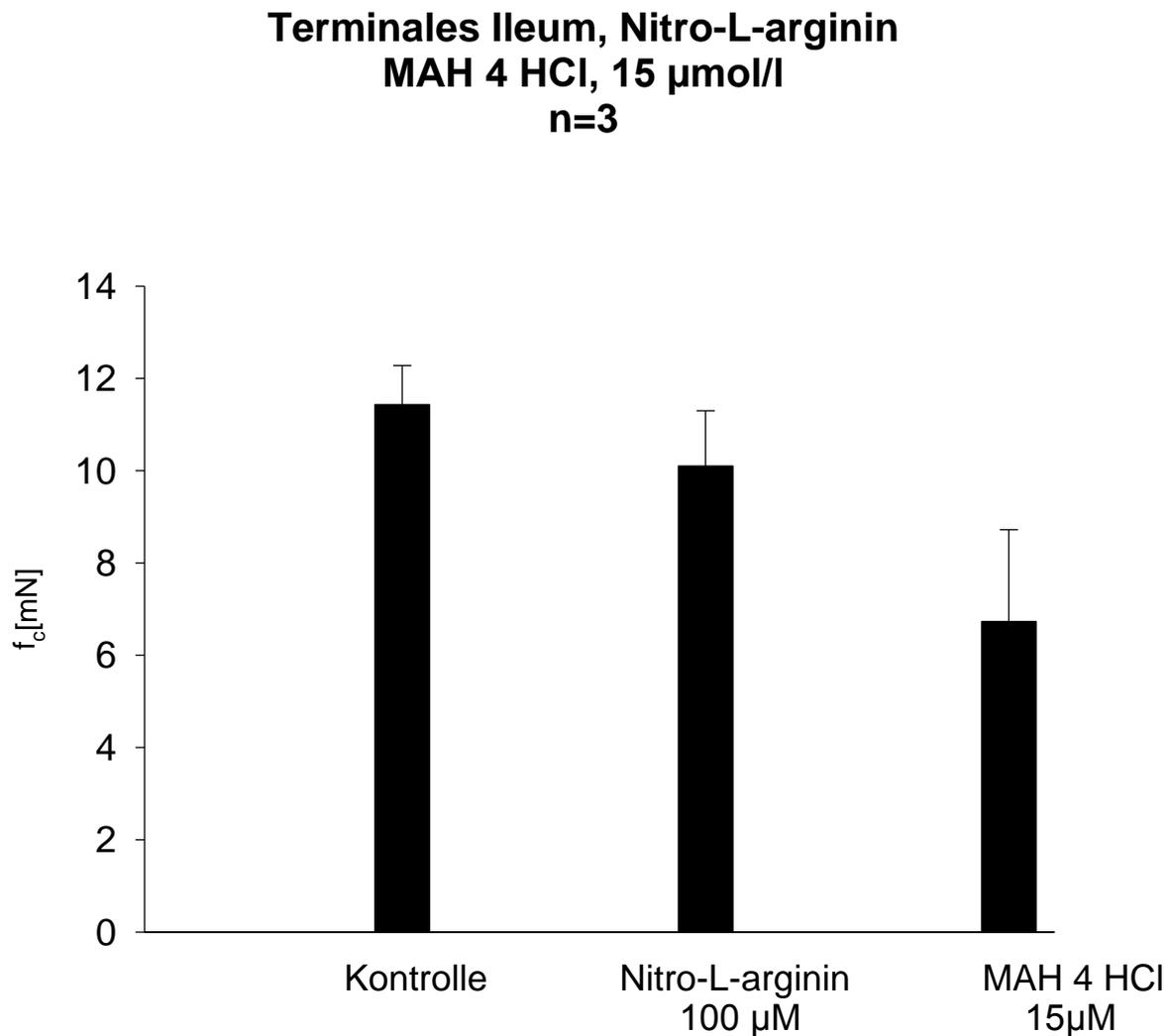
Hier wurden drei Versuche durchgeführt. Zuerst wurde die Darmmuskulatur mit Hilfe von 60 mmolarer Kaliumchloridlösung kontrahiert. Der Kontrollwert beträgt $11,43 \pm 0,85$ mN. Dann wurden 100 $\mu\text{mol/l}$ einer NO-L-Arginin-Lösung zugefügt. Eine sehr schwach dilatierende Wirkung konnte festgestellt werden und die Kontraktionskraft fiel auf $10,10 \pm 1,20$ mN, was nicht signifikant war. Nach der Zugabe von MAH4 HCl betrug die Kontraktionskraft $6,73 \pm 1,99$ mN, d.h. die Kontraktionskraft fiel noch weiter.

In der Tabelle 10 sind die arithmetischen Mittelwerte (f_c) in mN und deren Standardfehler (SEM) für die vorgeschriebene Konzentration angegeben.

Tabelle 10: Wirkung von MAH4 HCl in Kombination mit NO-L-Arginin auf den Darm

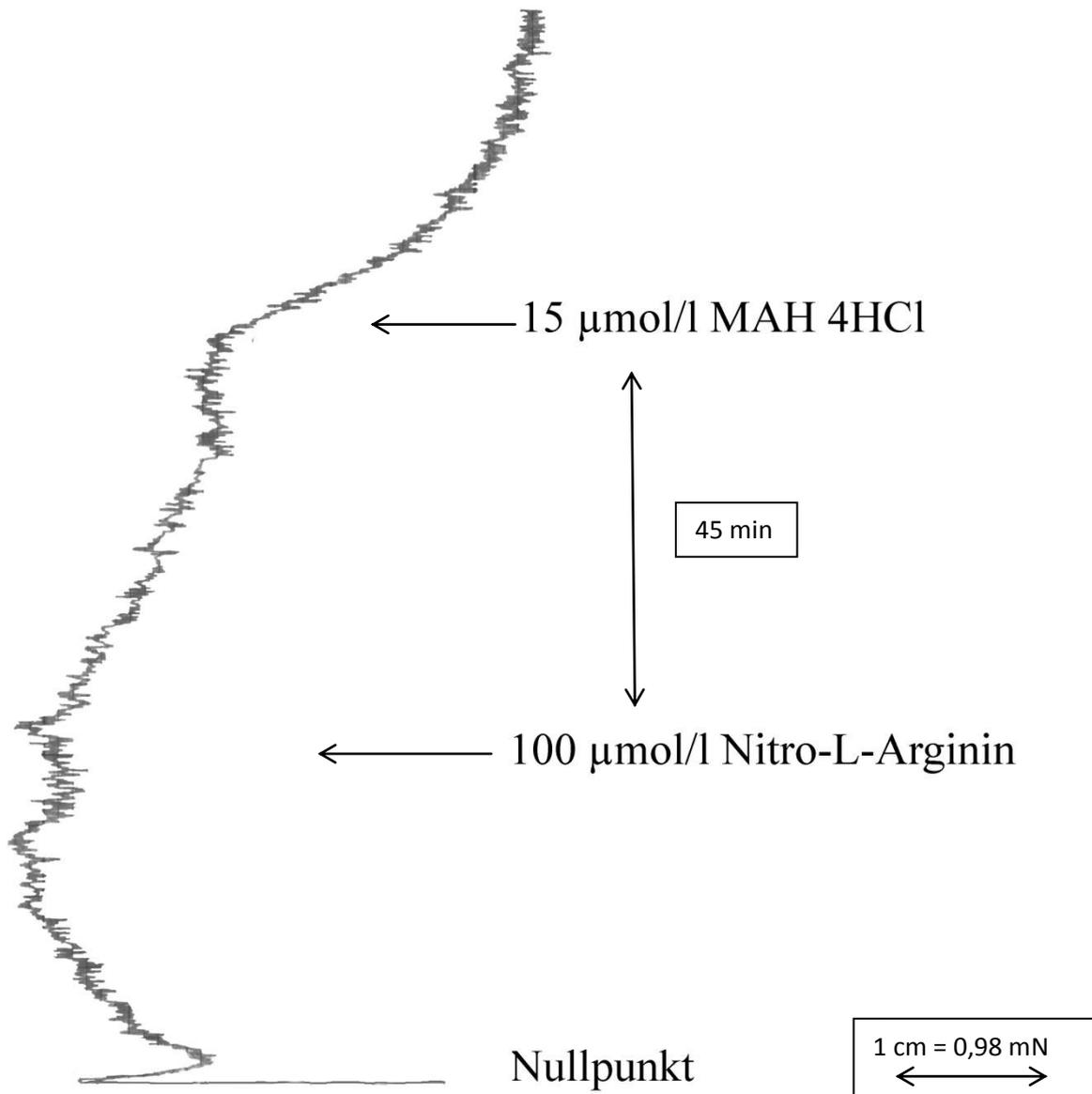
| Konzentration ($\mu\text{mol/l}$) | $f_c \pm \text{SEM}$ (mN) | Anzahl der Versuche N | Irrtumswahrscheinlichkeit (P) |
|-------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| Kontrolle | $11,43 \pm 0,85$ | 3 | - |
| 100 μM NO-L-Arginin | $10,10 \pm 1,20$ | 3 | - |
| + 15 μM MAH 4HCL | $6,73 \pm 1,99$ | 3 | n.s |

Diagramm 6: Graphische Darstellung der Wirkung von NO-L-Arginin und die Wirkung in Kombination mit MAH4 HCl



Bei diesem Balkendiagramm konnten die Messwerte graphisch dargestellt werden. Die schwarzen Balken zeigen die Änderungen der Kontraktionskraft (f_c) in mN in Abhängigkeit von den hinzugebenden Substanzen bei der vorgegebenen Konzentration (100 μ mol/l NO-L-Arginin) und in Kombination der Antagonisten mit 15 μ mol/l. Die dünnen Striche auf dem schwarzen Balken zeigen die Größe des Standardfehlers.

Abbildung 20: Originalaufzeichnung der Wirkungskurve von MAH4 HCl in Kombination mit NO-L-Arginin



Die Pfeile zeigen die Einspritzzeiten bzw. den Zeitabstand. Die Wirkungskurve zeigt eine leichte Veränderung der Kontraktionskraft der glatten Muskulatur bei der Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ NO-L-Arginin. Durch die Zugabe von 15 $\mu\text{mol/l}$ MAH4 HCl kam es zu einer stärkeren Spasmolyse.

4.2.2 Wirkung von MAH4 HCl in Kombination mit Glibenclamid auf den Darm

Hier wurden auch drei Versuche durchgeführt. Zuerst wurde die Darmmuskulatur mit Hilfe von 60 mmolarer Kaliumchloridlösung kontrahiert. Der Kontrollwert beträgt $7,01 \pm 1,13$ mN. Dann wurde 100 $\mu\text{mol/l}$ einer Lösung von Glibenclamid zugefügt. Es kam zu einer Kontraktionsabnahme. Die Kontraktionskraft fiel auf $3,70 \pm 1,91$ mN. Nach der Zugabe von MAH4 HCl betrug die Kontraktionskraft $0,1 \pm 0$ mN, d.h. die Kontraktionskraft fiel noch weiter stark.

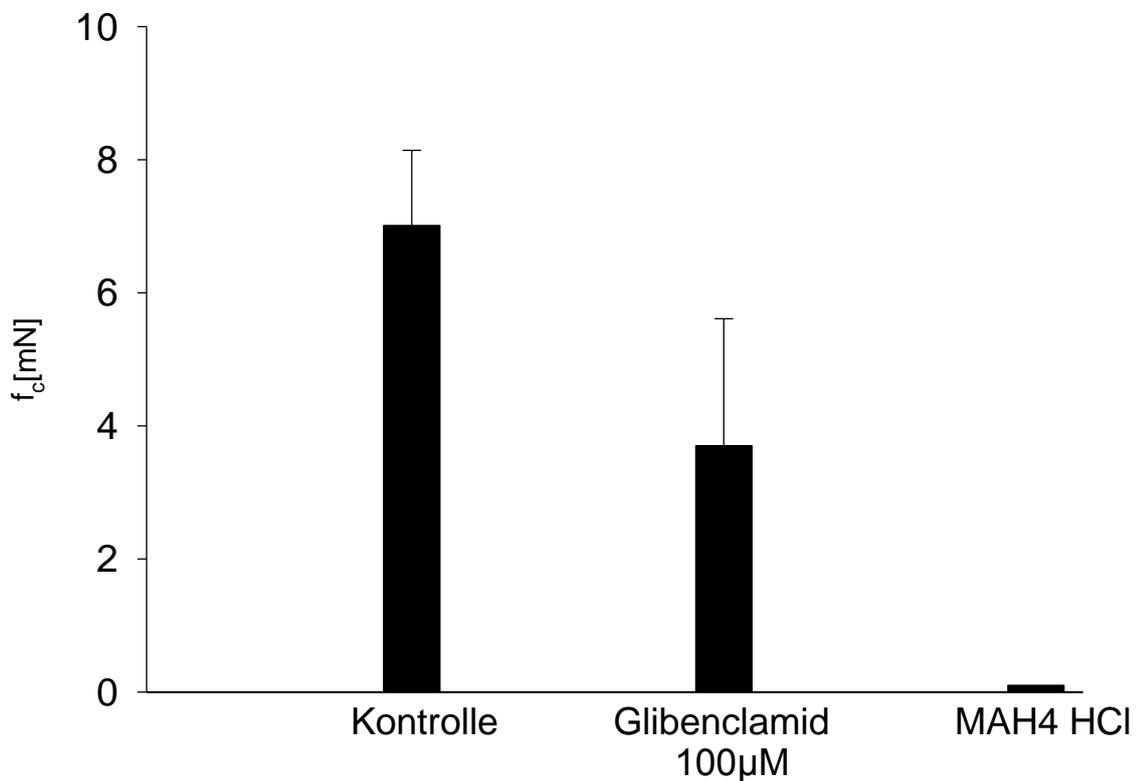
In der Tabelle 11 sind die arithmetischen Mittelwerte (f_c) in mN und deren Standardfehler (SEM) für die vorgeschriebene Konzentration angegeben.

Tabelle 11: Wirkung von MAH4 HCL in Kombination mit Glibenclamid auf den Darm

| Konzentration ($\mu\text{mol/l}$) | $f_c \pm \text{SEM}$ (mN) | Anzahl der Versuche n | Irrtumswahrscheinlichkeit p |
|---|---|--------------------------------------|--|
| Kontrolle | $7,01 \pm 1,13$ | 3 | - |
| 100 μM Glibenclamid | $3,70 \pm 1,91$ | 3 | - |
| + 15 μM MAH 4HCL | $0,1 \pm 0$ | 3 | 0,05 |

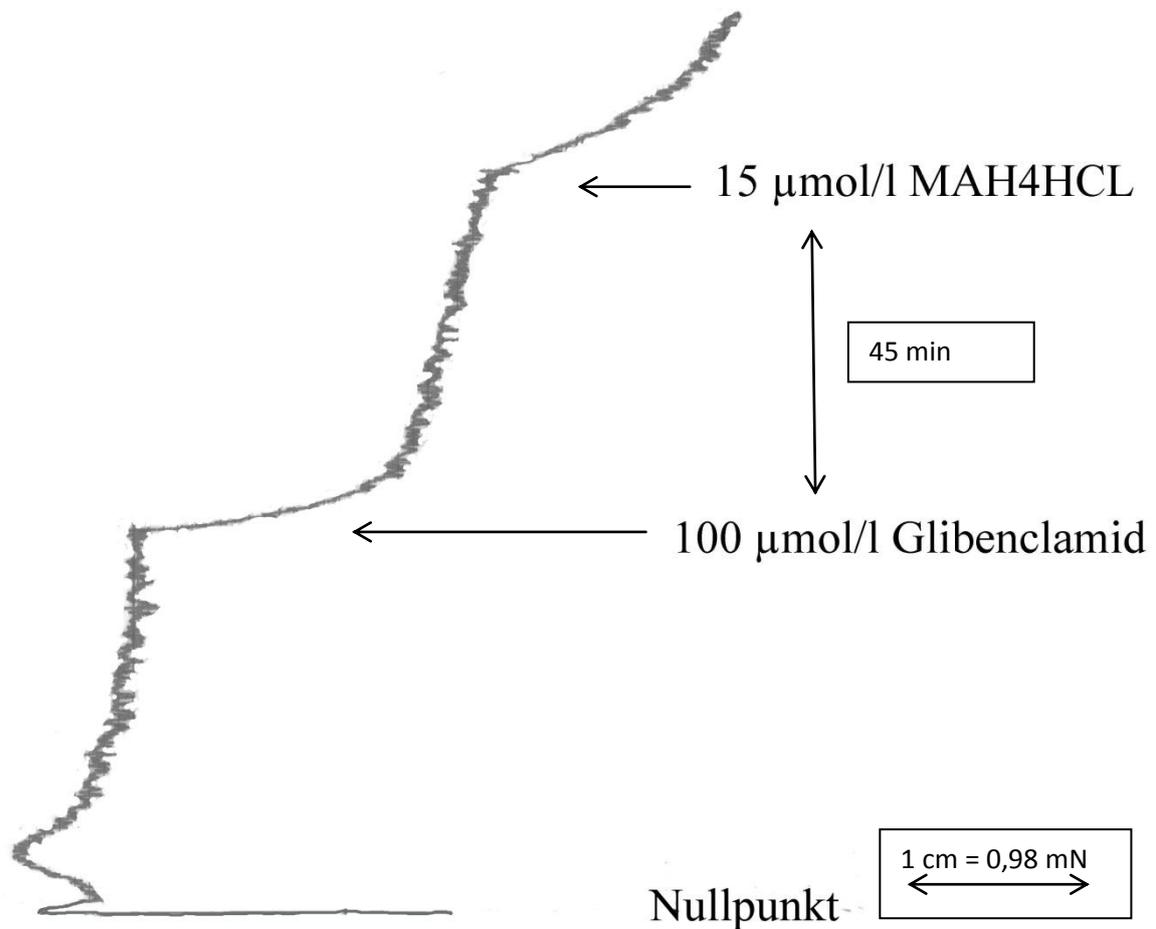
Diagramm 7: Graphische Darstellung der Wirkung von Glibenclamid und seine Wirkung in Kombination mit MAH4 HCl

**Terminales Ileum Glibenclamid
MAH4 HCl, 15 $\mu\text{mol/l}$
n=3**



In diesem Balkendiagramm konnten die Messwerte graphisch dargestellt werden. Die schwarzen Balken zeigen die Änderungen der Kontraktionskraft (f_c) in mN in Abhängigkeit von hinzugegebenen Substanzen bei der vorgegebenen Konzentration (100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid) und in Kombination von Antagonisten mit 15 $\mu\text{mol/l}$. Die dünnen Striche auf den schwarzen Balken zeigen die Größe des Standardfehlers.

Abbildung 21: Originalaufzeichnung der Wirkungskurve von MAH4 HCl in Kombination mit Glibenclamid



Die Pfeile zeigen die Einspritzzeiten bzw. den Zeitabstand. Die Wirkungskurve zeigt eine starke Abnahme der Kontraktionskraft der glatten Muskulatur bei der Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid. Durch die Zugabe von 15 $\mu\text{mol/l}$ MAH4 HCl kam es zu einer weiteren Spasmolyse.

5 Diskussion

In dieser Diplomarbeit wurde die Wirkung einer neu synthetisierten Substanz MAH4 HCl an den verschiedenen Organen von Meerschweinchen untersucht. Im Kapitel 4 sind die Versuchsergebnisse beschrieben. Da die Versuche an glattmuskulären Organen und der Herzmuskelpräparate durchgeführt wurden, wurde eine Gegenüberstellung der Daten aufgestellt und die Wirkung von MAH4 HCl auf diese Weise beurteilt.

Tabelle 12: Wirkung von MAH 4HCl auf die glatte Muskulatur

| Organpräparat | MAH4 HCl Kontraktionskraft f_c (%) ±SEM bei 100 $\mu\text{mol/l}$ | EC ₅₀ ($\mu\text{mol/l}$) |
|--------------------|--|--|
| Aorta | -50,30 ± 4,79 | 100 |
| Arteria pulmonalis | -63,45 ± 5,66 | 64,0 |
| Terminales Ileum | -100 ± 0 | 13,8 |

Diese Tabelle zeigt die unterschiedliche Wirkung von MAH4 HCl auf die glatte Muskulatur der jeweiligen Organe. Beim terminalen Ileum kam es schon in der Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ zur Abnahme der Kontraktionskraft, bei zunehmender Substanzkonzentration in der Organkammer nimmt die Kontraktionskraft weiter stark ab, wobei es bei 100 $\mu\text{mol/l}$ zur vollständigen Dilatation kam. Mit Hilfe einer graphischen Darstellung einer Konzentrations-Wirkungskurve konnte der EC₅₀-Wert von 13,8 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt werden. Damit hatte die Testsubstanz eine starke vasodilatierende Wirkung auf das Darmpräparat.

Die Aorta zeigt bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ erst eine zur Hälfte gesenkte Kontraktionskraft. Der EC₅₀-Wert war hier 100 $\mu\text{mol/l}$. Noch zeigt die Substanz eine dilatierende Wirkung auf die Arteria pulmonalis, bei der der EC₅₀-Wert 64,0 $\mu\text{mol/l}$ beträgt. In den ersten Konzentrationen 3 $\mu\text{mol/l}$ gab es eine geringe Dilatation, bei 10 $\mu\text{mol/l}$ konnte eine stärkere Abnahme von -11,35 ± 1,71 % bezogen auf den Kontrollwert erzielt werden. Bei den Konzentrationen von 100 $\mu\text{mol/l}$ kam es zu einer Abnahme der Kontraktionskraft von -63,45 ± 5,66 %. Der EC₅₀ Wert beträgt 64,0 $\mu\text{mol/l}$.

In Abhängigkeit dieser Ergebnisse wurde versucht den Wirkmechanismus der Substanz MAH4 HCl aufzuklären. Dafür wurden zwei verschiedene Antagonisten zur Verfügung gestellt, und je drei Versuche am Darm konnten durchgeführt werden. Nitro-L-Arginin ist ein Antagonist des NO-Systems, es wurde ein 100 $\mu\text{mol/l}$ von Nitro-L-Arginin in die

Organkammer hineingegeben, dadurch kam es zu einer sehr leichten Kontraktionsabnahme. Die Kontraktionsabnahme änderte sich von $11,43 \pm 0,85$ auf $10,10 \pm 1,20$ mN. Diese Abnahme war durch die Zugabe von $15 \mu\text{mol/l}$ MAH4 HCl eindeutig größer geworden, die Kontraktionskraft wurde von $10,10 \pm 1,20$ mN auf $96,73 \pm 1,99$ mN geändert. Die vasodilatierende Wirkung könnte eventuell teilweise durch eine NO Freisetzung erfolgen.

Der zweite Antagonist war Glibenclamid. Hier wurde auch $100 \mu\text{mol/l}$ des Antagonisten zugefügt und danach $25 \mu\text{mol/l}$ der Testsubstanz MAH4 HCl. Es soll untersucht werden, ob eine Wirkung der Testsubstanz durch die Öffnung der ATP abhängiger Kaliumkanäle vorkommt. Glibenclamid führte bei Versuchen zu einer deutlichen Dilatation des Darmpräparates. Die Kontraktionskraft war von $7,01 \pm 1,13$ mN auf $3,70 \pm 1,91$ mN geändert. Durch die Zugabe der Testsubstanz kam es zu einer weiteren Abnahme der Kontraktionskraft ($0,1 \pm 0$ mN).

Daher kann man sagen, dass die Wirkung von MAH4 HCl allerdings nur gering auf eine Öffnung der Kaliumkanäle zurückzuführen ist. Es wurde nachgewiesen, dass die Substanz wahrscheinlich noch weitere Wirkmechanismen besitzt.

Tabelle 13: Wirkung von MAH4 HCl auf die Herzmuskulatur

| Organpräparat | MAH4 HCl Kontraktionskraft f_c (%) \pm SEM bei $100 \mu\text{mol/l}$ | EC ₅₀ ($\mu\text{mol/l}$) |
|----------------|---|--|
| Rechter Vorhof | $-100,0 \pm 0,00$ | 49,0 |
| Papillarmuskel | $-94,92 \pm 1,58$ | 15,0 |

In dieser Tabelle sind die Ergebnisse der Versuche an den Herzmuskelpräparaten dargestellt. Man sieht sofort, dass die Wirkung der Testsubstanz auf die Herzpräparate stark ist. Als Ergebnis der Versuche kam die negativ chronotrope und negativ inotrope Wirkung auf die Herzmuskelpräparate heraus. Beim Papillarmuskel nahm die Kontraktionskraft schon bei $3 \mu\text{mol/l}$ ab. Bei einer Konzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ wurde die Abnahme zu einem Wert von $-40,46 \pm 5,70$ % erreicht. Schon bei $30 \mu\text{mol/l}$ war mehr als die Hälfte des Papillarmuskels vollständig erschlafft.

Bei Vorhofpräparaten nahm im Bereich der ersten drei Konzentrationen (3, 10, 30 $\mu\text{mol/l}$) die Schlagfrequenz immerzu ab. Bei der Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ setzte die Schlagfrequenz vollständig aus. Hier wurde eine negativ chronotrope Wirkung beobachtet. Bei allen vier Versuchspräparaten bleibt die autonome Aktivität bei 100 $\mu\text{mol/l}$ aus. Der Mittelwert aller drei Versuche in dieser Konzentration war $-100,00 \pm 0,00 \%$ bezogen auf den Kontrollwert. MAH4 HCl hat keine gewebespezifische Wirkung und wirkt auf alle Präparate.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Schwefelwasserstoff vasodilatierende Wirkung hat und diese Wirkung ist von einer physiologisch relevanten Konzentrationsmenge abhängig. Mehrere Forschungsergebnisse bewiesen, dass H_2S wie CO und NO ein intrinsischer, vasoaktiver und gasförmiger Faktor ist. Ein Unterschied zu beiden ist, dass die Vasodilatation von H_2S einem minimalen Endothel abhängigen Effekt darstellt und einen großen Einfluss auf die glatte Muskulatur besitzt. CO und NO wirken relaxierend durch 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 MAH4 HCl an isolierten Organen von Meerschweinchen überprüft.

Die Versuche wurden an den Organen mit glatter Muskulatur (Arteria pulmonalis, terminales Ileum und Aorta) und an den Herzmuskelpräparaten (Atrium cordis dexter und Musculus papillaris) durchgeführt. Durch die Ergebnisse wurden die genaue Wirkstärke der Testsubstanz und ihr Wirkmechanismus ermittelt.

Die Testsubstanz MAH4 HCl hatte eine stark negativ chronotrope Wirkung auf den rechten Vorhof. Der EC_{50} Wert war bei $49,0 \mu\text{mol/l}$. Bei allen vier Vorhofversuchen verlor der Vorhof bei der Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ seine autonome Aktivität. Bei den Papillarmuskelversuchen kam es auch zur starken Abnahme der Kontraktionskraft. Der EC_{50} Wert wurde bei $15,0 \mu\text{mol/l}$ erreicht.

Auch zeigte die Testsubstanz eine vasodilatierende bzw. spasmolytische Wirkung auf alle drei glattemuskulären Präparate. Der kleinste vasodilatierende Effekt war an der Aorta zu sehen, obwohl hier auch die Abnahme der Kontraktionskraft einen Wert von $-50,30 \pm 4,79$ erreicht. Bei der Lungenarterie ergab sich einen durchschnittlichen EC_{50} Wert von $64 \mu\text{mol/l}$. Auf den Darm war der stärkste Effekt der Testsubstanz, deshalb wurde der Wirkmechanismus mit zwei verschiedenen Antagonisten Nitro-L-Arginin und Glibenclamid auf dem Darm untersucht. Es wurde geprüft, ob die vasodilatierende Wirkung der MAH4 HCl durch das NO-System bzw. durch die Öffnung der ATP abhängiger Kaliumkanäle entsteht. MAH4 HCl hat keine gewebespezifische Wirkung und wirkt auf alle Präparate relaxierend.

Bei der Zersetzung der Testsubstanz MAH4 HCl wird möglicherweise Schwefelwasserstoff freigesetzt. H_2S hat eine relaxierende Wirkung auf die glatten Muskelzellen, was in *in vitro* Studien dargestellt ist. Aus den Versuchen mit den Antagonisten (NO-L-Arginin und Glibenclamid) konnte geschlossen werden, dass die Wirkung teilweise aufgrund dieser Mechanismen zustande kommt. An der vorkommenden Wirkung der Testsubstanz spielen wahrscheinlich noch andere Mechanismen eine Rolle.

7 *Literaturverzeichnis*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Manna PT, Smith AJ, Taneja TK, Howell GJ, Lippiat JD, Sivaprasadarao A (2010) Constitutive endocytic recycling and pkc mediated lysosomal degradation control Katp channel surface Density J Biol Chem 285:5963-5973
- Mutschler E, Geisslinger G, Heyo K, Kroemer K, Ruth P, Schärf-Korting M (2008) Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 9. Auflage Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- Mutschler E, Geisslinger G, Heyo K, Kroemer K, Ruth P, Schärf-Korting M (2001) Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 8. Auflage Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- Muzaffar S , Jeremy JY, Sparatore A, Del Soldato P, Angelini GD, Shukia N (2008) H₂S-donating sildenafil (ACS6) inhibits superoxide formation and gp91ptox expression in arterial endothelial cells: role of protein kinases A and G. Br J Pharmacol 155:984-994
- Netter FH (2003, 3. Auflage) Atlas der Anatomie des Menschen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Oberdiss E, Hackenthal E, Kuschinsky K (2001) Pharmakologie und Toxikologie. 3. Auflage, Springer Berlin
- Reiter M (1967) Die Wertbestimmung inotrop wirkender Arzneimittel am isolierten Papillarmuskel. Arneim Forsch 17: 1249 – 1253
- Smith RP, Gosselin RE (1979) Hydrogen sulfide poisoning J Occup Med 21:93-97
- Stipanuk MH, Beck PW (1992) Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. Biochem J 206:267-277
- Wang R (2002) Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter. Faseb J 16:1792-1798
- Wang YF, Mainali P, Tang CS, Shi L, Zhang CY, Yan H, Liu Xq, Du JB (2008) Effects of nitric oxide and hydrogen sulfide on the relaxation of pulmonary arteries in rats. Chin Med J 121:420-423
- Winder CV and Winder HO (1933) The seat of action of sulfide on pulmonary ventilation. Am J Physiol 105: 337 – 352

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

Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R (2001) The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *The EMBO Journal* Vol. 20 No. 21: PP 6008-6016.

8 Lebenslauf

Name: Özlem Çetinkaya

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 15.04.1981

Geburtsort: Erzincan/Türkei

Wohnort: 1110 Wien

Staatsangehörigkeit: Türkei

Ausbildung:

1998 Matura in Istanbul (Sarkuysan-Gymnasium)

1999-2000 Deutsch-Vorstudiumlehrgang in Wien

Seit 2000 Studium der Pharmazie in Wien

Berufliche Erfahrungen:

1996-1998 Baris Apotheke Istanbul

2001-2009 Anker Brot Mitarbeiterin in Wien

Seit 2004 Germania Apotheke, in Wien