



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Biologische Aktivität einer potenziell schwefelwasserstofffreisetzenden Substanz (MAH52.HCl) an isolierten Präparaten von *Cavia porcellus*“

Maximilian Rod

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreut von:

Ao. Univ.- Prof. Dr. Christian Studenik

Danksagung

Ich widme diese Diplomarbeit allen voran meiner Familie, die mich während meines gesamten Studiums sowohl moralisch als auch finanziell stets unterstützt hat

Ein besonderer Dank gilt auch Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Christian Studenik für seine stets rasche und kompetente Hilfe bei der Durchführung meiner Versuche.

Weiters danke ich dem Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie, insbesondere Herrn Mag. Michael Hintersteininger, für die Synthese und Bereitstellung meiner Testsubstanz MAH52.HCl.

Zudem möchte ich mich natürlich bei all meinen Freunden, die ich im Laufe meiner Studienzeit kennenlernen durfte, für die schöne Zeit bedanken.

Abschließend möchte ich auch meiner lieben Freundin danken, die immer für mich da ist.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Schwefelwasserstoff	1
1.2. Das Herz	3
1.2.1. Erregungsbildung und Erregungsweiterleitung.....	3
1.2.2. Aktionspotential	4
1.2.3. Ionenkanäle und Ionenströme	5
2. ZIELSETZUNG	7
3. MATERIAL UND METHODEN.....	8
3.1. Versuchstiere	8
3.2. Präparate	8
3.2.1. Isolierung und Präparation	8
3.2.2. Isolierung und Präparation der Aorta	9
3.2.3. Isolierung und Präparation der Arteria Pulmonalis	10
3.2.4. Isolierung und Präparation des rechten Vorhofs.....	10
3.2.5. Isolierung und Präparation der Papillarmuskeln	11
3.2.6. Isolierung und Präparation des terminalen Ileums	11
3.3. Tyrode (Physiologische Nährlösung)	12
3.4. Versuchsanordnung	13
3.4.1. Aufbau der Apparaturen	13
3.4.1.1. Versuchsanordnung 1	14
3.4.1.2. Versuchsanordnung 2	16
3.4.2. Der Kraftwandler.....	17
3.4.3. Gaszufuhr	18
3.4.4. Wasserbad.....	18
3.5. Durchführung der Versuche.....	18
3.5.1. Testsubstanz MAH52.HCl.....	18
3.5.2. Vorkontraktion	20
3.5.3. Ablauf an der Aorta descendens	20
3.5.4. Ablauf an der Pulmonalarterie.....	21
3.5.5. Ablauf am rechten Vorhof	21
3.5.6. Ablauf am Papillarmuskel	22
3.5.7. Ablauf am terminalen Ileum.....	23
3.5.8. Ablauf am terminalen Ileum unter Glibenclamid Einfluss.....	24
3.5.9. Verwendete Substanz zur Untersuchung des Wirkmechanismus – Glibenclamid	25
3.8. Auswertung der Versuchsreihen an den einzelnen Organen	26
3.8.1. Aorta, Arteria pulmonalis und terminales Ileum	26
3.8.2. Atrium dexter.....	26
3.8.3. Musculus papillaris	27
3.8.4. Statistik.....	27
4. ERGEBNISSE.....	29
4.1. Ergebnisse der Testsubstanz MAH52.HCl	29
4.1.1. Wirkung auf die Aorta descendens	29
4.1.2. Wirkung auf die Arteria pulmonalis	32
4.1.3. Wirkung auf den Atrium cordis dextrum.....	35
4.1.4. Wirkung auf den Musculus papillaris.....	38
4.1.5. Wirkung auf das terminale Ileum	41
4.2. Versuchsreihen zur Untersuchung des Wirkmechanismus von MAH52HCl auf das terminale Ileum.....	43

4.2.1. Einfluss von MAH52.HCl in Kombination mit 30µmol/l Glibenclamid.....	44
4.2.2. Einfluss von MAH52.HCl in Kombination mit 100µmol/l Glibenclamid.....	47
5. DISKUSSION	50
5.1. Wirkung von MAH52.HCl auf die glatte Muskulatur.....	50
5.1.1. Einfluss auf die Aorta.....	51
5.1.2. Einfluss auf die Arteria pulmonalis....	51
5.1.3. Einfluss auf das terminale Ileum	51
5.1.4. Einfluss von MAH52.HCl auf das terminale Ileum in Gegenwart von Glibenclamid	52
5.2. Einfluss auf die Herzmuskulatur	53
5.2.1. Einfluss auf den rechten Vorhof	54
5.2.2. Einfluss auf den Papillarmuskel	54
6.ZUSAMMENFASSUNG	55
7. LITERATURVERZEICHNIS	57
8. CURRICULUM VITAE.....	60

1. EINLEITUNG

1.1. Schwefelwasserstoff

Als Schwefelwasserstoff oder auch Dihydrogensulfid, Hydrogenium sulfuratum oder Sulfan wird die Vereinigung zweier Wassermoleküle mit einem Schwefelmolekül genannt (Hunnius 2004).

Es handelt sich dabei um ein farbloses, giftiges, brennbares und nach verdorbenen Eiern riechendes Gas, welches auch in größeren Mengen in Erdöl und Erdgas vorkommt (Holleman et al. 1995).

Schwefelwasserstoff ist eine schwache zweibasige Säure, die in wässriger Lösung zwei Reihen von Salzen ausbildet: Sulfide und Hydrogensulfide (Hunnius 2004).

Zudem ist es ein mittelstarkes Reduktionsmittel und verbrennt an der Luft mit blauer Flamme zu SO_2 und H_2O (Ehlers 2003).

Sein abstoßender Geruch kommt vom Abbau schwefelhaltiger Aminosäuren durch Bakterien. Er kann ab einer Konzentration von 500ppm nicht mehr olfaktorisch wahrgenommen werden, da es zu einer Desensitivierung der Geruchsrezeptoren kommt. (Weismann 2007). Dadurch können höhere, toxischere Dosen dann nicht mehr wahrgenommen werden. Vor allem der Atemtrakt und das Nervensystem sind bei einer Vergiftung mit Schwefelwasserstoff betroffen. Während geringe Dosen ($10\text{-}15\text{ml/m}^3$) zu Schwächeanfällen, Krämpfen, Reizerscheinungen im Atemtrakt bis hin zu einem Lungenödem führen können, ergeben sich bei höheren Konzentrationen (ab 500ml/m^3) Bewusstseinsverlust und Atemlähmung die binnen kürzester Zeit zum Tod führen. Bei chronischer Exposition kommt es zu Spätfolgen wie Pneumonie, Herzmuskelschäden sowie Schädigungen der Cornea (Aktories 2005).

Eine Vergiftung sollte schnellst möglich behandelt werden. Man verwendet hierbei Natriumnitrit oder 4-Dimethylaminophenol um Hämoglobin in Methämoglobin überzuführen. Ziel ist es dem Organismus rasch große Mengen an dreiwertigem Eisen zur Verfügung zu stellen (Lüllmann et al. 2010).

Die zusätzliche Gabe von Glukocorticoiden ist auf Grund der hohen Wahrscheinlichkeit für ein Lungenödem ebenso empfehlenswert (Vohr 2012).

Neben der Toxizität hat Schwefelwasserstoff im menschlichen Körper auch eine physiologische Bedeutung, wobei der genaue Mechanismus noch nicht geklärt ist. Es wird in den Endothelzellen der Blutgefäße und in glatten Muskelzellen aus der Aminosäure L-Cystein gebildet und fungiert ähnlich NO als Botenstoff mit vasodilatierender Wirkung.

Es kommt durch die Stimulierung von Acetylcholin-Rezeptoren zur Freisetzung von endogenem Schwefelwasserstoff, katalysiert durch die Enzyme Cystathionin- β -Synthase (CBS) und Cystathionin- γ -lyase (CGL). H₂S bewirkt die Öffnung ATP-abhängiger Kaliumkanäle in den glatten Muskelzellen der Gefäßmuskulatur. Dadurch kommt es zu einer Hyperpolarisation der glatten Muskulatur, was zu einer Vasodilatation führt (Aktories 2005).

In Studien wurde die vasodilatierende Wirkung von Schwefelwasserstoff auf das kardiovaskuläre System im Tierversuch bestätigt. Auch die relaxierende Wirkung auf Aorten in Folge einer Aktivierung ATP-sensitiver Kaliumkanäle wurde gezeigt (Zhao et al. 2001).

In einer anderen Studie konnte durch intravenöse Gabe von H₂S der Blutdruck von Ratten um bis zu 30mm Hg gesenkt werden (Hosoki et al. 2001).

Die Kaliumkanäle haben einen sehr komplexen Aufbau, die Gene Kir 6.1 und Kir 6.2 codieren dabei für den porenbildenden Teil. Ein Kaliumkanal besteht dabei aus 4 Kanalproteinen sowie 4 regulatorischen Untereinheiten. Diese werden auch als Sulfonylharnstoffrezeptoren bezeichnet, da Sulfonylharnstoffe in der Lage sind die Untereinheiten zu blockieren. Bindet ATP an die Kir-Untereinheit schließt sich der Kanal und öffnet erst wieder nach der Hydrolyse von ATP zu ADP. Es kommt zu einer Depolarisation der Membran. Sobald das Schwellenpotential erreicht wird öffnen sich spannungsabhängige Calciumkanäle wodurch ein Aktionspotential entsteht. In weiterer Folge wird Insulin freigesetzt weswegen dieses Prinzip auch bei der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 benutzt wird (Klebe 2009).

Auf Grund diverser Studien geht man jedoch davon aus, dass die Wirkung von Schwefelwasserstoff nicht nur auf der Öffnung ATP-abhängiger Kaliumkanäle beruht.

So zeigt eine Studie, dass die Wechselwirkung von verabreichtem Schwefelwasserstoff und endogenem NO kardioprotektiv auf Ratten mit metabolischem Syndrom wirken (Rong-na. 2011).

Eine weitere Studie befasste sich mit Therapiemöglichkeiten hypertensiver Ratten, welche zudem an diabetischer Nephropathie litten. Hier wurde den Tieren NaHS verabreicht, ein H₂S-Donor, wodurch sowohl der Blutdruck gesenkt als auch das Fortschreiten der Nephropathie gebremst werden konnte (Ahmad et al. 2012).

Obgleich die genaue Rolle des Gasotransmitters H₂S noch nicht geklärt wurde, konnten antiinflammatorische, antiapoptotische und antioxidative Wirkungen nachgewiesen werden (Lavu et al 2011).

An Herzinsuffizienz leidende Ratten wurden ebenfalls mit NaHS behandelt. Es zeigte sich, dass die Zufuhr von H₂S zu einer erhöhten Genexpression von Bcl2, sowie einer verringerten Expression von Bax und Caspase 3 führte. Weiters zeigten Gewebsumtersuchungen einen positiven Einfluss von Schwefelwasserstoff auf herzinsuffiziente Ratten, sowie auch eine Verringerung der apoptotischen Prozesse (Wang et al. 2011).

Weiters wurde gezeigt, dass die mit der Herzinsuffizienz oftmals einhergehende Entstehung einer kardialen Hypertrophie, ebenso wie auch die Entstehung einer Fibrose, durch die Gabe von H₂S verhindert werden kann (Huang et al. 2012).

1.2. Das Herz

Das Herz ist dafür verantwortlich das aus den Körperven und Lungenvenen zuströmende Blut in das arterielle System auszustoßen, wobei es Strömungswiderstände des Kreislaufs durch rhythmische Erschlaffung (=Diastole) und Kontraktion (=Systole) überwinden muss (Thews).

1.2.1. Erregungsbildung und Erregungsweiterleitung

Das Herz leitet Erregungen in Form von Aktionspotentialen weiter. Es unterliegt dabei einem Automatismus, der so genannten Autorhythmie. Verantwortlich dafür sind die Zellen des Sinus-Knoten, welche in bestimmten Intervallen spontan Erregungen bil-

den. Dieser Effekt kann an einem von Körper isolierten Herzen beobachtet werden, da dieses auch nach Trennung vom Körper weiterhin schlägt.

Der Sinus-Knoten ist 1-2 cm lang und besteht aus spezialisierten Muskelfasern. Von ihm geht die normale Erregung des Herzens aus, weswegen er quasi als „Schrittmacher“ des Herzens fungiert. Der Sinus Knoten befindet sich im rechten Vorhof, von wo sich die Erregung vom Vorhofmyokard zum AV-Knoten (Atrioventrikularknoten) ausbreitet. Anschließend wird es weiter über das His-Bündel, unterteilt in den rechten und den linken Kammerschenkel, über die Purkinje Fasern zum Arbeitsmyokard geleitet.

In Ruhe beträgt der Sinus-Rhythmus $60-80 \text{ min}^{-1}$. Sollte der Sinusknoten ausfallen übernimmt der AV-Knoten dessen Schrittmacherfunktion (Thews 1999).

1.2.2. Aktionspotential

Genauso wie bei Skelettmuskeln besteht auch bei den Herzmuskeln eine elektrische Spannung zwischen dem Zellinneren und dem Zelläußeren.

So weist die Myokardfaser in Ruhe ein Potential von ca. -90mV zwischen dem negativen Intrazellularraum und dem positiven Extrazellularraum auf. Während der Erregung steigt das Potential im Zellinneren an, es wird also positiver.

Ausgelöst wird das Aktionspotential durch eine lokale Depolarisation von zumindest 15mV . Sobald die Schwelle (bei Myokardfasern -70 bis -75 mV) überschritten wird, kommt es zu einem rasanten Anstieg des Potentials auf 30mV . Diese Phase wird auch Depolarisationsphase genannt. Auf diese folgt die Repolarisationsphase, welche aus einer längeren Plateauphase und einer schnellen Rückkehr zum Ruhepotential besteht. Abhängig von der Herzfrequenz dauert ein Aktionspotential zwischen 180 und 400 Millisekunden.

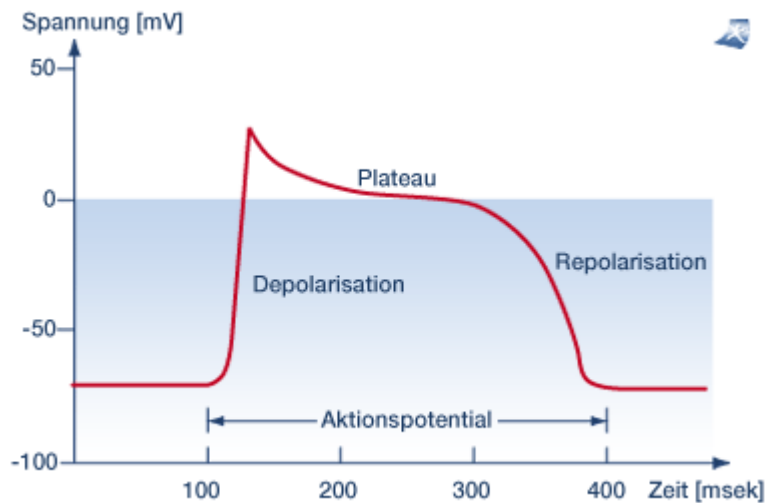


Abbildung 1: Aktionspotential des Herzens

Auf die Repolarisationsphase folgt die Refraktärzeit, welche sich in die absolute und die relative Refraktärzeit unterteilt. Diese hat den Sinn, dass es zu keinem neuerlichen Aktionspotential kommen kann bevor das vorhergehende beendet ist, sprich es kommt zu keiner weiteren Kontraktion. So werden in der absoluten Refraktärzeit auch sehr starke Reize unterbunden, während in der relativen Phase ein neuerliches Aktionspotential möglich ist, falls es zu einer stärkeren Depolarisation als normalerweise kommt. Dadurch schützt die Refraktärzeit das Herz vor Erregungskreisen und Re-entry-Tachykardien (Thews 1999).

1.2.3. Ionenkanäle und Ionenströme

Die Aktivität der Ionenkanäle kann während eines Aktionspotentials in 5 Phasen gegliedert werden:

Phase 0: Am Anfang eines Aktionspotentials öffnen sich spannungsabhängige Natrium-Kanäle. Dies geschieht sehr rasch und dauert nur kurz an. Werden Natrium-Kanäle gehemmt verlängert sich die Depolarisationsphase.

Phase 1: Die Natrium-Kanäle werden inaktiviert.

Phase 2: Durch die Depolarisation kommt es zur Öffnung von L-Typ Calcium-Kanälen was zur Plateauphase führt. Während dieser Plateauphase herrscht dabei ein Gleichgewicht zwischen repolarisierenden Kalium-Auswärtsströmen und depolarisierenden Calcium-Einwärtsströmen.

Phase 3: Die Calcium-Kanäle werden inaktiviert und die Kalium-Auswärtsströme erlangen die Oberhand. Diese Phase wird mit dem Erreichen des Ruhepotentials beendet.

Phase 4: Es kommt bis zur nächsten Depolarisation zu keinen weiteren Potentialänderungen durch einen Einstrom von Kalium Ionen (Aktories 2005).

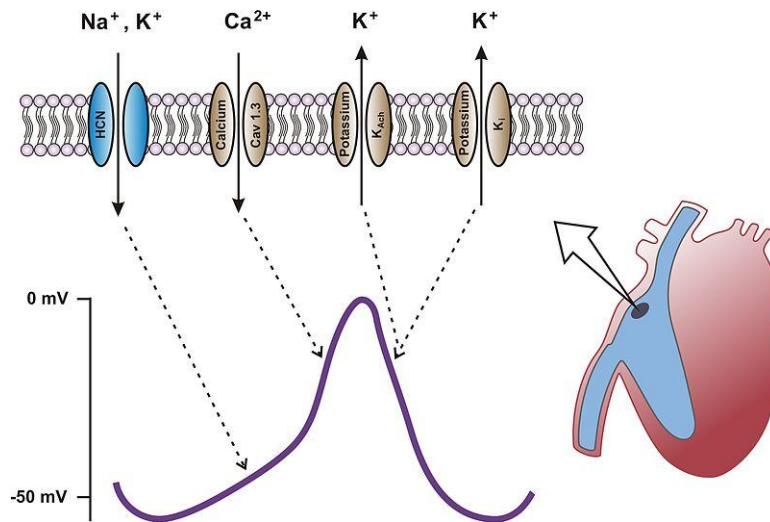


Abbildung 2: Ionenaktivität während eines Aktionspotentials

2. ZIELSETZUNG

Das Ziel meiner Diplomarbeit war es die im Department für Medizinisch Pharmazeutische Chemie neu synthetisierte Substanz MAH52.HCl an isolierten Organen von Meerschweinchen auf ihre biologische Aktivität zu testen.

Genauer beschäftigte sie sich einerseits mit deren Einfluss auf die glatte Muskulatur von Aorta und Arteria pulmonalis. Hier wurde versucht eine Vasodilatation nachzuweisen. Am terminalen Ileum wurde auf eine spasmolytische Wirkung abgezielt.

Weiters wurde sie auch auf eine positiv bzw. negativ inotrope Wirkung am quergestreiften Muskel papillaris, sowie auf eine positiv bzw. negativ chronotrope Wirkung am ebenso quergestreiften Atrium cordis dextrum untersucht.

Mittels Konzentrations-Wirkungskurven wurden die Versuche graphisch dargestellt und daraus die EC_{50} -Werte ermittelt. Mit Hilfe der Werte wurde jenes Organ an dem es zur stärksten Wirkung kam, das heißt mit der niedrigsten EC_{50} , ausgewählt und durch Zugabe eines Antagonisten (Glibenclamid) der Wirkmechanismus genauer untersucht.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden ausschließlich die Organe von Meerschweinchen des „TRIK“-Stammes verwendet. Genauer wurden 5 verschiedene Organe männlicher und weiblicher Tiere mit einem Gewicht zwischen 250 und 600 Gramm herangezogen. Folglich handelte es sich um äußerst junge Tiere. Dies war für einen reibungslosen Versuchsablauf essentiell.

Bei den isolierten Organen handelte es sich um den rechten Vorhof (Atrium cordis dextrum) und den Papillarmuskel des Herzens (musculus papillaris), sowie die Arteria pulmonalis, das terminale Ileum und die Aorta.

Der Grund warum man die Versuche an Meerschweinchen durchgeführt hat ist jener, dass deren Ionenkanälen den menschlichen am ähnlichsten sind.

3.2. Präparate

3.2.1. Isolierung und Präparation

Zunächst wurde das Meerschweinchen durch einen raschen, präzisen Genickschlag getötet. Danach wurde der Thorax mit Hilfe einer Schere geöffnet und möglichst schnell das noch schlagende Herz, das terminale Ileum und die thorakale Aorta entnommen. Diese wurden sofort in separate Behältnisse mit zuvor hergestellter physiologischer Nährlösung überführt.

Weiters wurden die Organe in der Nährlösung so schnell wie möglich mit einem Gasgemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Stickstoff begast um so ein Absterben der Organe zu verhindern.

Zur Präparation sind die Organe in eine mit Kork ausgelegte sowie mit Nährlösung gefüllten Petrischale übergeführt worden. Die Präparation an sich erfolgte unter dem Lichtmikroskop aufgrund der geringen Größe der Organe.

Der Kork hatte den Vorteil, dass die Organe zur weiteren Bearbeitung mit Hilfe von Präpariernadeln fixiert werden konnten. Zudem wurde der Kork an sich mit einem Gummiring beschwert, was einen Auftrieb des Korks verhinderte.

Weiters wurden zur Präparation Spitzscheren, Federscheren, Pinzetten und Pasteurpipetten verwendet.

Sämtliche Organe wurden auch nach erfolgter Präparation in begaster physiologischer Nährlösung aufbewahrt.



Abbildung 3: Lichtmikroskop und Präparierbesteck

3.2.2. Isolierung und Präparation der Aorta

Es wurde hier nicht der Aortenbogen, sondern die am Rückgrat entlang laufende thorakale Aorta benutzt. Hierzu musste, nach Aufschneiden des Thorax, die Wirbelsäule stark nach vorn gedrückt werden um die Aorta gut erreichen zu können. Danach wurde diese mit Hilfe von Pinzette und Spitzschere vorsichtig vom Rückgrat abgetrennt. Ein ca. 3 cm langes Stück wurde dann in ein mit Nährlösung gefülltes Gefäß übergeführt.

Die eigentliche Präparation der Aorta wurde anschließend unter dem Lichtmikroskop durchgeführt. Dazu wurde die Aorta innerhalb einer Petrischale (s.o.) die erneut mit Nährlösung gefüllt war, mit Hilfe zweier Präpariernadeln fixiert. Nun wurde das überschüssige, die Aorta umgebende, Fettgewebe mit Pinzette und Federschere entfernt. Hierbei war es wichtig, dass die Aorta nicht durch etwaige Einschnitte verletzt wurde.

Danach wurde die Aorta in ungefähr gleich dicke Ringe (ca. 2mm) geschnitten. Diese wurden direkt in die Versuchsanordnung 1 eingehängt bzw. erneut in Nährlösung unter Begasung aufbewahrt.

3.2.3. Isolierung und Präparation der Arteria pulmonalis

Die Arteria pulmonalis musste zunächst mit einer Federschere von Überresten an Lungengewebe, Fett und Perikard befreit werden. Dies geschah unter dem Mikroskop. Danach konnte man sie abschneiden. Dabei war es wichtig sie möglichst nahe am Herzen abzutrennen, da nur der kleine Teil bis zur Trennung in linke und rechte Arterie verwendet werden konnte.

Die weiterführende Präparation war hier ähnlich jener der Aorta. Auch die Arteria pulmonalis wurde mit Hilfe von Präpariernadeln in einer Petrischale fixiert. Hier wurden die letzten Reste an Fett- und Muskelgewebe entfernt.

Ähnlich der Aorta wurde auch die Arterie in 3-4 mm dicke Ringe zerschnitten, welche dann ohne weitere Hilfsmittel in die Versuchsanordnung 1 eingehängt werden konnten.

3.2.4. Isolierung und Präparation des rechten Vorhofs

Das gesamte Herz wurde zunächst aus dem Thorax entnommen und sogleich von überschüssigem Blut gereinigt. Anschließend wurde es in einer weiteren Petrischale mit 2 Nadeln, eine in der Basis und eine an der Spitze, fixiert. Das Perikard und überschüssiges Fett- sowie Lungengewebe wurden hierauf entfernt.

Um den Vorhof von der Kammer zu trennen wurde entlang des Sulcus coronarius geschnitten, um so auch den rechten Vorhof vom rechten Ventrikel zu trennen.

Dieser Vorgang war mit äußerster Vorsicht durchzuführen um den Sinusknoten nicht zu verletzen, da dieser ja als primärer Schrittmacher des Herzens für die Chronotropie und somit für die folgende Versuchsdurchführung nötig war. Dass der Sinusknoten während der gesamten Zeit weiterschlug erschwerte die Aufgabe erheblich.

Anschließend wurde mit einem Bindfaden ein Silberhäkchen an der Spitze des Sinusknoten und eines am Herzohr angebracht. Diese Häkchen waren nötig um den Vorhof in der Versuchsanordnung 1 einzuhängen.

3.2.5. Isolierung und Präparation der Papillarmuskeln

Nachdem der rechte Vorhof entfernt wurde, wurde das rechte Ventrikel entlang des Septums bis zur Herzspitze aufgeschnitten, aufgeklappt und mit Nadeln fixiert. Dadurch waren die Papillarmuskeln nun sichtbar.

Um die folgenden Versuche nicht durch die Spontanaktivität der Purkinje-Fasern zu verfälschen mussten diese nun sorgfältig entfernt werden.

Danach wurde auch hier ein Silberhäkchen mit einem Bindfaden an den Ansatz des Papillarmuskels befestigt. Die Sehne wurde zudem durchtrennt und der Muskel sehr vorsichtig herausgeschnitten um ihn nicht zu überdehnen.

Die fertig präparierten Papillarmuskeln wurden hierauf in Versuchsanordnung 2 eingespannt bzw. bis zu ihrem Einsatz in begaster Nährlösung aufbewahrt.

3.2.6. Isolierung und Präparation des terminalen Ileums

Das terminale Ileum liegt kurz vor dem so genannten Caecum. Zunächst wurde die Bauchdecke mit einer Präparierschere aufgeschnitten. Ein ca. 20 cm langes Stück des Dünndarms wurde herausgezogen, wobei hier das Mesenterium immer wieder eingeschnitten werden musste um dies zu ermöglichen.

Am jejunalen Ende wurde der Darm mit einem Bindfaden abgebunden und am caecalen Ende wurde er schließlich abgeschnitten. Das isolierte Organ wurde wiederum in ein Gefäß mit Nährlösung eingebracht und begast.

Zur Präparation wurde ein ca. 1 cm langes Stück vom caecalen Ende schräg abgeschnitten und in einer Petrischale unter das Lichtmikroskop gebracht. Dort wurde es zunächst an beiden Enden mit Präpariernadeln fixiert um es dann mit einer Pasteurpipette durchspülen zu können. Dadurch wurden etwaige Chymusreste entfernt.

Nach der Reinigung des Darms wurden an beiden Enden wiederum Silberhäkchen mit Hilfe von Bindfäden angebracht. Hierbei war darauf zu achten, dass eine ausreichend große Darmöffnung an beiden Enden erhalten blieb, weshalb auch schräg abgeschnitten wurde. Keines der beiden Enden durfte durch die Fäden abgebunden werden damit die Testsubstanz im Stande war von beiden Seiten den Darm zu durchströmen.

Der fertig präparierte Darm wurde erneut in Apparatur 1 eingespannt, der übrige Darm weiterhin in der Nährlösung begast.

3.3. Tyrode (Physiologische Nährlösung)

Tabelle 1: Zusammensetzung der Tyrode

Substanz	Molare Masse	Stocklösung	ml/Stocklösung/l Tyrode	Mmol/l
NaCl	58,44g/mol	1000,25g/5l	33,60	114,90
KCl	74,55g/mol	50,33g/5l	35,00	4,73
NaHCO ₃	84,01g/mol	125,00/5l	83,70	24,90
CaCl ₂	110,98g/mol	147,02g/5l	3,20	3,20
MgSO ₄	120,37g/mol	62,00g/250ml	1,18	1,18
KH ₂ PO ₄	136,09g/mol	34,00g/250ml	1,18	1,18
Glucose	180,16g/mol	Reinsubstanz	1,98	10

Tabelle 2: Zusammensetzung für 2 Liter Tyrode

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

Bei der Nährlösung handelt es sich um eine abgewandelte Form der Krebs-Henseleit-Lösung die nach der Vorschrift von Reiter (1967) hergestellt wurde. Sie wurde jeden Tag frisch zubereitet.

Hierzu wurden zunächst alle Bestandteile aus Tabelle 1, außer CaCl₂, in den jeweiligen vorgeschriebenen Mengen in einem 2l-Messkolben zusammengemischt. An-

schließlich wurde mit Aqua bidestillata auf ca. drei Viertel des Volumens aufgefüllt. Durch gründliches Schütteln wurden die einzelnen Bestandteile im Kolben gründlich vermischt.

Danach wurde die Lösung für 20 Minuten mit Oxymix begast. Bei Oxymix/Carbogen handelt es sich um ein Gasgemisch welches aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid besteht. Es hat den Zweck die Lösung mit Sauerstoff zu sättigen um somit einen konstanten pH-Wert von 7,2-7,4 zu gewährleisten.

Nach der 20-minütigen Begasung wurde das CaCl_2 mit Hilfe einer Pipette tropfenweise und langsam zugegeben. Bei zu schneller Zugabe könnte das schwerlösliche Calciumsalz ausfallen. Dies wiederum würde zu einer Trübung der Nährlösung führen, wodurch diese für die weiteren Versuche nicht mehr zu gebrauchen wäre.

Abschließend wurde der Messkolben mit Aqua bidestillata bis zur 2-Liter Markierung aufgefüllt. Die fertige Lösung wurde nun für den Versuchstag aufbewahrt und für sämtliche Organe verwendet.

3.4. Versuchsanordnung

3.4.1. Aufbau der Apparaturen

Für eine reibungslose und vor allem vergleichbare Versuchsreihe war es essentiell möglichst physiologische Bedingungen zu gewährleisten. Dies bezog sich vor allem auf geregelte Temperatur, eingestellten pH-Wert und einheitliche Sauerstoffkonzentration.

In den Versuchen kamen zwei verschiedene Apparaturen zum Einsatz, die prinzipiell gleich funktionieren. Der Unterschied lag im Aufbau sowie im Fixierungsschema.

Während Apparatur 1 für die Aorta, Atrium cordis dextrum, Arteria pulmonalis und das terminale Ileum verwendet wurde, kam Apparatur 2 nur für den Musculus papillaris zum Einsatz.

Beide Geräte verfügten dabei eine Gaszufuhr die die Sauerstoffkonzentration während der Versuche aufrecht erhalten hat. Zusätzlich waren beide Apparaturen mit einem beheizbaren Wasserbad verbunden. Dieses ermöglichte eine konstante physiologische Temperatur des Organbades von $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Bei den Versuchen mit den Vorhöfen und Papillarmuskeln wurde die Temperatur niedriger gehalten. Hier lag sie bei $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Eine weitere Gemeinsamkeit stellte ein Kraftwandler dar.

3.4.1.1. Versuchsaapparatur 1

In Abbildung 4 zeigt sich der Aufbau der Apparatur im Detail. Zu aller erst wurde vor jedem Versuch das Organbad mit Hilfe von Salzsäure gereinigt und anschließend noch gründlich mit Aqua bidestillata durchgespült. Dann wurde es mit 25 ml Tyrode befüllt.

Beim Organbad handelt es sich um ein doppelwandiges Glasgefäß, wobei das im Zwischenraum zirkulierende Wasser die Temperatur der Tyrode konstant hält. Dazu liegt ein Wasserbad vor, welches durch Zu- und Ablauf das Organbad mit temperiertem Wasser versorgt. Neben der Wasserzufuhr findet sich auch eine Gaszufuhr (Oxymix) die direkt in das Organbad geleitet wird.

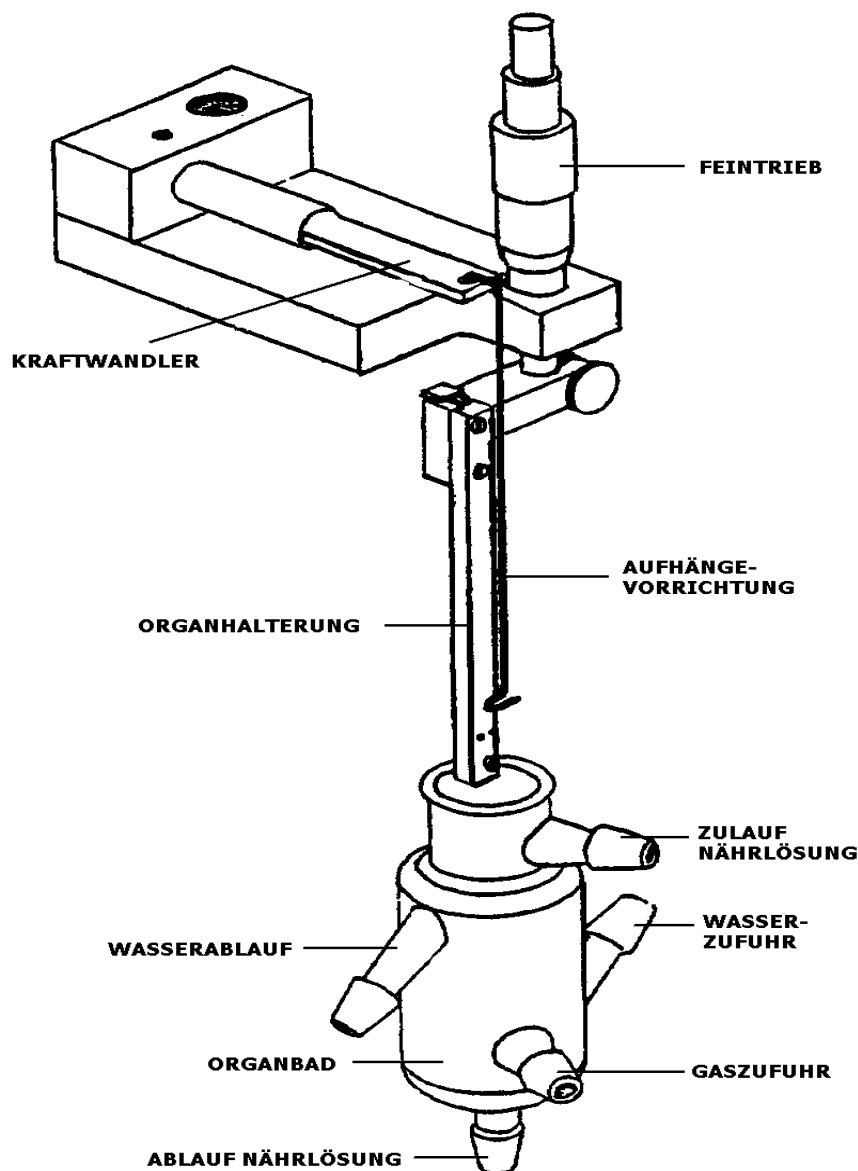


Abbildung 4: Skizze Apparatur 1

Nachdem die Tyrode mit Sauerstoff versorgt war, konnten die Organe eingehängt werden. Dies geschah entweder durch ihre zuvor angebrachten Häkchen oder im Fall von Aorta und Pulmonalarterie direkt durch das ringförmige Gewebe. Die Organe wurden an der einen Seite an die Aufhänge-Vorrichtung angehängt und im unteren Bereich an ein fest montiertes Drahtstückchen fixiert.

Oberhalb der Aufhänge-Vorrichtung befinden sich Grob- und Feintrieb. Das Organ wurde zunächst mit dem Grobtrieb vorgespannt, ehe es durch den Feintrieb maximal vorgespannt wurde. Dieser ermöglichte zudem eine einheitliche und somit vergleichbare Ausgangsspannung bei sämtlichen Versuchen.

Nun wurde das Organ für 20 Minuten in der Tyrode belassen, damit es sich aklimatisieren und beruhigen konnte. Darauf folgte ein rascher Austausch der Flüssigkeit. Die Nährlösung wurde über den mit einer Klemme verschlossenen Ablauf abgelassen und sogleich, nach erneutem Verschließen der Klemme, 25 ml einer zuvor aus Tyrode zubereiteten Kaliumchlorid-Lösung ins Organbad eingebracht. Dadurch kam es zu einer Reizung des Organs.

Nach diesem Vorgang sollte das Organ nun eine mechanische Kontraktion aufweisen, welche durch den Amplifier wiederum in ein elektrisches Signal umgewandelt wurde. Dieses Signal wurde durch den Schreiber auf Millimeterpapier erfasst.

3.4.1.2. Versuchsanordnung 2

In Abbildung 5 zeigt sich, dass diese Apparatur der Apparatur 1 in den grundlegenden Elementen sehr ähnlich ist, es gibt allerdings auch diverse Unterschiede.

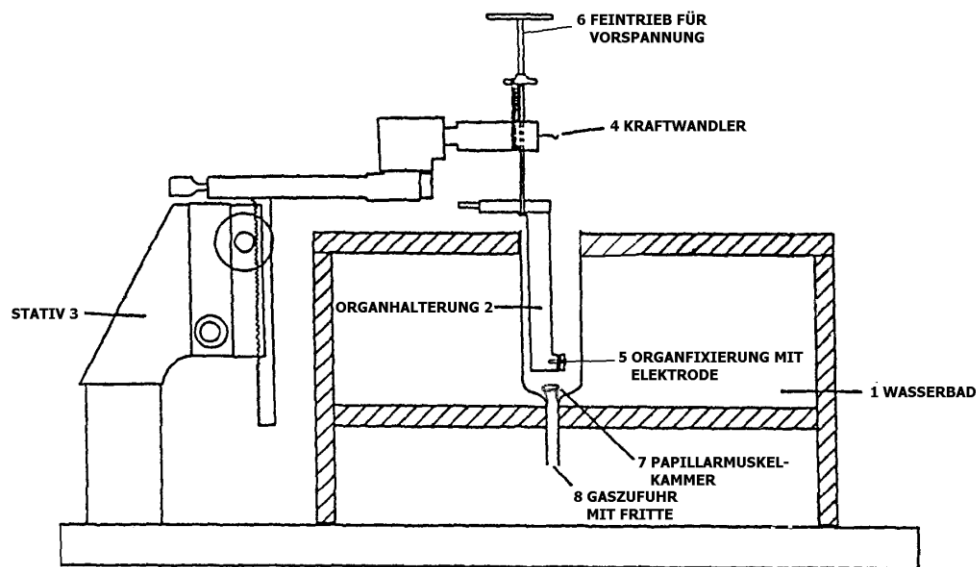


Abbildung 5: Skizze Apparatur 2

Auch hier wird vor Beginn des Versuchs das Organbad mit Salzsäure und Aqua bidestillata gereinigt und mit 25ml Tyrode aufgefüllt.

Das Organbad ist hier jedoch in den Deckel des beheizten Wasserbads eingebaut, wodurch es von dort aus direkt beheizt wird. Auch die Gaszufuhr unterscheidet sich gegenüber der Apparatur 1. So wird das Gas hier über eine Glasfritte im Boden des Organbads in die Tyrode geleitet.

Was hier fehlt ist eine Ablassvorrichtung. Folglich musste die Tyrode, ebenso wie Waschflüssigkeiten, immer mit Hilfe einer Plastikspritze samt Gummischlauch aus dem Organbad entfernt werden.

Die Organ-Halterung besteht aus Kunststoff und ist mit einem Stativschlitten an dem Stativ befestigt. Die Aufhänge-Vorrichtung ist auch bei dieser Apparatur ein Draht, an welchem die Papillarmuskel über ihre Häkchen angehängt werden. Das frei hängen-

de Ende des Papillarmuskels wurde zwischen einem Plastikplättchen und einer Platin-kathode festgeklemmt, sowie über einen Schraubmechanismus vorsichtig fixiert. Hier musste darauf geachtet werden, das Organ weder zu überdehnen noch zu zerquetschen.

Auch hier musste möglichst schnell gearbeitet werden, um zu verhindern, dass das Organ sich zu lange außerhalb der Nährlösung befindet.

Für den Papillarmuskel wurde deshalb eine andere Apparatur verwendet, weil er von selbst nicht in der Lage ist zu schlagen. Deshalb befindet sich an dieser Apparatur eine Elektrode, welche im Stande ist den Muskel zu reizen.

Die maximale Kontraktionskraft wurde auch hier wieder durch Anlegen einer Vorspannung erreicht, welche wiederum durch den Feintrieb ermöglicht wurde. Die Kontraktion wurde über einen Schreiber auf Millimeterpapier dokumentiert.

3.4.2. Der Kraftwandler

Der Kraftwandler dient dazu, die mechanischen Signale in elektrische überzuführen. Dies ermöglicht ein Dehnungsmessstreifen welcher auf die mechanischen Kontraktionen reagiert.

In unseren Versuchen haben wir einen Widerstandswandler (Typ AE875, Firma Aksjeselskapet, Horton, Norwegen) als Kraftwandler verwendet. Kontraktionsänderungen wurden in elektrische Signale umgewandelt und über einen Amplifier (Firma World Precision Instruments) verstärkt, sowie über einen Schreiber (Flatbed Recorder der Firma Kipp & Zonen) auf Millimeterpapier festgehalten.

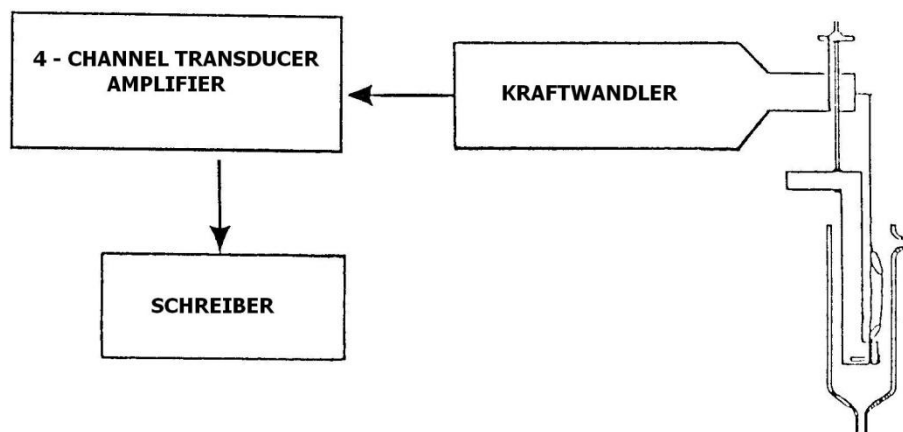


Abbildung 6: Skizze Kraftwandler

3.4.3. Gaszufuhr

Die Organe mussten während den Versuchen, wie bereits erwähnt, durchgehend mit dem Sauerstoffgemisch Oxymix begast werden. Dies diente einerseits einem konstanten pH-Wert innerhalb des Gewebes, andererseits wurde dadurch auch die Testsubstanz gleichmäßig im Organbad verteilt.

Dabei leiteten Schläuche das Gas in die verwendeten Apparaturen. Eine grobe Regelung erfolgte zunächst anhand eines Ventils. An den Apparaturen selbst befanden sich zusätzlich Glasfritten, mit welchen eine feinere Regelung der Gaszufuhr möglich war.

3.4.4. Wasserbad

Neben der Versorgung war auch eine den physiologischen Bedingungen entsprechende Temperatur erforderlich, welche mit Hilfe eines Wasserbads gewährleistet wurde. Wie bereits erwähnt war die Temperatur bei Versuchen mit dem terminalen Ileum, der Aorta, der Pulmonalarterie und dem Vorhof auf $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ eingestellt, im Falle des Pappilarmuskels auf $35^{\circ}\text{C} \pm 1$.

3.5. Durchführung der Versuche

3.5.1. Testsubstanz MAH52.HCl

Unter der Leitung von Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker am Departement für Medizinische/pharmazeutische Chemie an der Universität Wien, wurde die Substanz MAH52.HCl synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

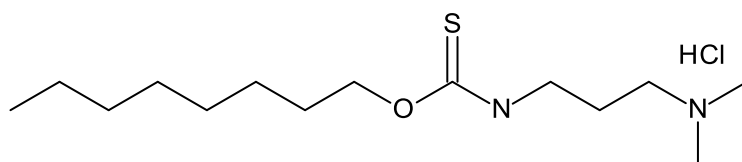


Abbildung 7: Struktur der Testsubstanz

Nomenklatur: 3-(Dimethylamino)propylamino-octyloxy-methanthioat Hydrochlorid

Molekulargewicht: 310,9 g/mol

Tabelle 3: Stammlösungen

Stammlösung	Molare Masse (g/mol)	Volumen Organ- bad (ml)	Einwaage Sub- stanz (100µmol/l)
MAH52.HCl	310,9	8	0,25 mg
MAH52.HCl	310,9	25	0,78 mg

Der Versuchsanordnung entsprechend wurde die Substanz vor Beginn der Versuche in Lösung gebracht. MAH52.HCl war in Aqua bidestillata löslich.

Dabei wurde zunächst eine Stammlösung hergestellt, indem die Substanz in 100 µl Aqua bidestillata gelöst wurde.

Entsprechend dem Volumen der Organbäder, sowie des Molekulargewichts der Substanz, wurde die jeweilige Einwaage ermittelt (siehe Tabelle 3).

Die Stammlösung wurde in 4 Schritten à 3µl, 7µl, 20µl und 70µl dem Testorgan zugeführt. Die einzelnen Konzentrationen wurden dabei in einem Abstand von je 45 Minuten hinzupipetiert. Die Zeit war so gewählt, dass sich ein Fließgleichgewicht (steady-state) einstellen konnte.

Sämtliche Stammlösungen wurden stets frisch zubereitet, vom Vortag übrig gebliebene fanden keine Verwendung mehr und wurden entsorgt.

Der Zufuhr von gelöster Testsubstanz ging eine Kontrollphase voraus. In dieser sollte sich das entsprechende Organ an die neue Umwelt gewöhnen. Dabei war bei Aorta, Pulmonalarterie und Darm wichtig, dass diese maximal kontrahiert waren (siehe Kap. 3.5.2.). Der Papillarmuskel musste konstant sein, die Herzfrequenz beim Vorhof musste ebenfalls regelmäßig sein.

Bei sämtlichen Versuchen musste sehr gewissenhaft gearbeitet werden, da bereits kleinste Störungen, wie das Berühren eines der Silberdrähte, zu einer Verfälschung der Aufzeichnung führen konnte.

Tabelle 4: Pipettierschema

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

3.5.2. Vorkontraktion

Aorta, Pulmonalarterie und Darm, also alle Organe mit glatter Muskulatur, wurden mit einer Kaliumchlorid Lösung chemisch gereizt, was zu einer Kontraktion der Organe führte. Die Kontraktion war essentiell um eine eventuell durch die Substanz herbeigeführte Vasodilatation registrieren zu können.

Dabei wurden täglich eine 60 mmolare Kalium-Lösung für den Darm und eine 90 mmolare Lösung für Aorta und Pulmonalarterie frisch hergestellt. Die jeweiligen Werte wurden experimentell ermittelt. Es sind jene Konzentrationen die zu einer maximalen Kontraktion an glatter Muskulatur führen.

Zur Herstellung der Kalium-Lösung für den Darm wurden 0,45 g Kaliumchlorid in einem 100 ml Messkolben eingewogen und mit Tyrode gelöst sowie bis zur Markierung aufgefüllt. Die für die beiden anderen Organe verwendete Lösung beinhaltete 0,67 g Kaliumchlorid in 100 ml Tyrode.

3.5.3. Ablauf an der Aorta descendens

Zunächst wurde die Aorta wie in Kapitel 3.2.2. isoliert und präpariert, wobei sie in ringförmige Stücke geschnitten wurde. Diese Form ermöglichte es, die Aorta-Stücke direkt und ohne weitere Hilfsmittel an den Silberdrähten in die Versuchs-Apparatur 1 einzuhängen. Wichtig war es das Gewebe anfangs noch nicht zu spannen.

Sobald das Organ in die Apparatur eingehängt war wurde es in das Organbad abgesenkt. Daraufhin wurden der Verstärker und der Schreiber zugeschaltet und Nullpunkteinstellung am Flachbrettschreiber vorgenommen. Erst jetzt wurde bei 10mV und einem Speed von 1mm/min eine Vorspannung von 19,6 mN angelegt.

Das Organ wurde nun 20 Minuten ruhen gelassen, damit es sich entspannen konnte. Danach wurde auf 5 mV umgestellt, was einer Kraft von 9,81 mN entsprach. Der somit wieder verschobene Schreiber wurde erneut zum Nullpunkt korrigiert und anschließend abgesenkt wodurch die Aufzeichnung beginnen konnte.

Im Folgenden musste rasch die Nährlösung über den entsprechenden Ablassschlauch abgelassen und durch eine genaue Menge von 25 ml bzw. 8 ml KCl-Lösung (90 mmolar) ersetzt werden. Dies führte zu einer Kontraktion der Aorta, welche mit der Zeit eine Plateauphase ausbildete. Hierfür wurde mindestens 45 Minuten gewartet.

Wichtig für ein Fortführen der Versuche war das Erreichen dieser Plateauphase, erst dann konnte mit der schrittweisen Zugabe an Substanz-Lösung begonnen werden (Schema siehe Tabelle 4). Die Plateauphase war gleichbedeutend mit der maximalen Kontraktionskraft des entsprechenden Organs und diente somit als Referenz für die vasodilatierende Wirkung von MAH52.HCl.

3.5.4. Ablauf an der Pulmonalarterie

Das Vorgehen bei der Pulmonalarterie entsprach im Ablauf genau jenem der Aorta. Einzig das Anlegen einer Vorspannung unterschied sich. So wurde hier die Vorspannung bereits anfänglich auf 9,81 mN bei 5 mV angelegt. Auch an der Pulmonalarterie war es das Ziel eine Vasodilatation nachzuweisen.

3.5.5. Ablauf am rechten Vorhof

Nach der im Kapitel 3.2.4. beschriebenen Präparation wurde der Vorhof zunächst über seine Silberhäkchen in die Apparatur 1 eingespannt und sogleich in die Nährstofflösung eingeführt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass der Vorhof korrekt, das heißt die Position im Meerschweinchen nachahmend, eingehängt wurde. Weiters war hier ein besonders vorsichtiges und schnelles Arbeiten von Nöten um eine fortwährende Spontanaktivität der Sinuszellen gewährleisten zu können. Auch eine Überdehnung musste vermieden werden. Der Vorhof sollte sich zudem nur möglichst kurz außerhalb der Tyrode befinden, welche bereits vor Einführen des Vorhofs mit Oxymix begast wurde um die Lösung zu sättigen. So wurde eine Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff und somit ein Absterben verhindert.

Wichtig war auch die richtige Stärke des Gaseinstroms einzustellen. Einerseits durfte es nicht zu wenig sein, andererseits führte zu starkes Einströmen zu unkontrollierbaren Zuckungen am Silberdraht was wiederum zu Verfälschungen der Aufzeichnungen führte.

Einmal eingehängt wurde auch hier zunächst der Schreiber eingeschaltet und mittels einem Drehrad wurde der Stift auf Null ausgerichtet. Weiters wurde der Flachbrett-schreiber auf 5 mV und Speed 5mm/Sekunde gestellt. Zudem wurde auch der Verstärker wieder eingeschaltet und erneut auf Null justiert. Danach konnte eine Vorspannung von 10,4 mN mit dem Feintrieb angelegt werden.

Nach einer 30 minütigen Eingewöhnungsphase für das Organ wurde anschließend mit Kontrollmessungen begonnen. Diese Kontrollmessungen dauerten mindestens 30 Minuten, bzw. so lange bis sich die Herzfrequenz so eingestellt hatte, dass sie über 4 Messungen hinweg konstant war. Es wurde im Abstand von 5 Minuten jeweils für 12 Sekunden gemessen. Bei einer Geschwindigkeit von 5 mm/Sekunde entsprach dies einer Strecke von 6 cm bzw. 6 Kästchen auf dem Millimeterpapier.

Sobald die Herzfrequenz konstant war konnte mit der ersten Konzentration begonnen werden. Die Auswirkungen der zugegebenen Substanz-Lösung wurden nun erneut alle 5 Minuten kontrolliert. 45 Minuten nach der ersten Konzentration wurde die zweite hinzugegeben. Dies wurde entsprechend dem Pipettierschema solange durchgeführt bis entweder alle Konzentrationen zugeführt waren oder der Vorhof zu schlagen aufgehört hat.

Die anschließende Berechnung der Herzfrequenz ergab sich aus der Anzahl der Schläge innerhalb von 6 Kästchen multipliziert mit 5.

3.5.6. Ablauf am Papillarmuskel

Die Präparation erfolgte wie bereits in Kapitel 3.2.5. besprochen.

Ein fertig präparierte Papillarmuskel wurde wie bereits erwähnt in Apparatur 2 gespannt und in das Organbad abgelassen. Danach wurden wiederum der Schreiber und der Amplifier aktiviert, sowie auf 5 mV und einen Speed von 20 mm/Sekunde gestellt. Hier wurde zusätzlich eine Vorspannung von 3,92 mN angelegt.

Weiters wurde während des Versuchs die Spannung mittels Feintrieb immer wieder nachjustiert, um zu gewährleisten dass es auf Grund einer Abnahme der Ausgangsspannung zu keiner verringerten Kontraktionskraft kommt (Reiter 1967).

Der Papillarmuskel verfügt im Gegensatz zum Vorhof über keine Spontanaktivität. Deshalb musste er mit einem Accupulser (Typ A310, Firma WPI) in Form von Rechteckimpulsen gereizt werden. Die Frequenz der Impulse betrug 1 Hertz, also 60 mal pro Minute, die Länge 3 ms^{-1} . Über eine Silberelektrode wurde der Muskel gereizt was zu einer Kontraktion führte.

Wurde bereits vor dem Anlegen einer Spannung eine Aktivität beobachtet so konnte das nur an dem Vorhandensein von Purkinjefasern liegen, welche im Zuge der Präparation nicht zur Gänze entfernt wurden. In so einem Fall wurden die Fasern entweder

nachträglich entfernt bzw. gewartet bis diese von selbst absterben, oder ein weiterer Papillarmuskel eingespannt.

Mit Hilfe eines „Isolation Units“ konnte die Stromstärke geregelt werden. Hier war es wichtig die Stromstärke nicht mehr als 10 % oberhalb der minimalen Reizschwelle einzustellen. Andernfalls konnte dies zu einer beschleunigten Entleerung der Katecholaminspeicher führen, was in weiterer Folge die Versuchsergebnisse verfälschen hätte können (Furchgott et al. 1959).

Bei diesem Vorgang würde die Amplitude des Papillarmuskels mehr und mehr abnehmen. Eine zu niedrige Stromstärke hätte wiederum zu keiner ausreichenden Kontraktion geführt.

In den Versuchen wurde stets mit einer Stromstärke von 2 mV begonnen. Sofern diese nicht ausreichend war konnte auch auf 5 mV erhöht werden. Die jeweilige Stromstärke wurde am Ende in die Berechnung der Kontraktionskraft berücksichtigt.

Ähnlich wie bereits beim Vorhof durchliefen auch die Papillarmuskel zunächst eine Eingewöhnungsphase von ungefähr 30 Minuten. Anschließend wurde erneut mit Kontrollmessungen im Abstand von 5 Minuten fortgefahren. Hier allerdings zeichnete man pro Messung immer 6 Amplituden auf. Dies wurde solange durchgeführt bis drei aufeinander folgende Messungen vom Ausschlag her ident waren, dabei wurden die jeweiligen Amplituden mit einem Lineal vermessen.

Danach folgte das gewohnte Pipettierschema. Nach jeweils 45 Minuten wurde die Auswirkung der zu-pipettierten Substanz-Lösung bei 20 mm/Sekunde vermessen.

3.5.7. Ablauf am terminalen Ileum

Ein wie in Punkt 3.2.6. beschrieben präparierter Darm wurde mittels seiner beiden Silberhäkchen in die Versuchs-Apparatur 1 eingespannt und in die Nährlösung eingeführt. Dabei wurde darauf geachtet den Darm mit dem caecal gelegenen Ende nach unten einzuspannen. Die Geräte wurden wie üblich eingeschaltet, die Vorspannung lag hier bei 4,92 mN bei einer Stromstärke von 5 mV.

Während einer 20-30 minütigen Gewöhnungsphase konnte es zu einer Veränderung der Darmperistaltik kommen, was zu einem Entfernen des Schreibstifts vom Nullpunkt führte. Dieser wurde danach erneut korrekt ausgerichtet.

Anschließend wurde der Kippschalter aktiviert und somit mit der Aufzeichnung begonnen. Wie bereits bei Aorta und Pulmonalis wurde auch hier die Tyrode abgelassen und rasch durch 25 ml einer allerdings 60 mmolaren KCl-Lösung ersetzt.

Wie bereits erwähnt, führte die Zufuhr des KCl zu einer starken und schnell ansteigenden Kontraktion des terminalen Ileum, gefolgt von einer ebenfalls recht schnellen Abnahme. In weiterer Folge wurde zumindest 45 Minuten gewartet damit sich die Kontraktion stabilisieren konnte. Erst danach konnten dem Pipettierschema folgend die einzelnen Konzentrationen nach einander hinzupipetiert werden.

In manchen Fällen kam es auch nach längerer Wartezeit nicht zu einer konstanten Plateauphase bzw. zu einem kontinuierlichen Absacken in Richtung Null. Dann musste das Präparat verworfen und durch ein anderes ersetzt werden.

3.5.8. Ablauf am terminalen Ileum unter Glibenclamid Einfluss

Da die größte Wirksamkeit der Substanz MAH52.HCl am Darm festgestellt werden konnte, wurde auch der Wirkmechanismus hier durchgeführt. Es wurden hierzu zwei Versuchsreihen zu einerseits 100µmol/l und andererseits 30µmol/l durchgeführt.

Der Ablauf der Versuche war hier bis zum Erreichen der Plateauphase ident zu den vorangegangenen Versuchen. Auch die Apparatur blieb die Selbe.

Nach Erreichen einer konstanten Kontraktion wurden zunächst 100µmol/l bzw. 30µmol/l des Antagonisten Glibenclamid in das Organbad pipetiert. Danach kam es erneut zu einer 45-minütigen Wartezeit, ehe dann die einer EC₅₀ entsprechende Menge an MAH52.HCl hinzugegeben wurde. Danach wurde erneut 45 Minuten gewartet um die Substanz wirken zu lassen, was gleichzeitig dem Ende des Versuchs entsprach.

3.5.9. Verwendete Substanz zur Untersuchung des Wirkmechanismus – Glibenclamid

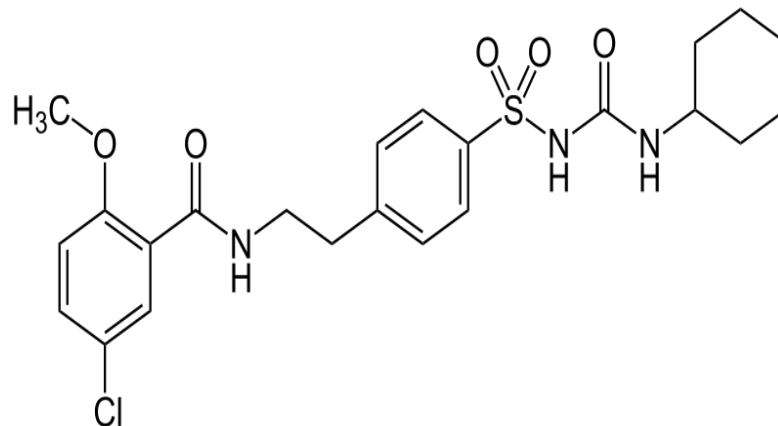


Abbildung 8: Struktur von Glibenclamid

MG = 494 g/mol

Glibenclamid gehört zur Gruppe der Sulfonylharnstoffe, für die Wirkung ist die saure Sulfonamid in Nachbarschaft zum aromatischen Ring verantwortlich. Sulfonylharnstoffe werden als orale Antidiabetika zur Therapie des Diabetes Typ 2 verwendet.

Glibenclamid blockiert ATP-abhängige Kalium-Kanäle in den β -Zellen über die SUR-1 (Sulfonylharnstoffrezeptor) Untereinheit, wodurch der Ausstrom von Kalium gehemmt wird. Was folgt ist eine Depolarisation und in weiterer Folge das Öffnen von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen. Dadurch strömt vermehrt Calcium in die Zelle ein wodurch es zu einer vermehrten Insulinfreisetzung kommt. Folglich wirkt Glibenclamid nur bei funktionierender Insulinsekretion, weshalb sie nicht zur Therapie des Diabetes Typ 1 benutzt wird. In zu hohen Dosen kann es auch an eine Wechselwirkung mit der SUR-2 Untereinheit kommen. Dies kann zu kardiovaskulären Nebenwirkungen führen (Gallwitz et al, 2011).

Prinzipiell existieren drei Sulfonylharnstoffrezeptoren. SUR-1 findet sich dabei in den β -Zellen des Pankreas, SUR-2_A an Skelett- und Herzmuskulatur. SUR-2_B wurde in der glatten Muskulatur gefunden. Prinzipiell hat Glibenclamid eine sehr hohe Affinität bzw. Selektivität für SUR-1, Wechselwirkungen mit anderen Typen sind meist Folge einer Überdosierung.

Die gravierendste unerwünschte Nebenwirkung von Glibenclamid ist eine Hypoglykämie, die zu Stande kommt, da die Wirkung von Glibenclamid sich nicht nach den vor-

herrschenden Zuckerspiegeln richtet. Es kommt also Blutzucker-unabhängig zu einer Insulinsekretions-Steigerung. Daher ist bei Auftreten einer solchen Hypoglykämie eine Infundierung mit Glucose nötig (Aktories 2005).

Seltener auftretende Nebenwirkungen sind vor allem Appetitlosigkeit, Diarrhö, Laktatazidose, Übelkeit und Erbrechen (Greten et al. 2010).

Kontraindiziert ist die Gabe von Glibenclamid bei schweren Leber- und Nierenschäden, Porphyrie, Überempfindlichkeit gegen Sulfonamide, so wie bereits erwähnt Diabetes Typ 1 (Liebl et Martin, 2005).

3.8. Auswertung der Versuchsreihen an den einzelnen Organen

3.8.1. Aorta, Arteria pulmonalis und terminales Ileum

An Aorta und Pulmonalis wurde versucht eine dilatierende Wirkung der Testsubstanz nachzuweisen, am terminalen Ileum war Spasmolyse das Ziel. Nach Kontraktion mit Hilfe der jeweiligen Kaliumchlorid-Lösungen konnte nach dem bekannten Pipettierschema Konzentration um Konzentration verabreicht werden. Mit Hilfe des Schreibers wurde die Wirkung veranschaulicht.

Im Abstand von 45 Minuten wurden die Konzentrationen zugegeben, dies wurde am Millimeterpapier mit einem Bleistift markiert.

Nach Beenden eines Versuchs wurde die Entfernung vom Nullpunkt bis zur Plateauphase vermessen und als 100% angenommen, diente somit als Referenz.

So konnte bei sämtlichen weiteren Messpunkten, abhängig von der Konzentration, die prozentuelle Abnahme der Kontraktion ermittelt werden. Dazu wurden die Abstände vom Nullpunkt zur jeweiligen Markierung abgemessen und mit dem Referenzwert verglichen. Zusätzlich wurden diese Werte noch mit dem Eichfaktor von 0,98 multipliziert. Dieser ergab sich aus der Tatsache, dass 1cm am Papier 0,98 mN entsprach.

Durch Vergleich der Werte konnte am Ende die Wirkstärke der Substanz am jeweiligen Organ beurteilt werden.

3.8.2. Atrium dexter

Am Vorhof wurde die Auswirkung der Substanz MAH52.HCl auf die Schlagfrequenz des Sinusknoten, beziehungsweise auf die Chronotropie, ausgetestet.

Die Schläge wurden alle 5 Minuten für jeweils 12 Sekunden aufgezeichnet (siehe Kapitel 3.5.5.).

Als Referenzwert wurde hier jene Kontrollmessung bei der die Frequenz des Vorhofs konstant war, also jene die unmittelbar vor dem Einspritzen der Testsubstanz registriert wurde. Dieser Wert entsprach erneut 100%.

Die Schläge wurden nun abgezählt und mit dem Faktor 5 multipliziert um so die Anzahl an Schlägen für eine Minute zu bekommen. Diese Werte wurden mit dem Referenzwert verglichen um die einzelnen Prozentsätze zu bekommen.

Lag der Prozentsatz oberhalb von 100% wies das auch eine positive Chronotropie, also eine Steigerung der Frequenz hin. Bei gleicher Anzahl an Schlägen lag kein Effekt vor, bei einem Wert unterhalb der 100% konnte man von einer negativen Chronotropie ausgehen.

3.8.3. Musculus papillaris

Bei diesem Präparat wurde, wie bereits erwähnt, der Effekt der Testsubstanz auf die Kontraktionskraft, also die Inotropie, ermittelt. Dazu wurden wie bereits in Kapitel 3.5.6. die Amplituden in regelmäßigen Abständen registriert und aufgezeichnet. Durch Vermessen der Amplituden bekam man zunächst einen Wert in Zentimeter. Dieser musste anschließend mit dem Eichfaktor des Kraftwandlers ($=0,98$) multipliziert werden. Zudem musste auch die Stromstärke miteinbezogen werden. Diese betrug 2mV oder 5mV. So wurde bei 2mV mit 0,4 multipliziert um somit zu standardisieren.

Der anfängliche Wert diente als Referenz. Die darauf folgenden Messungen wurden prozentuell mit dem Referenzwert verglichen um so eine Aussage über die prozentuelle Zu- oder Abnahme der Inotropie treffen zu können.

3.8.4. Statistik

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen wurde das Programm „Sigma Plot“ verwendet. Hierzu errechnete man sich die Mittelwerte sowie die Standardfehler der Mittelwerte ($=SEM$). Mit Hilfe des Programms konnten dann Konzentrations-Wirkungskurven erstellt werden, wobei auf der x-Achse die Konzentration der Substanz in $\mu\text{mol/l}$ und auf der y-Achse die Kontraktionskraft-Abnahme in % dargestellt wurde. Anschließend konnten die EC_{50} -Werte ermittelt werden. Die

EC₅₀ entspricht der effektiven Konzentration bei der es zu einer 50%igen Veränderung kommt (Larsen, 2011). Umgelegt auf die Versuche bedeutete die EC₅₀, die Konzentration der Substanz MAH52.HCl bei der die Hälfte des Referenzwerts erreicht wurde.

Um die Irrtumswahrscheinlichkeit der Messwerte bestimmen zu können, behalf man sich eines Student-t-Tests. Dieser gibt an, dass Werte von <5% ($P < 0,05$) als signifikant gelten, während Werte <1% ($P < 0,01$) und <0,1% ($P < 0,001$) als hochsignifikant einzustufen sind.

4. ERGEBNISSE

4.1. Ergebnisse der Testsubstanz MAH52.HCl

4.1.1. Wirkung auf die Aorta descendens

In 4 auf einander folgenden Versuchen war es das Ziel, eine eventuell vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz auf die Aortapräparate zu messen. Der entsprechende Versuchsablauf wurde bereits in Kapitel 3.5.3. besprochen.

Durch Errechnen des arithmetischen Mittelwerts aller Versuche wurde der Kontrollwert ermittelt. Im Fall der Aorta war dieser: $8,45 \pm 2,13$ mN. Bereits nach der ersten zupipettierten Konzentration zeigte sich eine Wirkung der Testsubstanz auf die Aorta.

Diese Wirkung wurde mit jeder zugegebenen Konzentration stärker. Die EC_{50} von MAH52.HCl an der Aorta betrug $28 \mu\text{mol/l}$. Dies war also jener Wert bei dem es zu einer Abnahme der Konzentration um die Hälfte kam.

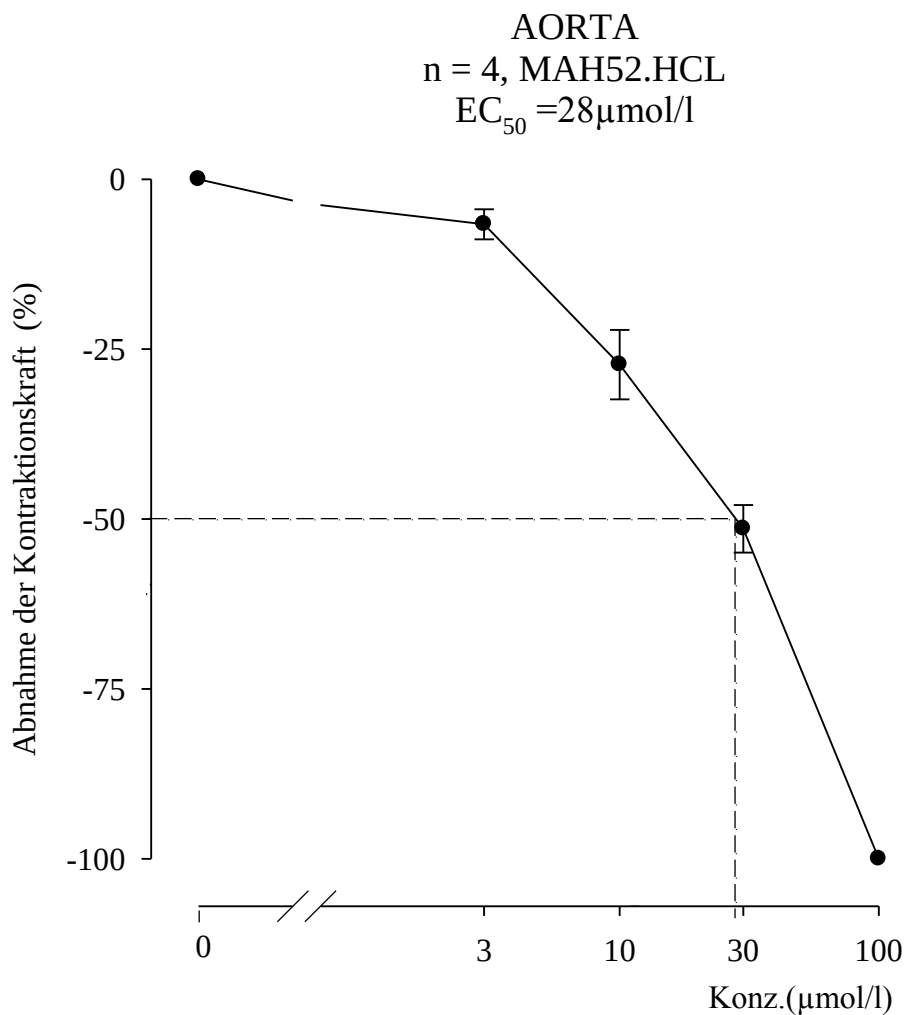
Des Weiteren zeigte sich, dass keine der verwendeten Aorten die finale Zugabe von $70 \mu\text{mol/l}$ überlebte. Die Substanz wies demnach eine durchaus starke vasodilatierende Wirkung auf die Organe aus.

Tabelle 5: Versuchsergebnisse von MAH52.HCl an der Aorta

MAH52.HCl $\mu\text{mol/l}$	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl Versuche (n)	Irrtumswahrsch einlichkeit (P)
Kontrolle	$8,45 \pm 2,13$	0 ± 0	4	-
3	$7,79 \pm 1,99$	$-6,63 \pm 2,21$	4	n.s.
10	$5,86 \pm 1,59$	$-27,28 \pm 5,11$	4	0,05
30	$4,04 \pm 1,24$	$-51,44 \pm 3,49$	4	0,01
100	0 ± 0	-100 ± 0	4	0,001

In Tabelle 5 sind die Anzahl der durchgeführten Versuche n, die Irrtumswahrscheinlichkeit P, sowie die Mittelwerte und Standardabweichungen in mN bzw. Prozent aufgeführt.

Diagramm 1: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH52.HCl



Wie aus dieser Abbildung eindeutig hervorgeht, hat die Substanz MAH52.HCl eine durchaus starke Wirkung auf die Aorta.

Bereits bei geringer Zugabe an Substanz zeigt sich eine deutliche Abnahme der Kontraktion. Diese nimmt je mehr zugegeben wurde immer stärker ab. Folglich ist davon auszugehen, dass die untersuchte Substanz eine starke Wirkung auf die glatte Muskulatur besitzt. Zusätzlich fällt auf, dass keine der untersuchten Organe die finale Dosis-Zugabe überlebt hat. Es kam bei sämtlichen Präparaten zu einem totalen Kontraktions-Verlust.

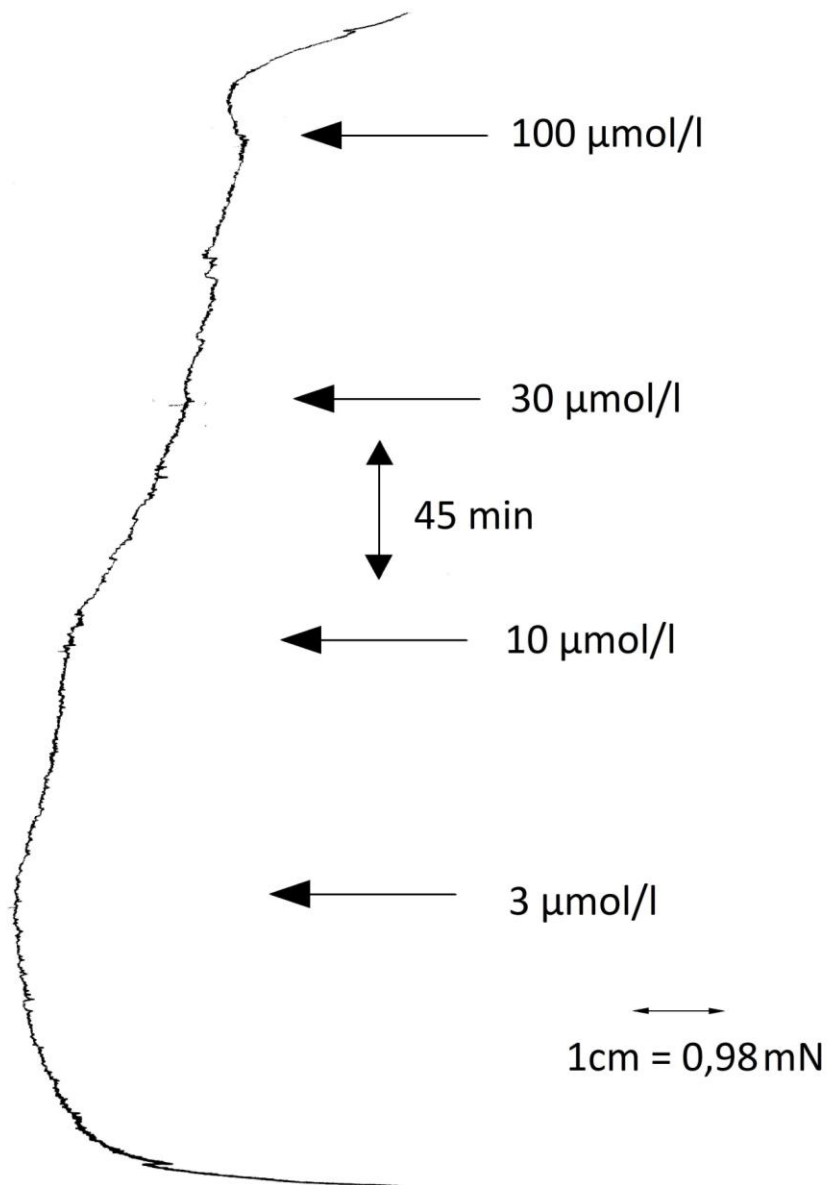


Abbildung 9: Originalverlauf Aorta

Diese Abbildung spiegelt die originale Aufzeichnung des Messgeräts wieder. Deutlich zu sehen ist anfänglich das rasche Ansteigen der Kontraktion, bedingt durch den Austausch der Nährlösung mit Kaliumchlorid-Lösung, sowie die sich daraufhin einpendelnde Plateauphase. Zudem zeigt sich, dass die Substanzen in Abständen von 45 Minuten eingespritzt wurden. Die Pfeile markieren jenen Zeitpunkt, an dem die entsprechende Dosis verabreicht wurde.

4.1.2. Wirkung auf die Arteria pulmonalis

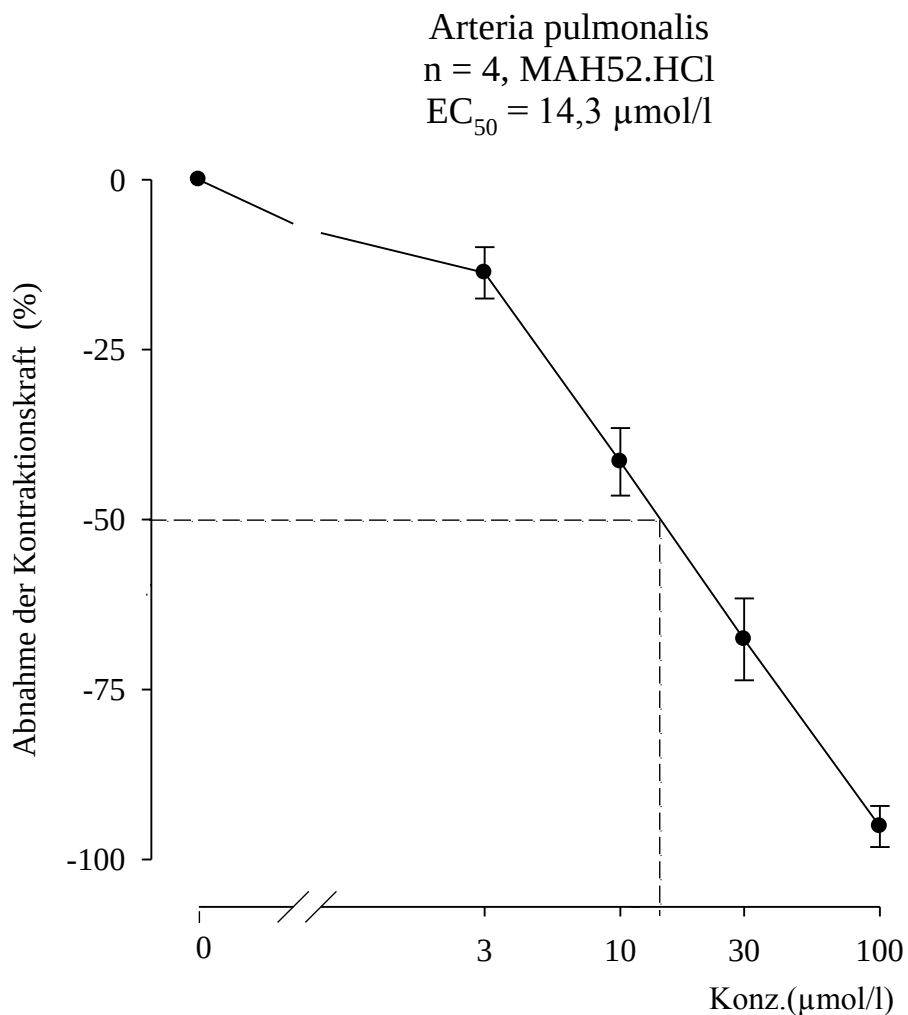
An der Arteria pulmonalis wurden ebenfalls 4 Versuche durchgeführt. Auch an diesem Organ zeigte sich eine starke Wirkung der Testsubstanz im Hinblick auf eine Vasodilatation. Die Wirkung war bereits ab der ersten Konzentration deutlich zu sehen. Bereits ab einer Badkonzentration von 10µmol/l nahm die Kontraktion der Organe steil ab. Der ermittelte Kontrollwert betrug an diesen Organen $8,54 \pm 1,51$.

Tabelle 6: Versuchsergebnisse von MAH52.HCl an der Pulmonalis

MAH52.HCl µmol/l	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl Versuche (n)	Irrtumswahrsch einlichkeit (P)
Kontrolle	$8,54 \pm 1,51$	0 ± 0	4	-
3	$7,47 \pm 1,48$	$-13,07 \pm 3,78$	4	0,05
10	$5,02 \pm 1,03$	$-41,51 \pm 4,96$	4	0,01
30	$2,65 \pm 0,54$	$-67,63 \pm 6,02$	4	0,001
100	$0,31 \pm 0,14$	$-95,16 \pm 3,03$	4	0,001

Tabelle 6 präsentiert erneut die ermittelten Mittelwerte bzw. Standardabweichungen in µmol/l bzw. Prozent, sowie die Anzahl an durchgeführten Versuchen und die Irrtumswahrscheinlichkeit.

Diagramm 2: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH52.HCl an der Pulmonalis



An Hand der Dosis-Wirkungskurve der Testsubstanz zeigt sich, dass die Wirkung an der Lungenarterie noch stärker ausfällt als bereits an der Aorta. So kam es bereits bei der geringsten Dosis-Zugabe zu einer deutlichen Abnahme der Kontraktion. Ebenso beträgt die EC_{50} der untersuchten Substanz an der Pulmonalis $14,3 \mu\text{mol/l}$, was auch auf eine starke Wirkung hinweist. Somit wird die Annahme aus den Versuchen an der Aorta bestätigt, dass die Substanz MAH52.HCl eine starke Wirkung auf glattmuskuläre Organe besitzt.

Was zusätzlich auffällt ist, dass es bei 3 von 4 untersuchten Lungenarterien innerhalb der vorgegebenen Zeit nicht zu einer absoluten Abnahme der Kontraktion kam.

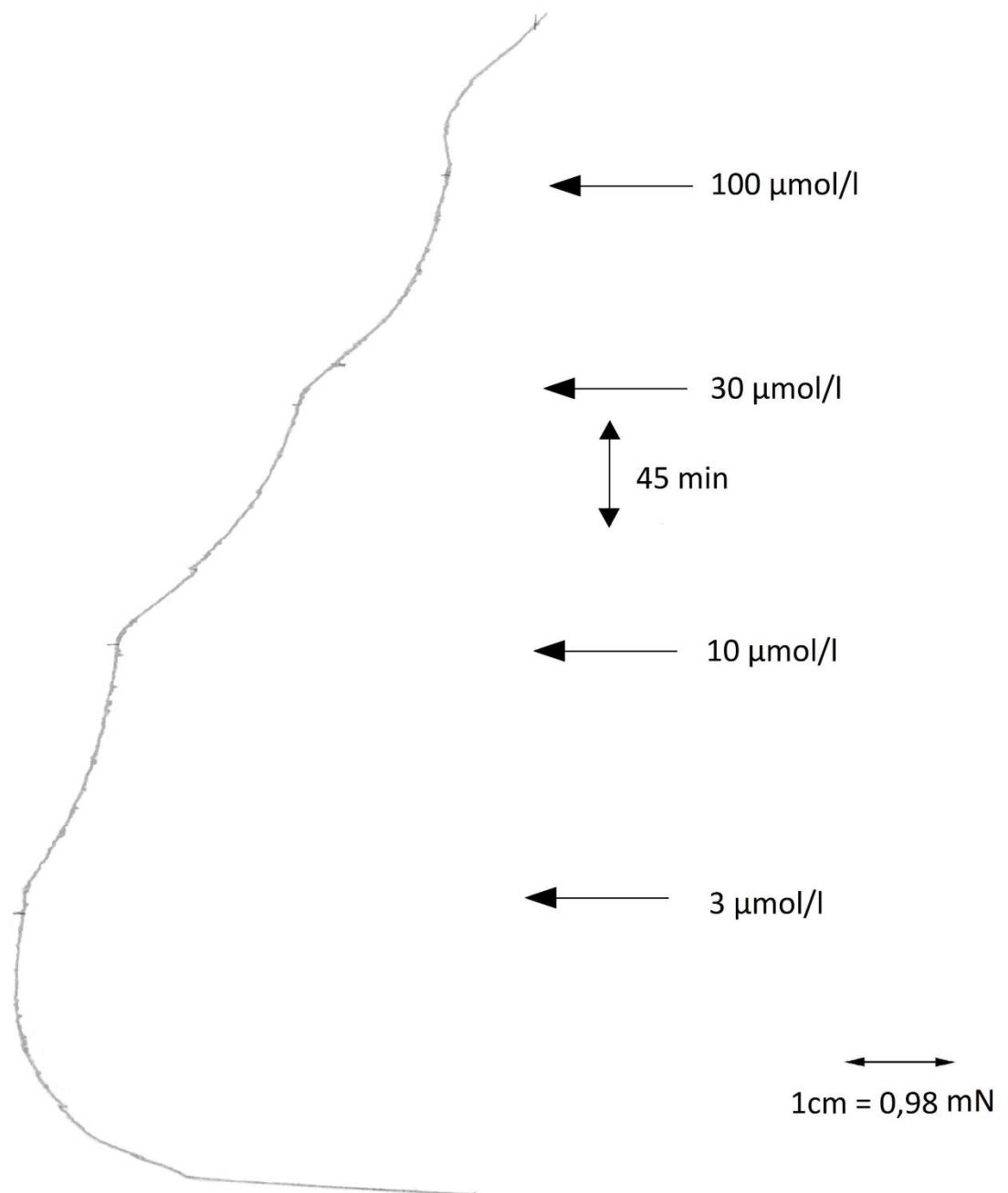


Abbildung 10: Originalverlauf Pulmonalarterie

In der Abbildung ist die durchaus starke Wirkung der Testsubstanz auf die Pulmonalarterie zu sehen. Bereits bei einer niedrigen Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ kommt es zu einer deutlichen Vasodilatation. Die EC_{50} wird bereits nach der zweiten zugegebenen Konzentration erreicht.

4.1.3. Wirkung auf den Atrium cordis dextrum

Um ein aussagekräftiges Ergebnis zu bekommen wurden auch vier Versuche an rechten Vorhöfen durchgeführt. Wie bereits besprochen war es sehr wichtig diese Organe rasch in die Apparatur einzuspannen. So ging der Automatismus des rechten Vorhofs nicht verloren.

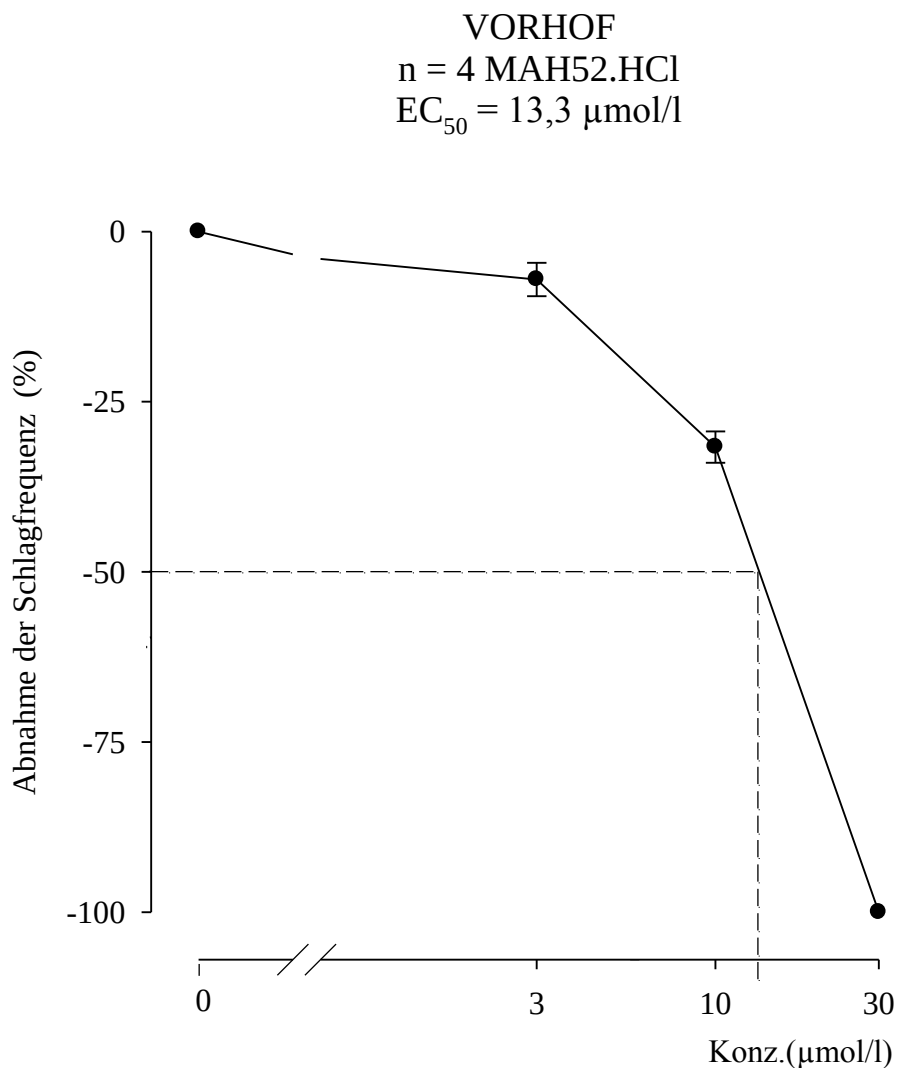
Auch hier wurde erneut der Kontrollwert aus den errechneten Mittelwerten ermittelt. Im Fall des rechten Vorhofs betrug dieser $171,25 \pm 13,29$ Schläge pro Minute.

Tabelle 7: Versuchsergebnisse von MAH52.HCl auf den rechten Vorhof

MAH52.HCl $\mu\text{mol/l}$	$f \pm \text{SEM}$ (x/min)	$f \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl Versuche (n)	Irrtumswahrsch einlichkeit (P)
Kontrolle	$171,25 \pm 13,29$	0 ± 0	4	-
3	$141,25 \pm 7,47$	$-7,05 \pm 2,45$	4	0,05
10	$116,25 \pm 5,54$	$-31,66 \pm 2,30$	4	0,01
30	0 ± 0	0 ± 0	4	0,001

In Tabelle 7 sind erneut die Anzahl an Versuchen n, die Irrtumswahrscheinlichkeit P, sowie die Konzentrationsschritte und die Mittelwerte in Prozent bzw. auch die Anzahl an Schlägen wurde angegeben.

Diagramm 3: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH52.HCl am rechten Vorhof



Die Testsubstanz verzeichnete, wie bereits auf die glattmuskulären Organe Aorta und Pulmonalis, ebenso eine sehr starke Wirkung auf den rechten Vorhof. Dabei war eine Abnahme der Chronotropie, also der Frequenz, bei der ersten Konzentration noch relativ schwach ausgeprägt. Ab einer Badkonzentration von 10µmol/l allerdings nahm die Frequenz rasant ab. Die Zugabe der dritten Konzentration überlebte keines der getesteten Organe mehr. 13,3µmol/l entsprach hier der effektiven Konzentration (EC₅₀).

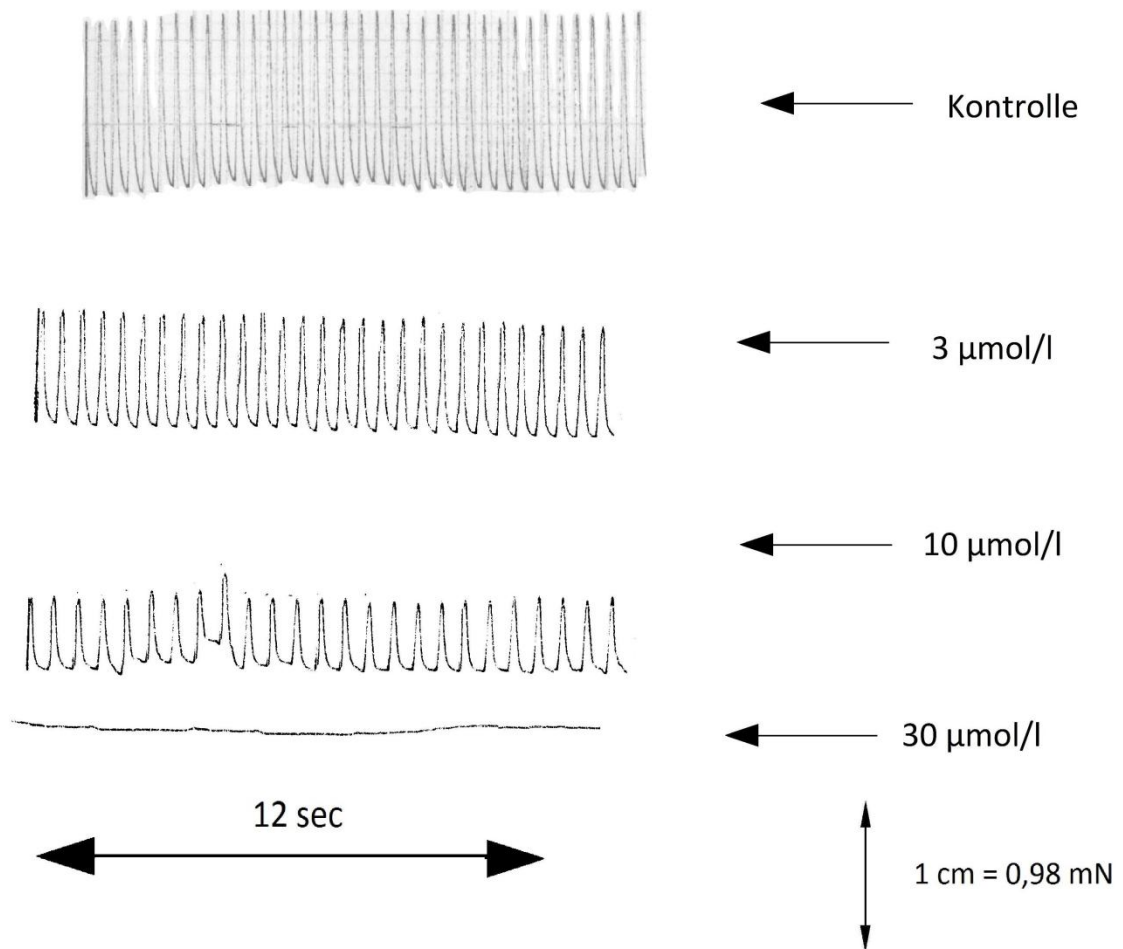


Abbildung 11: Originalverlauf Vorhof

Am Vorhof ist über diese Abbildung deutlich zu erkennen, wie die Amplitude der einzelnen Präparate mit zunehmender Substanz-Konzentration immer kleiner werden. Dies bestätigt die negativ chronotrope Wirkung von MAH52.HCl. Ebenso ist ersichtlich, dass keines der untersuchten Organe eine Dosis von 30 µmol/l überlebt hat.

4.1.4. Wirkung auf den Musculus papillaris

Am Papillarmuskel wurde ein Einfluss von MAH52.HCl auf die Inotropie, also die Kontraktionskraft, untersucht. Sowohl eine positive als auch eine negativ inotrope Wirkung hätte dabei beobachtet werden können.

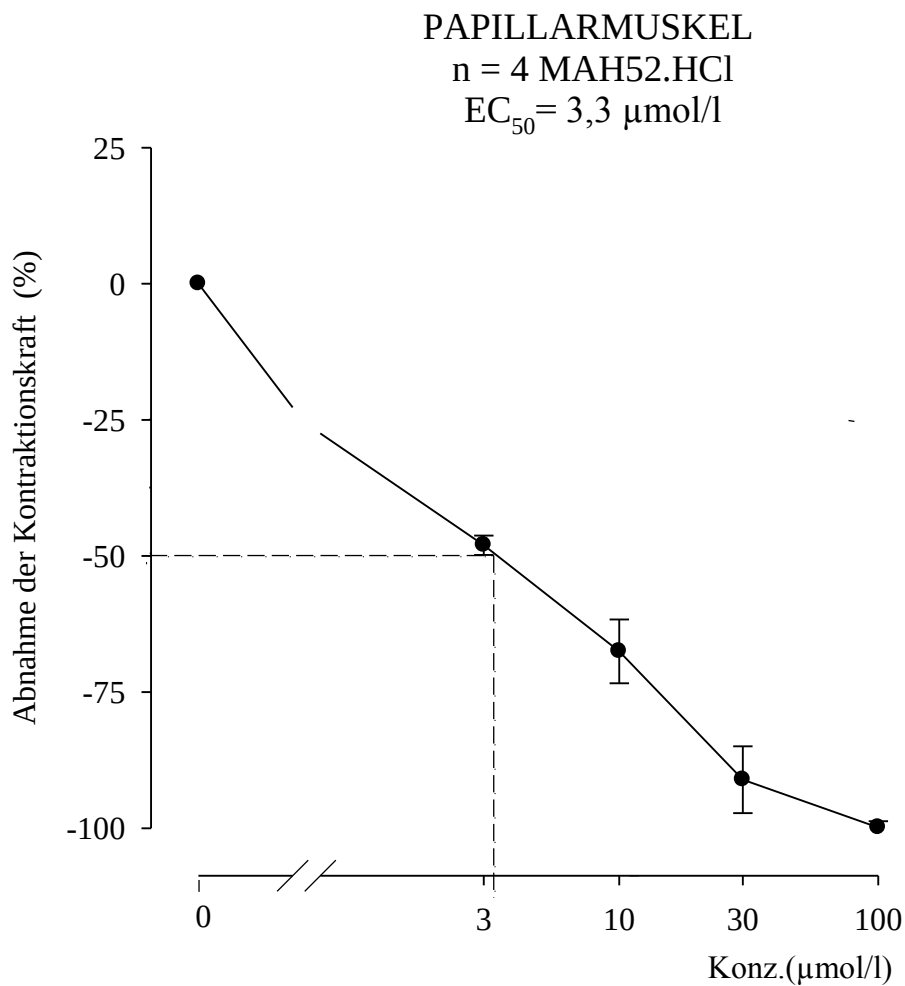
Wie sich zeigte hatte die Testsubstanz dabei eine überaus starke, negativ inotrope Wirkung auf den Papillarmuskel. Der errechnete Kontrollwert betrug im Fall des Papillarmuskels $3,38 \pm 0,65$ mN.

Tabelle 8: Versuchsergebnisse von MAH52.HCl auf den Papillarmuskel

MAH52.HCl $\mu\text{mol/l}$	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl Versuche (n)	Irrtumswahrsch einlichkeit (P)
Kontrolle	$3,38 \pm 0,65$	0 ± 0	4	-
3	$1,77 \pm 0,37$	$-48,03 \pm 1,78$	4	0,01
10	$1,03 \pm 0,14$	$-67,52 \pm 5,85$	4	0,001
30	$0,22 \pm 0,12$	$-91,1 \pm 6,13$	4	0,001
100	$0,25 \pm 0,02$	$-99,86 \pm 1,14$	4	0,001

Erneut wurden in Tabelle 4 die zugegebenen Konzentrationen, die daraus folgenden Mittelwerte in mN bzw. Prozent, sowie die Anzahl an Versuchen n und die Irrtumswahrscheinlichkeit P erfasst.

Diagramm 4: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH52.HCl auf den Papillarmuskel



Bereits in der geringsten Dosierung reagierten die untersuchten Organe mit einer starken Abnahme der Inotropie. Der EC_{50} -Wert lag bereits bei $3,3 \mu\text{mol/l}$, was die hohe Empfindlichkeit des Gewebes der Papillarmuskel zusätzlich unterstrich.

Die Zugabe der letzten Konzentration und die damit einhergehende Badkonzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ überlebte nur einer der vier untersuchten Papillarmuskel.

Im Diagramm sind auch die als schwarze Punkte dargestellten Standardfehler eingetragen, sowie die Streuung welche durch die sie durchziehenden Striche gekennzeichnet ist. Je kleiner die Striche dabei sind, desto geringer ist auch die Streuung.

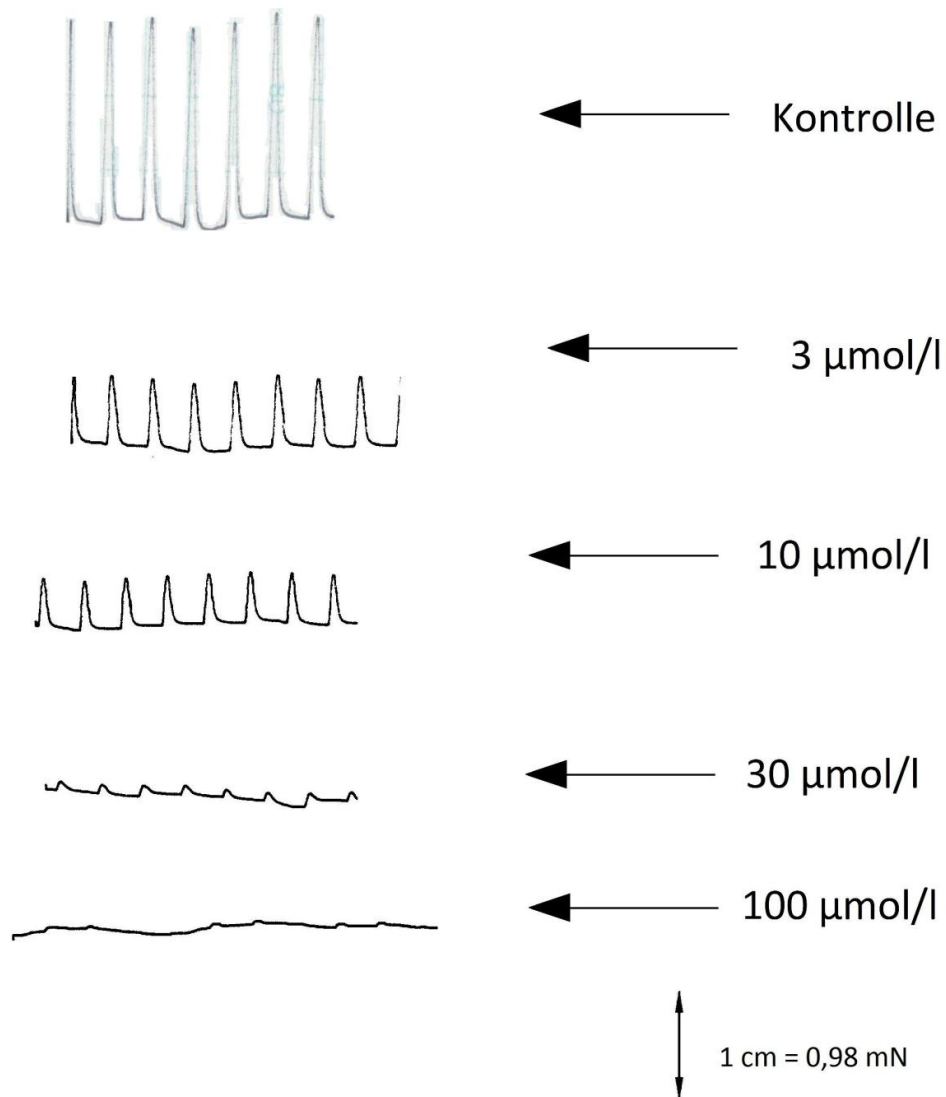


Abbildung 12: Originalverlauf Papillarmuskel

Wie aus der Abbildung deutlich hervorgeht, nimmt die Stärke der Amplituden umso mehr nach, desto mehr Substanz zugegeben wird. War die Aktivität des Papillarmuskels bei einer Badkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ noch deutlich ersichtbar, war diese bei einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ gänzlich verschwunden. Dies beweist die negativ inotrope Wirkung der Substanz.

4.1.5. Wirkung auf das terminale Ileum

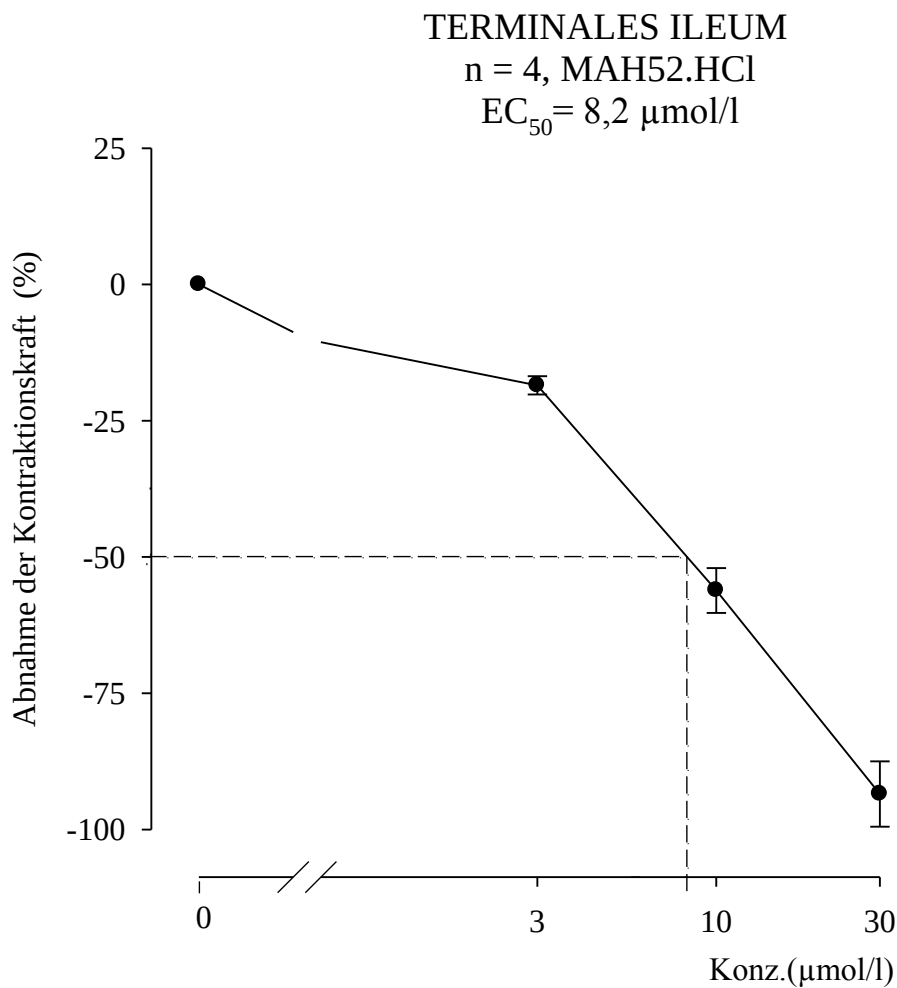
Zur Untersuchung der spasmolytischen Wirksamkeit der Substanz MAH52.HCl auf das terminale Ileum wurden erneut vier verschiedene Präparate untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Testsubstanz auf das terminale Ileum, neben dem Papillarmuskel, die stärkste Wirkung zeigte. Der errechnete Kontrollwert lag bei $7,18 \pm 0,67$ mN.

Tabelle 9: Versuchsergebnisse von MAH52.HCl auf das terminale Ileum

MAH52.HCl $\mu\text{mol/l}$	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl Versuche (n)	Irrtumswahrsch einlichkeit (P)
Kontrolle	$7,18 \pm 0,67$	0 ± 0	4	-
3	$5,84 \pm 0,52$	$-18,51 \pm 1,67$	4	0,05
10	$3,16 \pm 0,45$	$-56,14 \pm 4,1$	4	0,01
30	$0,48 \pm 0,48$	$-93,5 \pm 6,5$	4	0,001
100	0 ± 0	-100 ± 0	4	0,001

In Tabelle 9 sind die Anzahl zugegebener Konzentrationen sowie der Versuche n, die Irrtumswahrscheinlichkeit P und die Mittelwerte der Kontraktionsänderung (f_c) aufgelistet.

Diagramm 5: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH52.HCl am terminalen Ileum



Wie aus Diagramm 5 eindeutig hervorgeht, hatte die getestete Substanz eine äußerst starke Wirkung auf die glatte Muskulatur des terminalen Ileums. Mit einer EC_{50} von nur $8,2 \mu\text{mol/l}$ kam es bereits nach Zugabe der ersten Konzentration zu einem deutlichen Abfall der Konzentration. Durch Zupipettieren weiterer Dosen der Substanz zeichnete sich eine überaus starke Spasmolyse ab.

Da das terminale Ileum die beste Ansprechbarkeit für MAH52.HCl aufwies, wurde in späteren Versuchen auch der Wirkmechanismus an diesem Organ genauer untersucht.

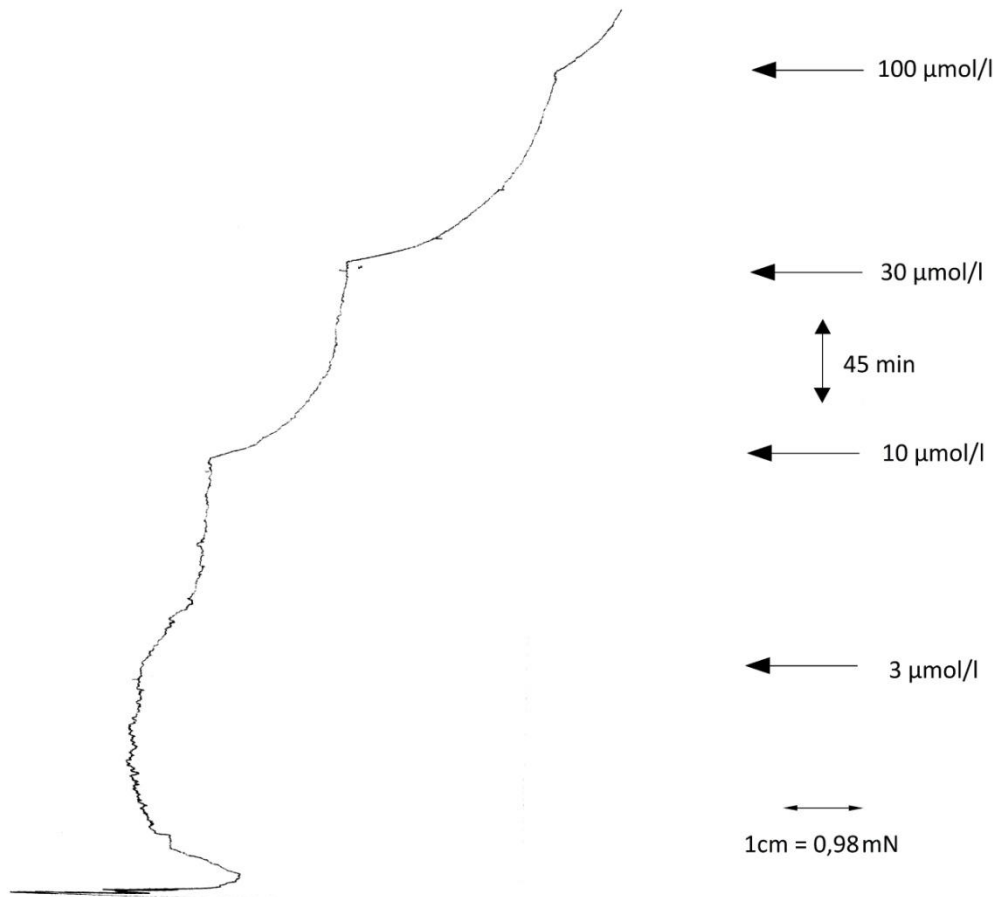


Abbildung 13: Originalverlauf terminales Ileum

Ein kontinuierliches Absinken der Kurve und somit der Kontraktion zeugen von der starken Wirkung von MAH52.HCl auf das terminale Ileum. Auch hier erfolgte die kumulierte Zugabe an Substanz im Abstand von 45 Minuten.

4.2. Versuchsreihen zur Untersuchung des Wirkmechanismus von MAH52HCl auf das terminale Ileum

Wie bereits aus Punkt 4.1.5. hervorgeht, zeigte die Testsubstanz die effektivste Wirkung auf das terminale Ileum. Es kam zu einer deutlichen und raschen Abnahme der Kontraktionskraft. Im nachfolgenden Kapitel wurde versucht den Wirkmechanismus der Substanz genauer zu durchleuchten. Dazu war es naheliegend die Kaliumkanäle zu schließen. Hierzu verwendete man Glibenclamid. Dabei handelt es sich um einen Kaliumkanalblocker, der die Wirkung von MAH52.HCl antagonisieren sollte.

4.2.1. Einfluss von MAH52.HCl in Kombination mit 30µmol/l Glibenclamid

Durch die Zugabe eines Antagonisten, wie in unseren Versuchen Glibenclamid, wurde überprüft ob die Substanz wirklich über die Öffnung ATP-abhängiger Kaliumkanäle wirkt.

Der Ablauf wurde bereits in Punkt 3.5.8. genauer besprochen.

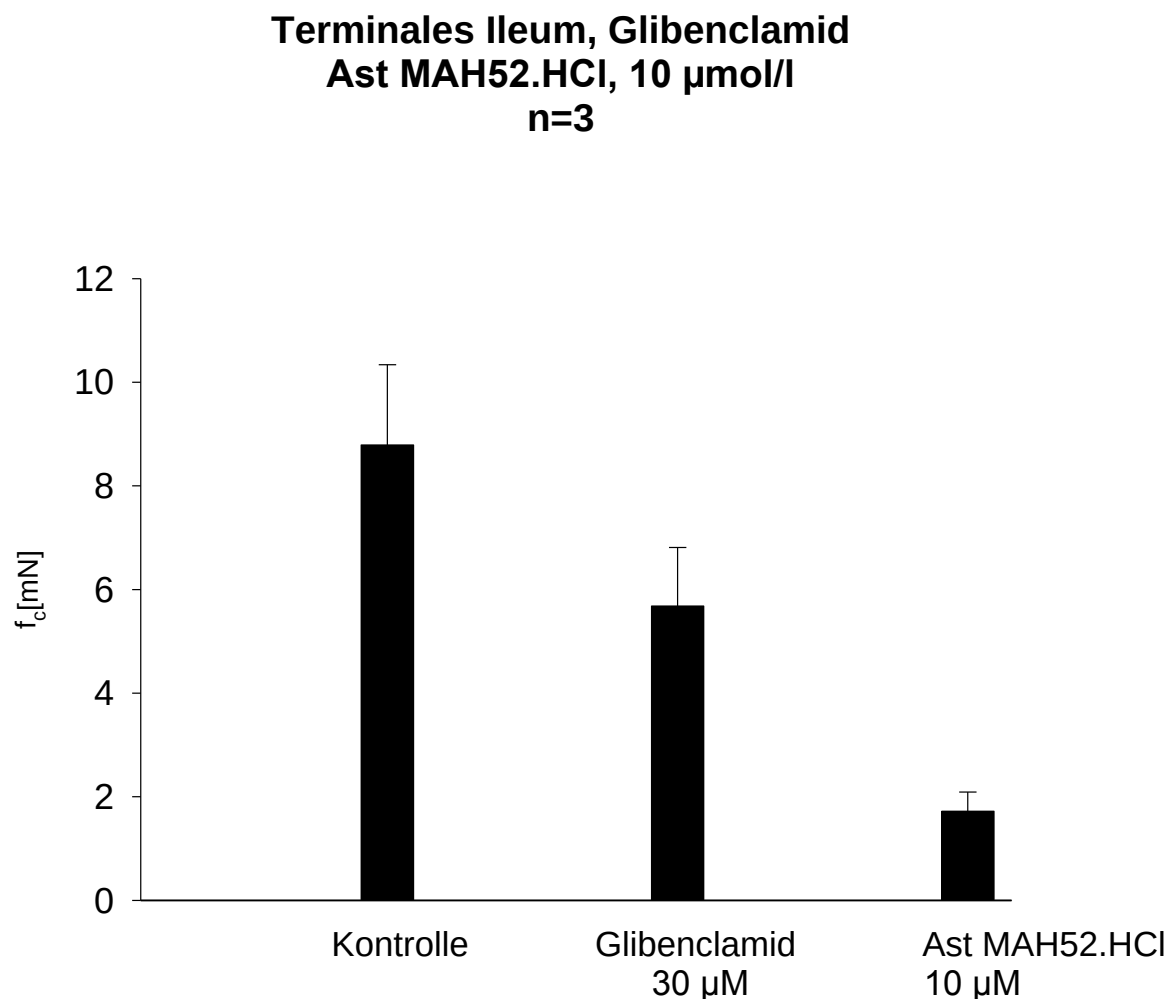
Nach Zugabe der Kaliumchlorid-Lösung kam es zunächst zu einer maximalen Kontraktion. Dabei wurde ein Kontrollwert von $8,79 \pm 1,55$ errechnet. Danach wurden 30µmol/l an Glibenclamid in das Organbad zugegeben. Damit sich das Organ an die neuen Begebenheiten anpassen konnte, wurde 45 Minuten lang gewartet. Anschließend wurden 10µmol der Testsubstanz MAH52.HCl hinzugefügt. Diese Menge entsprach etwas mehr als der in vorherigen Versuchen ermittelten EC_{50} und sollte folglich in der Lage sein, die durch Glibenclamid geschlossenen Kaliumkanäle erneut zu öffnen und so zu einer neuerlichen Vasodilatation zu führen.

Tabelle 10: Versuchsergebnisse von MAH52.HCl auf das terminale Ileum unter Einfluss von Glibenclamid

Konzentration (µmol/l)	$F_c \pm SEM$ (mN)	Anzahl Versuche (n)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$8,79 \pm 1,55$	3	-
30µmol/l Glibenclamid	$5,68 \pm 1,13$	3	-
10µmol/l MAH52.HCl	$1,72 \pm 0,37$	3	0,05

Tabelle 10 veranschaulicht die arithmetischen Mittelwerte und den zugehörigen Standardfehler in mN, sowie die verschiedenen zugesetzten Substanzen und Substanzmengen. Zusätzlich zeigt sie auf, dass 3 Versuche mit verschiedenen Darm-Präparaten unter Einfluss von 30µmol/l Glibenclamid durchgeführt wurden, sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit die sich dabei herausstellte.

Diagramm 6: Darstellung der Versuchsergebnisse bei 30µmol/l Glibenclamid mit Hilfe eines Balkendiagramms



In Diagramm 6 sind auf der x-Achse die verschiedenen zugegebenen Konzentrationen, auf der y-Achse die daraus resultierende Kontraktionskraft dargestellt. Die Balken des Diagramms ergeben sich hierbei aus den Mittelwerten, die strichförmigen Verlängerungen stehen für die Standardabweichungen.

Dabei steht der erste Balken für die Kontrolle, die durch Zugabe der Kaliumchlorid Lösung für eine Kontraktion steht. Die zwei weiteren Balken stellen den Effekt der Zugabe von 30µmol/l Glibenclamid beziehungsweise von 10µmol/l MAH52.HCl auf die Kontraktion des terminalen Ileums dar. Wie sich bereits in diesem Diagramm zeigt, führte die Zufuhr an Substanz zu einer verstärkten Vasodilatation.

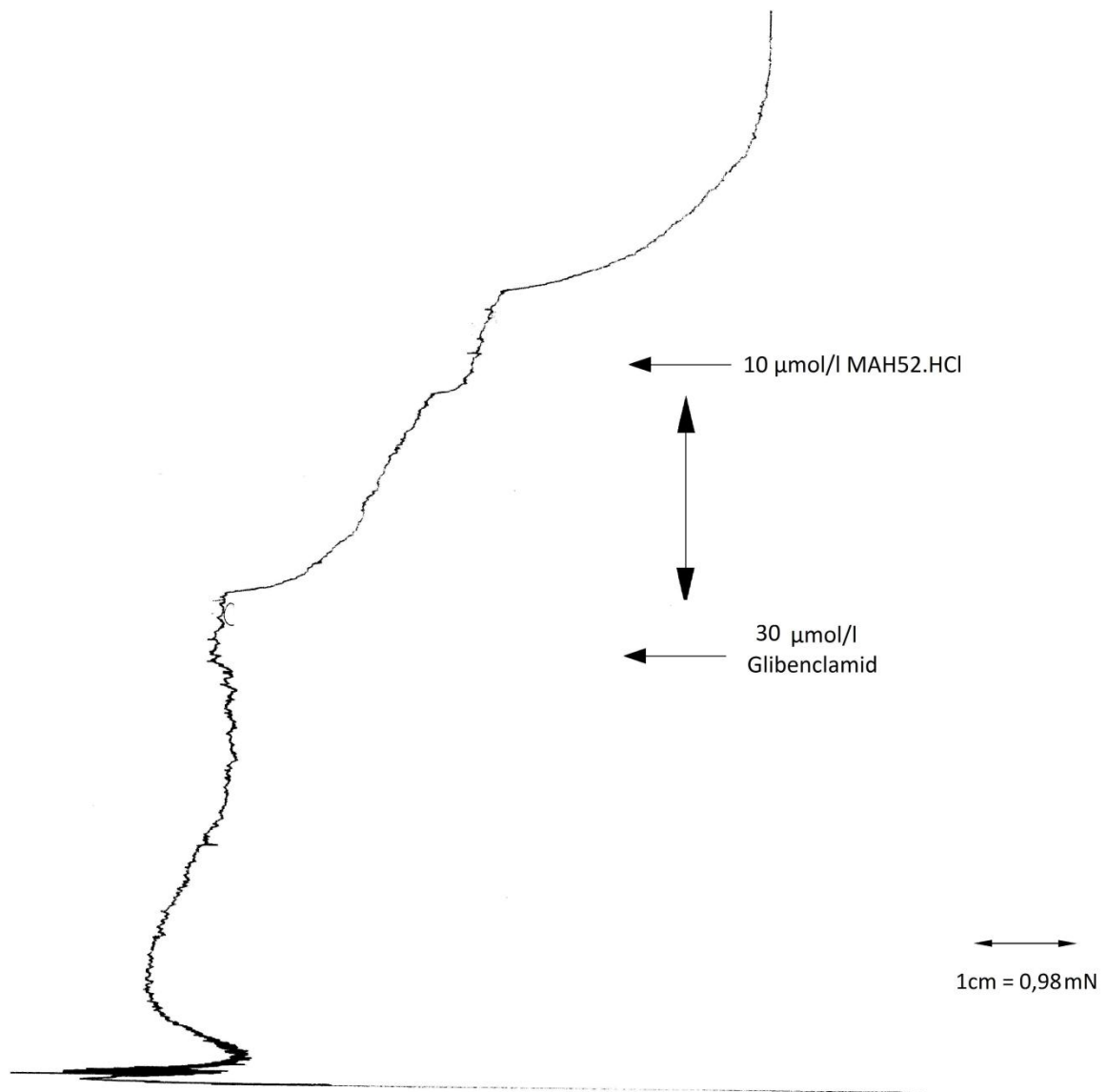


Abbildung 14: Originalverlauf Wirkmechanismus mit 30µmol/l Glibenclamid

Nach Herbeiführen einer maximalen Kontraktion des terminalen Ileums durch Kaliumchlorid-Lösung wurden am Ende der Plateauphase zunächst 30µmol/l Glibenclamid zugesetzt. Dadurch kam es bereits zu einer Abnahme der Kontraktion um ca. 37%. Durch anschließende Zugabe von 10µmol/l MAH52.HCl wurde die spasmolytische Wirkung noch zusätzlich verstärkt, es kam zu einem weiteren Kontraktionsverlust der insgesamt ca. 81% ausgehend vom Kontrollwert ausmachte.

4.2.2. Einfluss von MAH52.HCl in Kombination mit 100µmol/l Glibenclamid

Auch mit der höheren Glibenclamid-Konzentration von 100µmol/l wurden 3 Versuche durchgeführt. Dabei war der Ablauf der Versuchsreihen ident jenen Versuchen mit 30µmol/l.

Die Organe wurden auch hier zunächst mit einer Kaliumchlorid-Lösung zur maximalen Kontraktion gebracht. Anschließend wurde erneut Glibenclamid zugesetzt, allerdings in einer Konzentration von 100µmol/l. Durch den Einfluss von Glibenclamid kam es bereits zu einer Abnahme der Kontraktion von ungefähr 50%. Die nach 45 minütiger Gewöhnungsphase zugegebenen 10µmol/l an MAH52.HCl bewirkten eine zusätzliche Abnahme von ca. 38%. Dies entsprach einer auf die Kontrolle bezogene Abnahme der Kontraktion um über 88%.

Auf Grund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass die Wirkung von MAH52.HCl nicht, beziehungsweise nur in sehr geringem Ausmaß von der Öffnung ATP-abhängiger Kaliumkanäle ist.

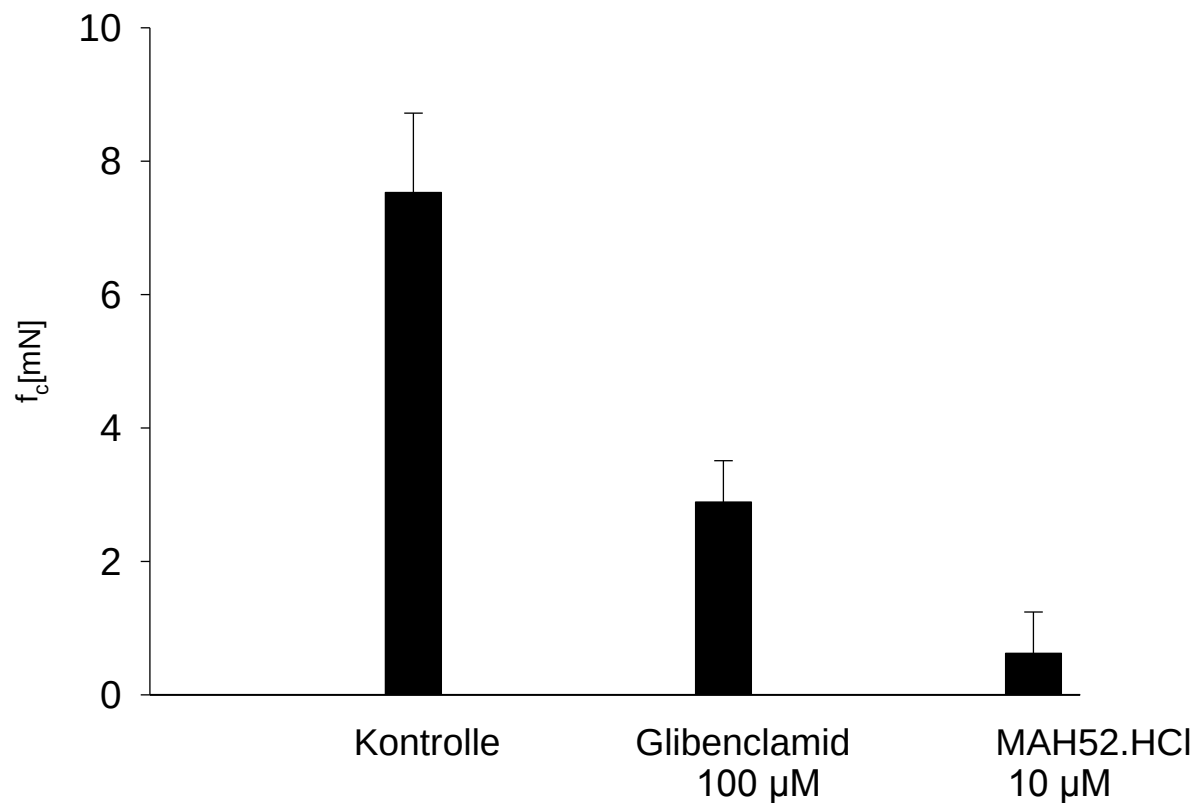
Tabelle 11: Versuchsergebnisse von MAH52.HCl auf das terminale Ileum unter Einfluss von 100µmol/l

Konzentration (µmol/l)	$F_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl Versuche (n)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$7,53 \pm 1,19$	3	-
100µmol/l Glibenclamid	$2,89 \pm 0,62$	3	-
10µmol/l MAH52.HCl	$0,62 \pm 0,62$	3	0,05

In der oberhalb abgebildeten Tabelle sind die unterschiedlichen Konzentrationen der zugegebenen Substanzen, die Mittelwert inklusive deren Standardabweichungen in Kontroll-, Glibenclamid- und Testsubstanz-Phase, sowie die Anzahl der Versuche n und die Irrtumswahrscheinlichkeit P aufgeführt.

Diagramm 7: Darstellung der Versuchsergebnisse bei 100 μ mol/l Glibenclamid mit Hilfe eines Balkendiagramms

**Terminales Ileum, Glibenclamid
MAH52.HCl, 100 μ mol/l
n=3**



Auch in Diagramm 7 sind auf der x-Achse die Konzentrationen in μ mol/l und auf der y-Achse die Konzentrationskraft in mN angeführt.

Die Balken stehen dabei von links nach rechts, für die Kontrolle, den Effekt von Glibenclamid allein, sowie den Effekt wenn zusätzlich noch die Testsubstanz MAH52.HCl zugegeben wird.

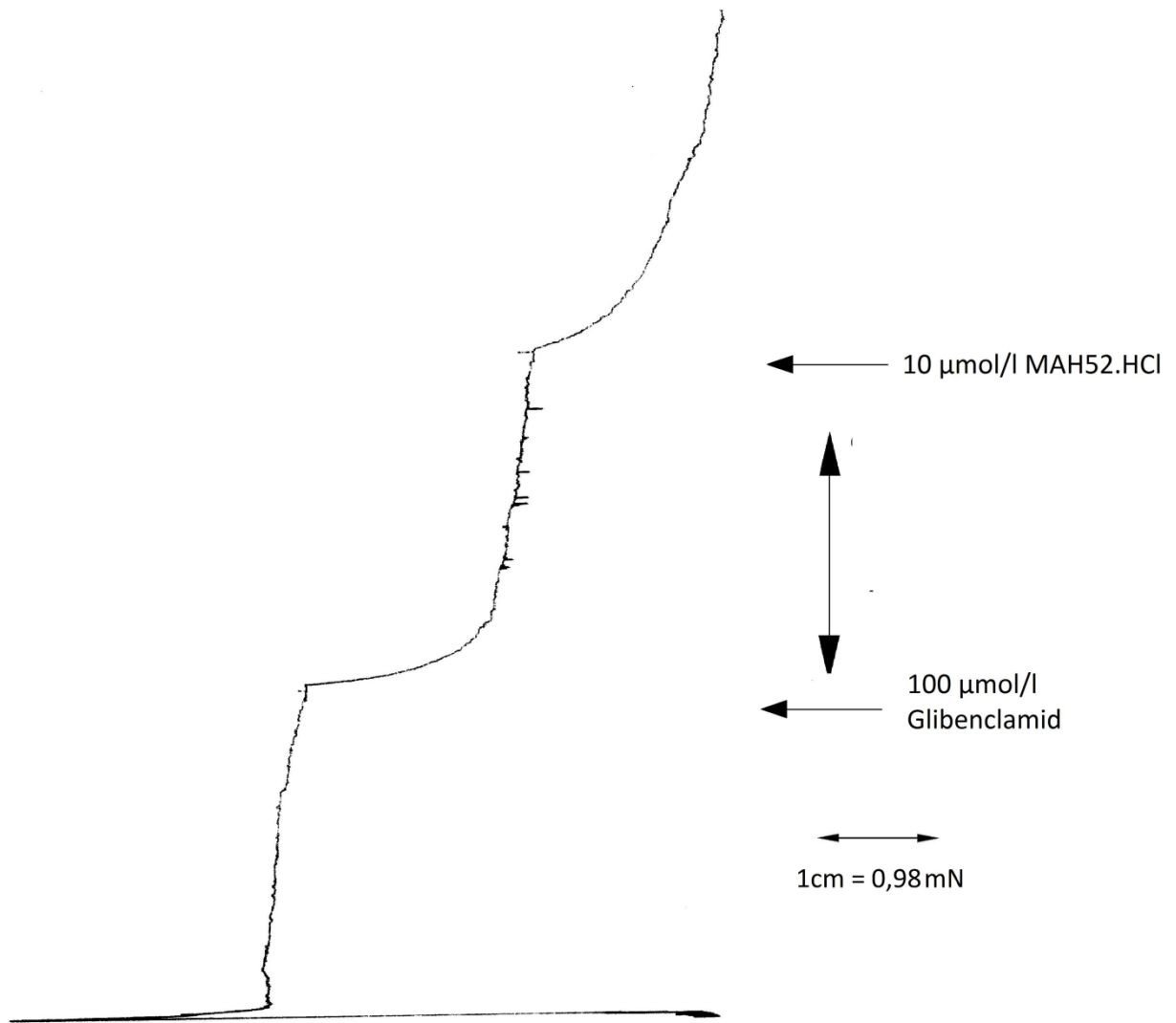


Abbildung 15: Originalverlauf Wirkmechanismus mit 100µmol/l Glibenclamid

Bei den Versuchen mit 100µmol/l Glibenclamid bestätigte sich die überaus stark spasmolytische Wirkung der Testsubstanz. Die Pfeile markieren erneut den Zeitpunkt der jeweiligen Substanz-Zugabe.

5. DISKUSSION

Das Ziel dieser Diplomarbeit war es, die Auswirkungen der neu synthetisierten Substanz MAH52.HCl auf einerseits die glatte Muskulatur von Aorta, Pulmonalis und terminalen Ileum zu testen, sowie andererseits die Wirkung auf Herzmuskelpräparate näher zu untersuchen. Was man dabei suchte, war eine Vasodilatation bzw. Spasmodolyse an der glatten Muskulatur, sowie ein Einfluss auf die Chronotropie bzw. Inotropie an der Herzmuskulatur.

Die Durchführung der einzelnen Versuchsreihen wurde bereits in Kapitel 4 ausführlich beschrieben.

5.1. Wirkung von MAH52.HCl auf die glatte Muskulatur

Während die getestete Substanz MAH52.HCl eine vergleichsweise nur moderate Wirkung auf die Aorta aufwies, konnte an der Pulmonalarterie und vor allem am terminalen Ileum eine sehr starke vasodilatierende bzw. spasmodolytische Wirkung registriert werden. Auf Grund dessen wurde das terminale Ileum auch zur Untersuchung des Wirkungsmechanismus herangezogen.

Tabelle 12: Wirkung von MAH52.HCl auf die glatte Muskulatur

Organpräparat	MAH52.HCl $F_c (\%) \pm \text{SEM}$ 100 $\mu\text{mol/l}$	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
Aorta	-100 ± 0	28
Arteria pulmonalis	$-95,16 \pm 3,03$	14,3
Terminales Ileum	-100 ± 0	8,2

Tabelle 12 stellt die Wirkung der getesteten Substanz an den glattemuskulären Organen Aorta, Pulmonalis und terminalem Ileum gegenüber. Der deutliche Unterschied in der Wirkung wurde versucht mit Hilfe der EC_{50} sowie dem Effekt der Substanz bei maximaler Dosierung von 100 $\mu\text{mol/l}$ aufzuzeigen.

5.1.1. Einfluss auf die Aorta

Von allen untersuchten Organen kam es an den Aorta-Präparaten zu der geringsten Wirkung von MAH52.HCl. Mit einer EC_{50} von $28\mu\text{mol/l}$ kam es vor allem zu Beginn der jeweiligen Versuche nur zu einem eher langsamen Abnehmen der Kontraktion. Je höher die Dosis wurde, desto stärker fiel auch die Vasodilatation aus. So war auch keines der untersuchten Präparate im Stande die finale Badkonzentration von $100\mu\text{mol/l}$ zu überleben. Sank die Kontraktion bei $3\mu\text{mol/l}$ um weniger als 10%, kam es bei einer Dosis von $30\mu\text{mol/l}$ bereits zu einer Abnahme um ca. 50%.

5.1.2. Einfluss auf die Arteria pulmonalis

Der Effekt von MAH52.HCl auf die Pulmonalarterie war von der ersten Konzentration an stark. Bereits im Verlauf der zweiten Dosis-Zugabe wurde die EC_{50} erreicht.

5.1.3. Einfluss auf das terminale Ileum

Die Untersuchung von diversen Darm-Präparaten mit der Substanz MAH52.HCl sowie auch in Kombination mit deren Antagonisten Glibenclamid, ergaben dass es sich bei der Testsubstanz um eine stark spasmolytisch wirksame Verbindung handelt.

Bereits geringe Dosen führten zu einer starken Abnahme der Kontraktion. Die maximale Abnahme der Kontraktion war noch vor Erreichen der finalen Konzentration von $100\mu\text{mol/l}$ erreicht. Eine Dosis von $30\mu\text{mol/l}$ war bereits für sämtliche durchsuchten Präparate tödlich. Die daraus resultierende EC_{50} lag bei nur $8,2\mu\text{mol/l}$.

Aus diesem Grund wurde auch der Wirkmechanismus näher am Darm untersucht.

Dabei konnte die ursprüngliche Annahme, dass die Wirkung vor allem von der Öffnung ATP-abhängiger Kalium-Kanäle herrührt, widerlegt werden. Trotz Zugabe eines Kaliumkanal-Blockers führte die Substanz zu einer starken Erweiterung der Gefäße.

5.1.4. Einfluss von MAH52.HCl auf das terminale Ileum in Gegenwart von Glibenclamid

Die Versuche der Testsubstanz am terminalen Ileum gemeinsam mit Glibenclamid haben deutlich gemacht, dass der Wirkmechanismus offenbar nicht vorrangig von einer Öffnung ATP-abhängiger Kalium-Kanäle herrührt.

Wie bereits zuvor erwähnt wurden 2 Versuchsreihen, eine mit 30µmol/l und eine mit 100µmol/l Glibenclamid in Verbindung mit jeweils 10µmol/l MAH52.HCl durchgeführt. Es zeigte sich, dass es durch den Kaliumkanalblocker zu einer Abschwächung der Wirkung der untersuchten Substanz kam. Daher ist davon auszugehen, dass die Rolle der ATP-abhängigen Kalium-Kanäle im Bezug die Wirkung von H₂S eher eine untergeordnete Rolle spielt.

Diese Annahme wird jedoch von diversen Studien widerlegt. So resultiert laut Ahmad et al. Die Zufuhr von exogenem H₂S in einer deutlichen Blutdruck-Senkung bei Ratten.

Bereits 1997 zeigten Hosoki et al eine in vitro vasodilatierende Wirkung von H₂S an den Aorten von Ratten.

Zusätzlich gilt H₂S als protektives Antioxidans, vor allem in niedrigen Konzentrationen, welches auch als Prototyp für neue antihypertensive Strategien, sowohl zur Therapie als auch zur Prophylaxe geeignet sein soll. Die Wirkung soll dabei sehr wohl durch die Öffnung ATP-abhängiger Kalium-Kanäle zustande kommen (Bielenberg 2011).

Diverse andere Studien sind ebenfalls zum Schluss gekommen, dass der Wirkmechanismus über die Öffnung der Kalium-Kanäle erklärt werden kann (Zhao et al. 2001, Li et al. 2008, Linden et al. 2008).

Höchstwahrscheinlich basiert die Wirkung neben der Öffnung von Kalium-Kanälen auch auf anderen Wegen. So zeigt eine Studie nach Emmanuelle et al.(2011), dass es über H₂S zu einer Aktivierung der Phospholipase A₂ kommen kann. Daraus folgt wiederum die Freisetzung von Arachidonsäure, was nach anfänglicher Vasokonstriktion in einer Vasodilatation mündet.

Eine Beteiligung des NO-Systems an der Wirkung gilt auch als erwiesen, wie 2010 durch Elsey et al. Auch eine Hemmung des Angiotensin-Converting Enzyms durch H₂S wurde bereits aufgezeigt. Dies soll durch die Bindung des zentralen Zink-Atoms in ACE möglich sein. Folglich wäre der vasodilatierende Effekt auch über die verminderte

Freisetzung von Angiotensin 2 sowie die Hemmung des Bradykinin-Abbaus erklärbar (Laggner et al., 2007).

5.2. Einfluss auf die Herzmuskulatur

Die in dieser Diplomarbeit untersuchten Organe waren der rechte Vorhof sowie der Papillarmuskel. An jedem der beiden Organe wurden 4 Versuche durchgeführt, in welchem die Einwirkung der Testsubstanz näher betrachtet wurde.

Dabei zielte man beim Vorhof auf eine negative Chronotropie, beim Papillarmuskel auf eine negative Inotropie ab. Es zeigte sich, dass die Substanz auf beide Organe eine starke Wirkung besitzt. So lag die EC_{50} im Fall des rechten Vorhofs bei $13,3\mu\text{mol/l}$, beim Papillarmuskel wurde eine EC_{50} von $3,3\mu\text{mol/l}$ ermittelt.

Die Wirkung auf den Papillarmuskel war also deutlich stärker bzw. signifikanter.

Tabelle 13: Wirkung von MAH52.HCl auf die Herzmuskulatur

Organpräparat	MAH52.HCl $F_c (\%) \pm \text{SEM}$ $100\mu\text{mol/l}$	$EC_{50} (\mu\text{mol/l})$
Atrium cordis dextrum	-100 ± 0	13,3
Musculus papillaris	$-99,86 \pm 1,14$	3,3

Die untersuchte Substanz wies bei allen Herzpräparaten eine überaus starke Wirkung auf. So kam es beim rechten Vorhof zu solch einer starken negativ chronotropen Wirkung, dass die Amplituden mit jeder zugegebenen Dosis stark abnahmen und keines der untersuchten Organe eine Dosis von $30\mu\text{mol/l}$ überlebte.

Obwohl die EC_{50} am Papillarmuskel bedeutend geringer war als jene am Vorhof, überlebten die Organe die Badkonzentration von $30\mu\text{mol/l}$ an MAH52.HCl. Bei $100\mu\text{mol/l}$ überlebte allerdings nur mehr eines der untersuchten Organe.

5.2.1. Einfluss auf den rechten Vorhof

Die Versuche am Vorhof brachten statistisch hoch signifikante Ergebnisse. Die Chronotropie nahm mit jeder zugesetzten Konzentration stark ab. Wurde zu Beginn noch ein Kontrollwert von $171 \pm 13,29$ Schlägen pro Minute ermittelt, so lag dieser nach nur $3\mu\text{mol/l}$ MAH52.HCl bereits nur mehr bei 82,95% des Anfangswertes. Der Effekt war sogar so stark, dass wie bereits erwähnt sämtliche Organe bei einer Gesamtkonzentration von $30\mu\text{mol/l}$ frühzeitig abgestorben sind.

5.2.2. Einfluss auf den Papillarmuskel

Von allen untersuchten Organen, egal ob glattmuskulär oder die Organe der Herzmuskulatur, hatte die Substanz am Papillarmuskel die geringste EC_{50} . Diese lag, wie in Tabelle 13 ersichtlich, bei nur $3,3\mu\text{mol/l}$ MAH52.HCl.

Als Folge dieser überaus großen Sensitivität des Papillarmuskels gegenüber der Testsubstanz kam es bereits bei einer Konzentration von $3\mu\text{mol/l}$ zu einer beinahe 50%igen Abnahme der Kontraktionskraft, von anfänglich $3,38 \pm 0,65$ mN auf $1,77 \pm 0,37$ mN. Die finale Amplitude, also zum Zeitpunkt der letzten zugegebenen Konzentration entsprach mit $0,25 \pm 0,02$ nur mehr 1,14% und war kaum noch erfassbar. Die Wirkung am Papillarmuskel war also effektiver als beim Vorhof, jedoch scheint das Gewebe des Papillarmuskels widerstandsfähiger zu sein als jenes am Vorhof.

6.ZUSAMMENFASSUNG

Diese Diplomarbeit befasst sich mit der genaueren Untersuchung der Schwefelwasserstoff freisetzenden, neu synthetisierten Verbindung MAH52.HCl, sowie deren Wirkung im Bezug auf ausgewählte Organe von Meerschweinchen. Hierzu wurden einerseits glattmuskuläre Organe verwendet. Genauer die Aorta descendens, Arteria pulmonalis und das terminale Ileum. Zusätzlich untersuchte man die Substanz auch am Atrium cordis dextrum sowie am Musculus papillaris, welche beide der Herzmuskulatur angehören.

Ziel war es die Wirkungen von MAH52.HCl näher zu analysieren, vor allem im Hinblick auf eine vasodilatierende bzw. spasmolytische Wirkung an der glatten Muskulatur, sowie auf eine negativ chronotrope bzw. inotrope Wirkung an den Organen der Herzmuskulatur.

Zur Durchführung der Versuche wurden die Organe täglich frisch entnommen, präpariert und in die entsprechenden Versuchs-Apparaturen eingespannt. Anschließend wurden die Organe in Tyrode (Nährlösung) eingebracht und mittels Oxymix begast.

Die untersuchte Substanz MAH52.HCl ist wasserlöslich und wurde nach einer Eingewöhnungsphase des Organs kumulativ in 4 verschiedenen Konzentrationen ins Organbad pipettiert. Dabei wurde großer Wert auf Reproduzierbarkeit gelegt, weshalb vor Beginn jedes Versuchs eine dem Organ entsprechende Vorspannung angelegt worden ist. Das mechanische Signal, dass vom Organ ausgesendet wurde, wurde in ein elektrisches umgewandelt und verstärkt, sowie von einem Schreiber erfasst und festgehalten. Die ermittelten Daten wurden anschließend mittels Konzentrations-Wirkungskurven ausgewertet.

Prinzipiell ist zu sagen, dass die Testsubstanz MAH52.HCl auf sämtliche Organe eine effektive Wirkung besitzt. Es konnte an jedem Organ eine EC_{50} ermittelt werden, also jene Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ bei der die Hälfte des Ausgangswerts (Kontrollwert) erreicht wird.

Die stärkste Wirkung wurde dabei am Papillarmuskel festgestellt, bei welchem eine EC_{50} von gerade einmal $3,3\mu\text{mol/l}$ ermittelt wurde. Auch am Vorhof wurde mit einer EC_{50} von $13,3\mu\text{mol/l}$ eine signifikante Wirkung beobachtet.

MAH52.HCl entfaltete also auf die gesamte untersuchte quergestreifte Muskulatur eine überaus starke Wirkung.

An der glatten Muskulatur zeigte sich vor allem am Darm eine hohe Effektivität, welche sich in einer EC_{50} von $8,2\mu\text{mol/l}$ niederschlug. Neben dem Darm zeigte sich mit einer EC_{50} von $14,3\mu\text{mol/l}$ auch an der Pulmonalarterie eine hohe Wirksamkeit der Substanz. Den geringsten Effekt erzielte MAH52.HCl mit Abstand an der Aorta. Allerdings war auch hier das Erreichen einer EC_{50} bereits nach der dritten zugegebenen Konzentration erreicht.

Auf Grund der Sensitivität des terminalen Ileums für die Substanz wurde hier auch versucht den Wirkmechanismus genauer zu durchleuchten. Dazu wurde beobachtet, wie die Wirkung der Substanz in Gegenwart eines Kalium-Kanalblockers, in diesem Fall Glibenclamid, am terminalen Ileum reagiert. Da es zu einer Verminderung der Aktivität von MAH52.HCl durch Glibenclamid kam, ist davon auszugehen dass der Wirkmechanismus nur sehr bedingt von der Öffnung ATP-abhängiger Kalium-Kanäle abhängig ist.

Eine genauere Aufklärung des Wirkmechanismus bedarf deshalb weiterer Untersuchungen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Ahmad FU, Sattar MA, Rathore HA, Abdullah MH, Tan S, Abdullah NA, Johns EJ. Exogenous hydrogen sulfide (H₂S) reduces blood pressure and prevents the progression of diabetic nephropathy in spontaneously hypertensive rats. 2012;34(2):203-10

Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (2005) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 9.Auflage, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag München

David J Elsey, Robert C Fowkes, Gary F Baxter. Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide; Cell Biochemistry and Function. 2010, Vol. 28, No. 2: 95-106

Ehlers Eberhard (2003), Chemie 1 Kurzlehrbuch Allgemeine und anorganische Chemie, 8.Auflage, Deutscher Apothekerverlag Stuttgart

d'Emmanuele di Villa Bianca R. Sorrentino R. Mirone V. Cirino G. Hydrogen sulfide and erectiel function: A novel therapeutic target. Nat Rev Urol. 2011;8:286-289

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

Gallwitz Baptist, Dirk Müller-Wieland, Hans-Ulrich Häring, Klaus-Henning Usadel (2011) Diabetologie in Klinik und Praxis. Georg Thieme Verlag. 168 zitiert nach: P.J. Bijlstra, J.A. Lutterman, F.G.M. Russel, T. Thien und P. Smits, (1996) Diabetologia, Interaction of sulphonylurea derivates with vascular ATP-sensitive potassium channels in humans

Greten Heiner, Franz Rinninger, Tim Greten (2010) Innere Medizin. Georg Thieme Verlag. 629

Hunnius. Pharmazeutisches Wörterbuch (2004) Walter de Gruyter, 9.Auflage.455

Holleman Arnold F., Egon Wiberg, Nils Wiberg (1995) Lehrbuch der anorganischen Chemie. 101.Auflage. Walter de Gruyter 556

Hosoki, R., Matsuki, N. and 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

Huang J, Wang D, Zheng J, Huang X, Jin H. Hydrogen sulfide attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis induced by abdominal aortic coarctation in rats 5(4):923-8

Jens Bielenberg (2011) TRP-Kanäle, Hanser Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart, GmbH & Co.KG, 32:11-14, DOI: 10.10T5/S-0031-1271316

Klebe Gerhard (2009) Wirkstoffdesign. Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen. Gabler Wissenschaftsverlage. 536-538

Laggner, H., Hermann, M., Esterbauer, H., Muellner, M. K., Exner, M., Gmeiner, B. M. and Kapiotis, S. (2007). The novel gaseous vasorelaxant hydrogen sulfide MI. inhibits angiotensin-converting enzyme activity of endothelial cells. J. Hypertens. 25, 2100-2104.

Larsen Reinhard (2011) Anästhesie. Elsevier, Urban & Fischer Verlag. 4

Lavu M, Bhushan S, Lefer DJ. Hydrogen sulfide-mediated cardioprotection: mechanisms and therapeutic potential. 120(6):219-29

Liebl Andreas, Eric Martin (2005) Diabetes mellitus Typ 2, Govi-Verlag Eschborn. 41

Linden, D. R., Sha, L., Mazzone, A., Stoltz, G. J., Bernard, C. E., Furne, J. K., Levitt, M. D., Farrugia, G. and Szurszewski, J. H. (2008). Production of the gaseous signal molecule hydrogen sulfide in mouse tissues. J. Neurochem. 106,1577-1585.

Lüllmann Heinz, Klaus Mohr, Lutz Hein (2010) Pharmakologie und Toxikologie. Georg Thieme Verlag. 558

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

Rong-na L, Xiang-jun Z, Yu-han C, Ling-qiao L, Gang H. Interaction between hydrogen sulfide and nitric oxide on cardiac protection in rats with metabolic syndrome. 2011; 33(1): 25-32

Thews G, Mutschler E, Vaupel P (1999). Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Vohr Hans-Werner (2012) Toxikologie. John Wiley & Sons

Wang X, Wang Q, Guo W, Zhu YZ. Hydrogen sulfide attenuates cardiac dysfunction in a rat model of heart failure: a mechanism through cardiac mitochondrial protection. 31(2):87-98

Weismann Dieter (2007) Sulfid-Praxishandbuch der Abwassertechnik. Vulkan-Verlag 134

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

8. CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name:	Maximilian Rod
Geburtsdatum:	8. August 1988
Geburtsort:	Wien
Familienstand:	Ledig
Staatsbürgerschaft:	Österreich
Religionsbekenntnis:	Römisch-katholisch
Eltern:	Gerhard und Roswitha Rod
Geschwister:	Stephanie und Robert Rod

Ausbildung

Seit Juni 2012	Diplomarbeit am Department für Pharmakologie und Toxikologie
2007-2013	Skilehrer in der Skischule Wagrain
2006 – heute	Angestellter: Apotheke zur Heiligen Brigitta, 1200 Wien
Seit WS 2006	Studium der Pharmazie an der Universität Wien
1998-2006	Bundesgymnasium und Bundesrealgymnasium GRG 19,1190 Wien
1994-1998	Volksschule St. Elisabeth, 1020 Wien