



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT/ DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit/ Title of the Diploma Thesis

„Pharmakologisches Profil eines neu synthetisierten  
Thioamid-Derivates (MAH70.HCl) an isolierten  
Meerschweinchenorganen“

verfasst von/ submitted by

Julia Nagl

angestrebter akademischer Grad/ in partial fulfilment of the requirements for the degree of  
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien/ Vienna, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt/  
degree programme code as it  
appears on the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt/  
degree programme code as it  
appears on the student record  
sheet:

Pharmazie

Betreut von/ Supervisor:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

# Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei dem Betreuer meiner Diplomarbeit Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Mag. Michael Hintersteiner und Ao. Univ.-Prof. Dr. Thomas Erker für die Synthese und Bereitstellung der Testsubstanz.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinen Diplomarbeitkollegen Rafael und Tobias bedanken, die immer für gute Stimmung sorgten, und bei allen Freunden, die mir immer zur Seite standen.

Danke Stefan, Rommi, Nadin, Julia, Sabine, Markus, Johannes, Petra.....

Der größte Dank gebührt natürlich meinen Eltern und Geschwistern Bernhard und Martin, die mich stets unterstützt, motiviert und gefördert haben. DANKE

# INHALTSVERZEICHNIS

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>1</b>   | <b>EINLEITUNG</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>SCHWEFELWASSERSTOFF</b> .....                                   | <b>1</b>  |
| 1.1.1      | <i>Chemische Charakteristika</i> .....                             | 1         |
| 1.1.2      | <i>Toxikologische Wirkung</i> .....                                | 1         |
| 1.1.3      | <i>Endogene Synthese von Schwefelwasserstoff</i> .....             | 2         |
| 1.1.4      | <i>Pathophysiologische Bedeutung von Schwefelwasserstoff</i> ..... | 2         |
| <b>1.2</b> | <b>BETA-ADRENOZEPTOR-BLOCKER</b> .....                             | <b>3</b>  |
| 1.2.1      | <i>chemische Unterscheidung</i> .....                              | 3         |
| 1.2.2      | <i>Selektivität</i> .....  | 3         |
| 1.2.3      | <i>Indikation</i> .....  | 4         |
| 1.2.4      | <i>Nebenwirkungen</i> .....  | 5         |
| <b>2</b>   | <b>ZIELSETZUNG</b> .....   | <b>6</b>  |
| <b>3</b>   | <b>MATERIAL UND METHODIK</b> .....                                 | <b>7</b>  |
| <b>3.1</b> | <b>VERSUCHSVORBEREITUNG</b> .....                                  | <b>7</b>  |
| 3.1.1      | <i>Testsubstanz</i> .....  | 7         |
| 3.1.2      | <i>Versuchstiere</i> .....   | 8         |
| 3.1.3      | <i>Nährlösung</i> .....  | 8         |
| 3.1.4      | <i>Kaliumchlorid Lösung</i> .....                                  | 9         |
| <b>3.2</b> | <b>VERWENDETE APPARATUREN</b> .....                                | <b>10</b> |
| 3.2.1      | <i>Apparatur A</i> .....   | 10        |
| 3.2.2      | <i>Apparatur B</i> .....   | 11        |
| 3.2.3      | <i>Der Kraftwandler</i> .....                                      | 12        |
| 3.2.4      | <i>Zufuhr von Oxymix</i> .....                                     | 13        |
| <b>3.3</b> | <b>PRÄPARATION DER ORGANE</b> .....                                | <b>13</b> |
| 3.3.1      | <i>Verwendete Materialien</i> .....                                | 14        |
| 3.3.2      | <i>Präparation des rechten Vorhofs</i> .....                       | 14        |
| 3.3.3      | <i>Präparation des Truncus pulmonalis</i> .....                    | 15        |
| 3.3.4      | <i>Präparation des Papillarmuskels</i> .....                       | 16        |
| 3.3.5      | <i>Präparation des terminalen Ileums</i> .....                     | 18        |
| 3.3.6      | <i>Präparation der Aorta</i> .....                                 | 19        |
| <b>3.4</b> | <b>VERSUCHSDURCHFÜHRUNG</b> .....                                  | <b>21</b> |
| 3.4.1      | <i>Pipettierschema</i> .....                                       | 21        |
| 3.4.2      | <i>Versuchsdurchführung am Vorhof</i> .....                        | 22        |
| 3.4.3      | <i>Versuchsdurchführung am Papillarmuskel</i> .....                | 23        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 3.4.4      | <i>Versuchsdurchführung am Truncus pulmonalis und der Aorta descendens</i> ..... | 24        |
| 3.4.5      | <i>Versuchsdurchführung am terminalen Ileum</i> .....                            | 25        |
| <b>3.5</b> | <b>WIRKMECHANISMUS</b> .....   | <b>26</b> |
| 3.5.1      | <i>Herstellung der Testlösung von Glibenclamid</i> .....                         | 26        |
| 3.5.2      | <i>Versuchsdurchführung mit Glibenclamid</i> .....                               | 27        |
| <b>3.6</b> | <b>AUSWERTUNG</b> .....  | <b>27</b> |
| 3.6.1      | <i>Auswertung der Präparate</i> .....  | 27        |
| 3.6.1.1    | <i>Auswertung des Vorhofes</i> .....   | 27        |
| 3.6.1.2    | <i>Auswertung des Papillarmuskels</i> .....                                      | 28        |
| 3.6.1.3    | <i>Auswertung von Aorta, terminalem Ileum und Truncus pulmonalis</i> .....       | 29        |
| 3.6.1.4    | <i>Auswertung des Wirkmechanismus</i> .....                                      | 29        |
| 3.6.2      | <i>Computergestützte Auswertung</i> .....  | 29        |
| <b>4</b>   | <b>ERGEBNISSE</b> .....  | <b>31</b> |
| <b>4.1</b> | <b>ERGEBNISSE VON MAH70.HCL</b> .....  | <b>32</b> |
| 4.1.1      | <i>Rechter Vorhof</i> .....  | 32        |
| 4.1.2      | <i>Papillarmuskel</i> .....  | 35        |
| 4.1.3      | <i>Truncus pulmonalis</i> .....  | 38        |
| 4.1.4      | <i>Aorta</i> .....   | 41        |
| 4.1.5      | <i>Terminales Ileum</i> .....  | 44        |
| <b>4.2</b> | <b>ERGEBNISSE DES WIRKMECHANISMUS</b> .....                                      | <b>47</b> |
| 4.2.1      | <i>Ergebnisse mit 30µmol/l Glibenclamid</i> .....                                | 48        |
| 4.2.2      | <i>Ergebnisse mit 100µmol/l Glibenclamid</i> .....                               | 51        |
| <b>5</b>   | <b>DISKUSSION</b> .....  | <b>54</b> |
| 5.1        | <i>WIRKUNG VON MAH70.HCL AUF DIE PRÄPARATE MIT GLATTER MUSKULATUR</i> .....      | 54        |
| 5.1.1      | <i>Wirkungen von MAH70.HCL auf den Truncus pulmonalis</i> .....                  | 54        |
| 5.1.2      | <i>Wirkung von MAH70.HCL auf die Aorta descendens</i> .....                      | 55        |
| 5.1.3      | <i>Wirkung von MAH70.HCL auf das terminale Ileum</i> .....                       | 55        |
| 5.2        | <i>WIRKUNGEN VON MAH70.HCL AUF DIE HERZMUSKULATUR</i> .....                      | 56        |
| 5.2.1      | <i>Wirkungen von MAH70.HCL auf das Atrium dextrum</i> .....                      | 57        |
| 5.2.2      | <i>Wirkungen von MAH70.HCL auf den Musculus papillaris</i> .....                 | 57        |
| 5.3        | <i>BEURTEILUNG DER ERGEBNISSE DES WIRKMECHANISMUS</i> .....                      | 58        |
| <b>6</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....   | <b>60</b> |
| <b>7</b>   | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....  | <b>62</b> |
| <b>8</b>   | <b>CURRICULUM VITAE</b> .....  | <b>64</b> |

# 1 Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die möglichen Wirkungen einer Substanz getestet, deren Wirkung eventuell auf der Freisetzung von Schwefelwasserstoff beruhen könnte. Die zu untersuchende Substanz wurde in ex vivo Versuchen an isolierten Organen von Meerschweinchen getestet.

## 1.1 Schwefelwasserstoff

### 1.1.1 Chemische Charakteristika

Zu den Charakteristika von Schwefelwasserstoff zählen die Farblosigkeit des Gases, ein charakteristischer Geruch, sowie die hohe Toxizität des Gases (Auterhoff 1999).

Schwefelwasserstoff wird aus Eisen(II)-sulfid und Salzsäure gewonnen. Große Mengen des Stoffes werden durch die Entschwefelung von Erdöl gewonnen (Mortimer 2007).

Eine natürliche Quelle für Schwefelwasserstoff in der Natur ist die Entstehung des Gases durch Fäulnisprozesse in organischen Stoffen (Ammon 2004).

### 1.1.2 Toxikologische Wirkung

Eine Vergiftung mit Schwefelwasserstoff führt schon bei einem Wert von 400ppm zu starken Schäden, während eine Dosis von 800ppm bereits zum Tod führen kann. Grund für die Toxizität ist die Blockade sauerstoffübertragender Enzyme (Auterhoff 1999).

Von einer Vergiftung betroffen sind das zentrale Nervensystem, sowie der Atemtrakt. Zunächst kommt es zu Hyperpnoe, Schwäche, Krämpfe und Reizerscheinungen im Bereich des Atemtraktes. In höheren Konzentrationen tritt der Tod durch zentrale Atemlähmung ein (Aktories 2013).

### 1.1.3 Endogene Synthese von Schwefelwasserstoff

Auch im Organismus von Säugetieren kommt es zur Produktion von Hydrogensulfid, das die Funktion eines Botenstoffes im Organismus übernimmt (Wang R. 2002).

Für die endogene Erzeugung von Schwefelwasserstoff sind vor allem die Cystathion- $\beta$ -Synthase (CBS), als auch die Cystathion- $\gamma$ -Lyase (CSE) verantwortlich (Liu et al. 2009, – Wagner et al. 2009, – Yang et al. 2008).

Eine Studie von Yang et al. (2011) fand heraus, dass die Produktion von Schwefelwasserstoff im Nervensystem hauptsächlich über das Enzym CBS stattfindet, während CSE für einen Großteil der Produktion im kardiovaskulären System verantwortlich ist (Yang et al. 2011).

H<sub>2</sub>S wird in den glatten Muskelzellen des Ileums, der Pfortader und der thorakalen Aorta produziert und führt dort zu einer Relaxation der Muskulatur (Hosoki et al. 1997).

Eine mögliche Erklärung für den Wirkmechanismus von H<sub>2</sub>S ist die Aktivierung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen und eine damit verbundene Hyperpolarisation von glattmuskulären Zellmembranen (Zhao et al. 2001).

### 1.1.4 Pathophysiologische Bedeutung von Schwefelwasserstoff

Eine Abweichung von der endogenen Schwefelwasserstoffkonzentration führt zu verschiedenen pathologischen Prozessen.

Eine Studie von Yan et al. (2003) forschte an der Rolle von H<sub>2</sub>S bei der Entstehung von Bluthochdruck. Diese Studie kam zu dem Ergebnis, dass die Genexpression des Enzyms CSE und dessen Aktivität in der thorakalen Aorta bei Ratten mit Hypertension verringert war und damit verbunden auch die Plasmakonzentration von Schwefelwasserstoff. Durch die Verabreichung von H<sub>2</sub>S konnte der Plasmaspiegel wieder erhöht werden. Weitere Effekte der Schwefelwasserstoffgabe waren die Abnahme des Remodellings der Aorta sowie die Senkung des Blutdrucks durch eine Steigerung der CSE-Aktivität (Yan et al. 2003).

Andere Studien beschäftigten sich mit der Rolle von H<sub>2</sub>S an der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen.

Da während eines Ischämischen Infarktes die Aktivität der Beta-Rezeptoren am Herzen erhöht, und die Konzentration von Hydrogensulfid erniedrigt ist, beschäftigte sich die Studie von Yong et al. (2008) mit der Wirkung von H<sub>2</sub>S auf Beta-Rezeptoren im Herzen von Ratten. Dabei fand man heraus, dass Hydrogensulfid die Wirkung von Isoproterenol, einem Beta-Rezeptor Agonisten, abschwächt. Es wurde herausgefunden, dass der negative Effekt von Hydrogensulfid auf die Beta-Rezeptoren möglicherweise durch die Inhibition der Adenylcyclase-Aktivität zu Stande kommt (Yong et al. 2008).

## 1.2 Beta-Adrenozeptor-Blocker

Beta Blocker sind Arzneistoffe, die eine Wirkung auf die den Sympathikus haben. Eingesetzt werden diese Substanzen bei kardiovaskulären Erkrankungen, als Antihypertensiva und zur Therapie des chronischen Offenwinkelglaukoms (Aktories 2013).

### 1.2.1 chemische Unterscheidung

Es gibt eine Vielzahl von Beta-Blockern die Anhand der chemischen Struktur in 2 verschiedene Gruppen unterteilt werden können. Zum einen gibt es Beta Blocker mit Phenylethylamin-Struktur. Ein Wirkstoff, der zu dieser Gruppe gehört ist Sotalol. Die zweite Gruppe stellen jene Beta Blocker mit Aryloxyaminopropanol-Struktur da. Ein Vertreter dieser Gruppe ist Propranolol (Steinhilber et al. 2010).

### 1.2.2 Selektivität

β-Rezeptoren finden sich sowohl im Herzmuskelgewebe und in den Bronchien. Am Herzen überwiegen die β<sub>1</sub>-Rezeptoren, während an den Bronchien β<sub>2</sub>-Rezeptoren vermehrt vorkommen. Die Blockade von β<sub>1</sub>-Rezeptoren führt zu einem negativ chronotropen und negativen inotropen Effekt, der bei der Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen erwünscht ist. An den Bronchien führt eine Blockade der β<sub>2</sub>-Rezeptoren zu einer Konstriktion. Für therapeutische Zwecke ist es von Vorteil, einen Wirkstoff zu haben, der eine möglichst selektive Wirkung aufweist. Daher hat man versucht Beta-Blocker zu entwickeln, die eine selektive Wirkung auf β<sub>1</sub>-Rezeptoren haben.

Die Selektivität wird durch die Einführung spezieller Substituenten erhöht. Zum einen führt ein Substituent in *para*-Stellung zu einer Erhöhung der Selektivität und zum anderen kann man auch elektronenziehende Substituenten in *ortho*-Position einführen. Zur Gruppe der  $\beta_1$ -selektiven Beta Blocker gehören unter anderem Atenolol, Metoprolol und Nebivolol (Steinhilber et al. 2010).

### 1.2.3 Indikation

Im Hinblick auf die Relevanz von Hydrogensulfit auf das kardiovaskuläre System werden hier nur die Indikationen von Beta Blockern auf dieses System dargestellt.

Ein Anwendungsgebiet ist die Antihypertensive Therapie. Sehr gute Ergebnisse werden bei der Therapie von Patienten mit erhöhter Sympathikus Aktivität erzielt. Die Wirkung der Beta Blocker kommt möglicherweise durch die Verringerung des Herzzeitvolumens oder die Reduktion der Renin Freisetzung in der Nebennierenrinde. Weitere potentielle Wirkmechanismen sind die Inhibition präsynaptischer  $\beta$ -Rezeptoren und die Abnahme von sympathischen Impulsen (Mutschler et al. 2013).

Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Prophylaxe eines Angina pectoris Anfalls. Durch die Blockade der  $\beta$ -Rezeptoren kommt es zu einem negativ chronotropen und einem negativ inotropen Effekt, was zu einer Senkung des Sauerstoffverbrauches am Herzen führt (Mutschler et al. 2013)

Für die Therapie der Herzinsuffizienz sind Beta-Blocker ein wichtiger Bestandteil. Hier erzielen die Beta Blocker ihren Effekt durch die up-Regulation der Anzahl von  $\beta$ -Rezeptoren und die Verringerung der Apoptose von Herzmuskelzellen (Mutschler et al. 2013).

Des Weiteren werden Beta Blocker bei Herzrhythmusstörungen eingesetzt. Bei der Therapie der Herzinsuffizienz wird die negativ inortope und negativ chronotrope Wirkung von Beta Blockern ausgenützt. Es kommt auch zu einer Verzögerung der Überleitungsgeschwindigkeit am AV-Knoten (Aktories et al. 2013).

#### 1.2.4 Nebenwirkungen

Zu den unerwünschten Arzneimittelwirkungen der Beta Blocker zählen Bradykardie und AV-Block. Durch die Blockade von vaskulären  $\beta$ -Rezeptoren kommt es zu Kältegefühl in den Extremitäten und es kann zu einer Verschlechterung einer Ischämie kommen. Wegen der Blockade von  $\beta_2$ -Rezeptoren kann dies zu einer Bronchokonstriktion führen. Des Weiteren können Beta Blocker zu Kaschierung eines hypoglykämischen Zustandes kommen (Aktories et al. 2013)

## 2 Zielsetzung

Der praktische Teil dieser wissenschaftlichen Arbeit zielt darauf ab, die Testsubstanz MAH70.HCl auf die Wirkung an verschiedenen isolierten Organen zu testen. Auf Grund ähnlicher anatomischer und metabolischer Verhältnisse wurden für die Versuche Organe von Meerschweinchen verwendet.

Neben den Versuchen zur Wirkung wurde auch eine Versuchsreihe zur Klärung eines möglichen Wirkmechanismus über die Öffnung ATP-abhängiger Kaliumkanäle durchgeführt.

Um die Wirkung zu testen wurden Präparate der Aorta descendens, des Truncus pulmonalis, des terminalen Ileums sowie des Atrium dextrum cordis und des Musculus papillaris angefertigt.

An den Präparaten der Aorta und der Pulmonalarterie testete man die Substanz MAH70.HCl auf eine mögliche Vasodilatation. Der Dünndarm wurde für die Untersuchung eines spasmolytischen Effektes herangezogen und an den Herzpräparaten untersuchte man die Wirkung auf die Chronotropie (Vorhof) und die Inotropie (Papillarmuskel).

Zu den einzelnen Organen wurde jeweils eine Versuchsreihe durchgeführt, bei denen auf eine korrekte Handhabung der Geräte und eine genaue Präparation geachtet wurde, um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Die Versuche wurden ausgewertet und graphisch dargestellt. Für jede Versuchsreihe wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve erstellt und bei einer ausreichend starken Wirkung ein  $EC_{50}$ -Wert ermittelt. Für einen therapeutischen Einsatz der Substanz sind niedrige  $EC_{50}$ -Werte erforderlich, da dies einen ausreichenden Effekt bei niedriger Dosierung ermöglicht, und dadurch das Risiko des Auftretens möglicher Nebenwirkungen reduziert werden würde.

Für die Untersuchung des Wirkmechanismus muss ein Organ gewählt werden, bei dem durch den Einfluss der Substanz MAH70.HCl ein  $EC_{50}$ -Wert ermittelt werden kann. In diesem Fall wurde hierfür das terminale Ileum verwendet, da an diesem Präparat die Voraussetzungen erfüllt wurden. Zur Interpretation des Wirkmechanismus wurde ein Balkendiagramm erstellt, an dem abgelesen werden kann, ob die Wirkung der Substanz auf einer Öffnung von Kaliumkanälen beruht.

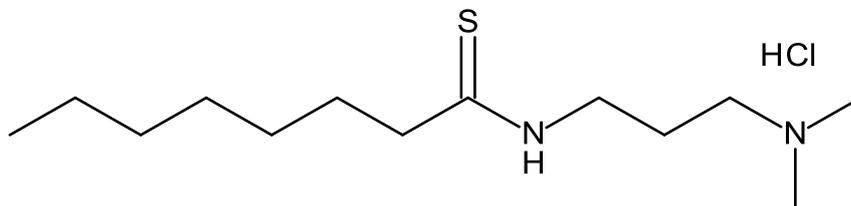
## 3 Material und Methodik

### 3.1 Versuchsvorbereitung

#### 3.1.1 Testsubstanz

Die Testsubstanz MAH70.HCl wurde am Department für Pharmazeutische Chemie synthetisiert und für die pharmakologischen Versuche zur Verfügung gestellt.

**Abbildung 1:** Strukturformel von MAH70.HCl mit Nomenklatur



#### ***N***-[3-(Dimethylamino)propyl]octanthioamid-Hydrochlorid

Vor jedem Versuch wurde die Substanz MAH70.HCl frisch eingewogen und in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst. Die Einwaage der Substanz war abhängig von der Größe des Organbads, das für die Versuche verwendet wurde. Zur Verfügung standen ein Organbad mit einem Fassungsvermögen von 25ml und ein weiteres Organbad mit 8ml. Um die gewünschte Konzentration von 100µmol/l in den Organbädern zu erreichen, musste die Einwaage der Testsubstanz wie folgt berechnet werden:

$$\frac{MG}{100}/4 \text{ für ein 25ml Organbad und } \frac{MG}{100}/12 \text{ für ein 8ml Organbad.}$$

Die berechnete Masse musste anschließend in 100µl Lösungsmittel gelöst werden. Da MAH70.HCl ein Hydrochlorid ist, wurde Wasser als Lösungsmittel verwendet.

### 3.1.2 Versuchstiere

Um die Wirkung der Testsubstanz auf isolierte Organe testen zu können, wurden Meerschweinchen einer speziellen Zuchtlinie (TRIK) als Versuchstiere verwendet.

Meerschweinchen eignen sich sehr gut für die Versuche, da sie eine starke Ähnlichkeit mit dem menschlichen Organismus aufweisen. Im Besonderen ist hier das Herz zu erwähnen. Speziell die Kalium-Ionenkanalverhältnisse des Herzens eines Meerschweinchens entsprechen denen des Menschen.

An jedem Versuchstag wurde ein Meerschweinchen durch Genickbruch getötet. Die Tötung erfolgte durch ein speziell geschultes Personal. Es wurde diese Methode gewählt, da ökonomischer ist und keine Arzneimittelinteraktionen mit der zu testenden Substanz entstehen können, wie dies durch eine Injektion mit einer tödlichen Substanz eventuell der Fall wäre.

Nach dem Eintreten des Todes wurde der Bauchraum des Meerschweinchens geöffnet und die benötigten Organe entnommen. Zuerst wurden Herz sowie Lunge entnommen, dann das terminale Ileum, dessen Ende zur besseren Orientierung mit einem Faden markiert wurde, und als letztes wurde die thorakale Aorta herausgeschnitten. Die entnommenen Organe gab man sofort nach der Entnahme in eine spezielle Nährlösung (siehe Kapitel 3.1.3).

### 3.1.3 Nährlösung

Zu Beginn eines jeden Tages wurde eine Nährlösung, auch Tyrode genannt, hergestellt. Diese stellte sicher, dass die entnommenen Organe, die für die Versuche verwendet wurden, mit den nötigen Nährstoffen versorgt wurden, um ihre Vitalität beizubehalten. Tabelle 1 zeigt die Substanzen, die für die Tyrode verwendet wurden. Diese musste man in einer genau definierten Reihenfolge zugeben, da sich sonst die Lösung getrübt hätte und nicht mehr für die Versuche hätte verwendet werden können. Zu Beginn nahm man einen 2Liter Messkolben und füllte aus einer Stocklösung der Reihe nach NaCl, KCl, und NaHCO<sub>3</sub> ein. Danach wurde die Glukose abgewogen und ebenfalls in den Messkolben gegeben. Nach der Zugabe der Glucose füllte man etwas destilliertes Wasser in den Messkolben, damit sich der Feststoff gut lösen konnte. Anschließend wurde mittels einer Eppendorf Pipette die benötigte Menge MgSO<sub>4</sub> und KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> hinzupipettiert. Nachdem diese Substanzen zugegeben wurden, musste

man die Lösung mit Oxymix, einer Gasmischung aus 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>, begasen. Als vorletzten Schritt gab man CaCl<sub>2</sub> langsam mit einer Pasteurpipette zu. Dieser Schritt war entscheidend, um eine Trübung zu verhindern. Am Schluss wurde der Messkolben bis zur Markierung mit destilliertem Wasser angefüllt und noch ca. 30 Minuten mit Oxymix begast.

**Tabelle 1:** Reagenzien zur Herstellung der Tyrode

| <b>Substanz</b>                     | <b>Stocklösung<br/>(g/l)</b> | <b>Molekulargewicht<br/>(g/mol)</b> | <b>mmol/l</b> | <b>ml Stocklösung für<br/>2L Tyrode (in ml)</b> |
|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|---------------|---|
| <b>NaCl</b>                         | 200,05                       | 58,44                               | 115,02        | 67,2  |
| <b>KCl</b>                          | 10,07                        | 74,55                               | 4,73          | 70,0  |
| <b>NaHCO<sub>3</sub></b>            | 25,00                        | 84,01                               | 24,91         | 167,4   |
| <b>MgSO<sub>4</sub></b>             | 29,40                        | 120,37                              | 0,29          | 2,36  |
| <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> | 248,00                       | 136,09                              | 2,15          | 2,36  |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b>             | 136,00                       | 110,98                              | 3,92          | 6,4   |
| <b>Glukose</b>                      | direkte Einwaage             | 180,16                              | 10,99         | 3,96  |

### 3.1.4 Kaliumchlorid Lösung

Neben der Tyrode musste vor Versuchsbeginn für die Aorta descendens, die Arteria pulmonalis und das terminale Ileum jeweils eine Kaliumchlorid Lösung hergestellt werden, damit sich die glatte Muskulatur der jeweiligen Organe maximal kontrahiert. Die eingewogene Menge an Kaliumchlorid wurde in einen 100ml Messkolben eingewogen und anschließend auf 100ml mit Tyrode aufgefüllt werden. Die Kaliumchlorid Menge wurde mittels empirischer Daten ermittelt.

Die Konzentration der Lösung für das terminale Ileum betrug 90mmol, die der Aorta descendens und der Arteria pulmonalis beträgt 60mmol.

**Tabelle 2:** Kaliumchloridkonzentration der Lösungen

| <b>Organ</b>              | <b>Menge an KCl (g/100ml)</b> |
|---------------------------|-------------------------------|
| <b>Terminales Ileum</b>   | 0,45                          |
| <b>Aorta descendens</b>   | 0,67                          |
| <b>Arteria pulmonalis</b> | 0,67                          |

## **3.2 Verwendete Apparaturen**

Zur Durchführung der Versuchsreihe standen zwei unterschiedliche Apparaturen zur Verfügung. Bei beiden Geräte brachte man das Präparat an einem Silberdraht, der mit einem Kraftwandler verbunden war, an. Der Kraftwandler registrierte die mechanische Veränderung der jeweiligen Präparate und formte diese in ein elektrisches Signal um, das anschließend an den Amplifier weitergeleitet wurde. Dieser verstärkte nun das vom Kraftwandler erhaltene Signal und leitete es wiederum an den Schreiber weiter, der es auf Millimeterpapier aufzeichnete. Um eine Wiederholbarkeit der Versuche zu gewährleisten, war es von Bedeutung, dass pH-Wert, Zusammensetzung der Tyrode und die Temperatur der Organbäder immer gleich waren. Apparatur A eignete sich zur Durchführung der Versuche an Aorta, Darm, Pulmonal Arterie und Vorhof, wohingegen Apparatur B für die Versuche am Papillarmuskel verwendet wurde. Die genauen Unterschiede der beiden Geräte werden in den folgenden Kapiteln genauer beschrieben.

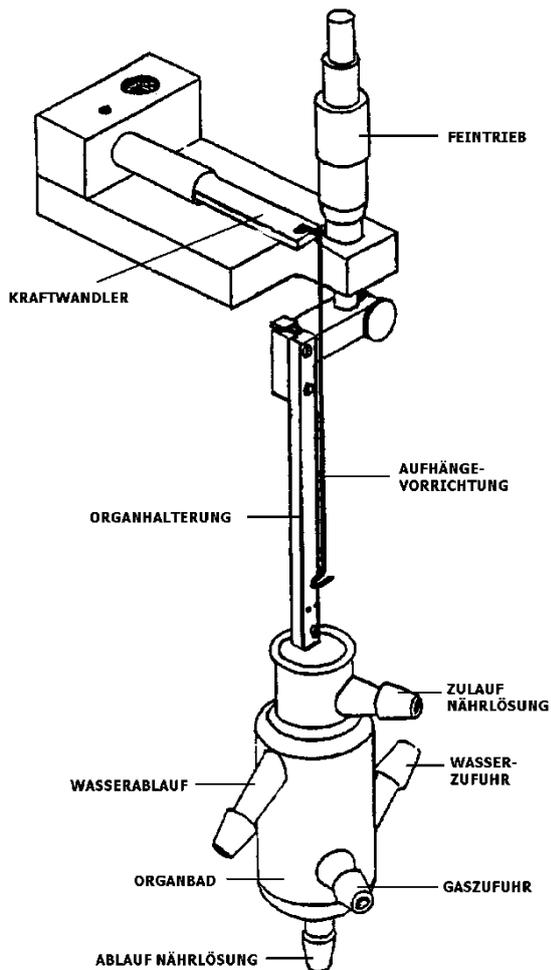
### **3.2.1 Apparatur A**

Diese Apparatur wird wie in Kapitel 3.2.1 schon erwähnt für die Präparate der Aorta, Pulmonal Arterie, des Dünndarms und des Vorhofes verwendet. Um die Temperatur des Organbads auf konstanten 36°C zu halten, wird das Wasser aus dem Wasserbad über einen Schlauch durch den Hohlraum des Doppelwandigen Organbades ein- und ausgeleitet. Ebenfalls über einen Schlauch wird das benötigte Gasgemisch zugeführt. In die Öffnung des Organbades füllt man die vorbereitete Nährlösung ein.

Die Präparate wurden an einem Silberdraht, der mit dem Kraftwandler verbunden ist, aufgehängt. Bei Darm und Vorhof wurden zwei Häkchen angebracht, über die das Präparat

am Draht aufgehängt wurde. Aorta und Pulmonal Arterie konnten ohne Häkchen am Draht angebracht werden. Den Feintrieb benötigte man, um eine gewisse Vorspannung am Organ zu erzielen. Diese Vorspannung war eine Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit der Versuche. Erst nach dem Einspannen der Präparate und dem Absenken in das mit Tyrode befüllte Organ konnte man die Vorspannung einstellen.

**Abbildung 2:** Schematische Darstellung von Apparatur A

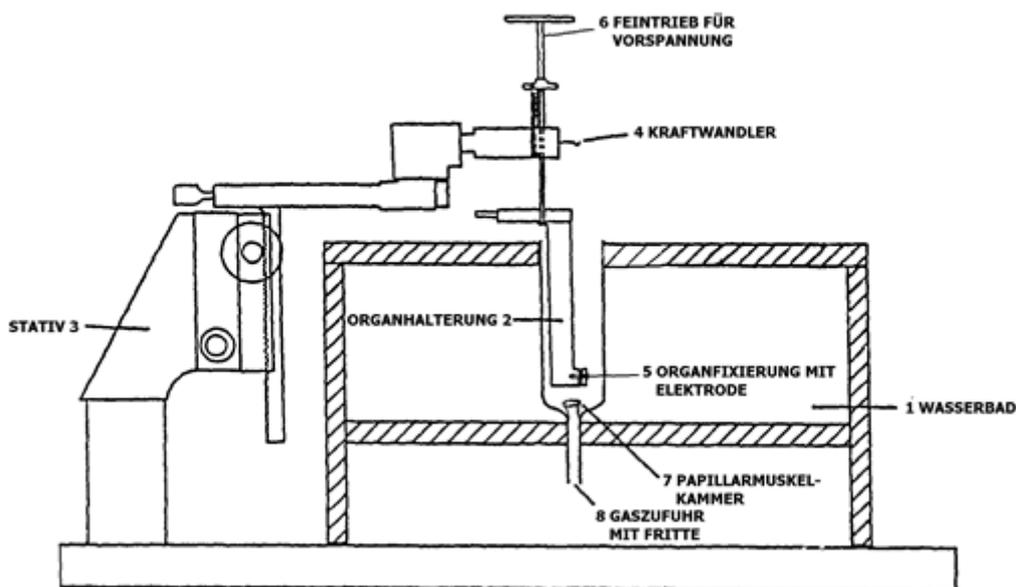


### 3.2.2 Apparatur B

Apparatur B unterscheidet sich in einigen Punkten von Apparatur A. Der größte Unterschied zur vorherigen Apparatur ist, dass die Kammer, in der der Versuch durchgeführt wird, direkt in das Wasserbad, welches eine konstante Temperatur von 35°C hat, eingeführt wird. Das Organbad wird wie bei Apparatur A mit Tyrode (25ml) befüllt und über einen Schlauch mit Gas versorgt. Die Organhalterung mit Silberdraht, Kraftwandler und Feintrieb ist an einem

Stativ montiert. Ein weiterer Unterschied ist, dass der Papillarmuskel nur an einem Häkchen am Silberdraht befestigt wird und der restliche Muskel zwischen einer Plexiglasscheibe und einer Elektrode fixiert wurde. Diese Vorrichtung ist notwendig, da der Papillarmuskel, im Gegensatz zu allen anderen Präparaten, elektrisch stimuliert werden muss, da er keine Eigenkontraktion durch fehlende Schrittmacherzellen hat. Für die elektrische Stimulation wird die Platinelektrode mit einem Reizgerät (Accupulser Signal Generator A360 WPI, USA und Stimulus Isolator A360, WPI, USA) verbunden. Die Frequenz, mit der der Papillarmuskel zur Kontraktion gebracht wurde, beträgt 1Hz (60 Schläge/min) und die Stromstärke beträgt bis zu 999mA. Das Signal wurde wie schon in Kapitel 3.2.1 beschrieben vom Kraftwandler erfasst, in ein elektrisches Signal umgewandelt, durch den Amplifier verstärkt und über den Schreiber auf ein Millimeterpapier aufgezeichnet.

**Abbildung 3:** schematischer Aufbau Apparatur B

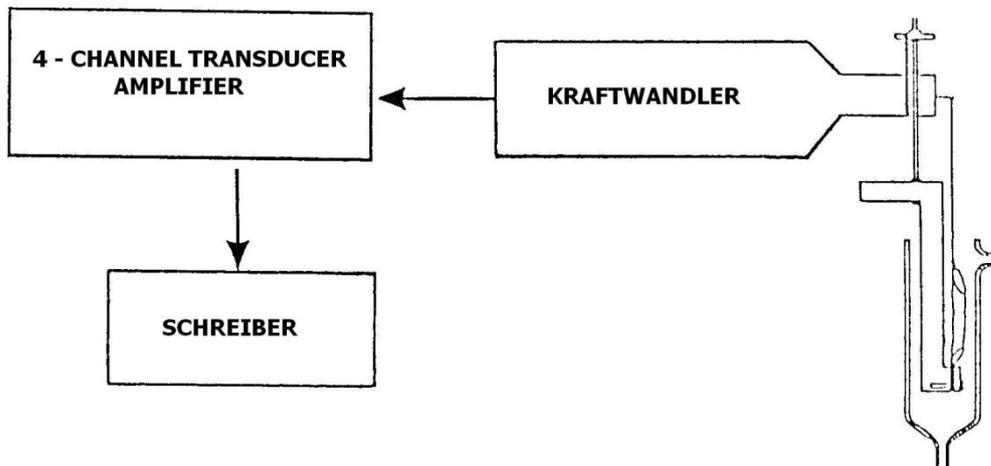


### 3.2.3 Der Kraftwandler

Die von den Präparaten ausgehenden Tonusänderungen werden durch einen Dehnungsmessstreifen im Kraftwandler (Modell: AE875, Norwegen) registriert. Dieses Signal wird anschließend an den Amplifier (Modell: Transridge™ 4-Channel Transducer Amplifier, WPI, USA) weitergeleitet und dort verstärkt. Um dieses Signal dokumentieren zu

können, muss es noch vom Amplifier auf den Schreiber (Modell: Flatbed Recorder, BD 112, Kipp & Zonen, Niederlande) übertragen werden, der es dann auf Millimeterpapier aufzeichnet.

**Abbildung 4:** schematische Darstellung des Kraftwandlers



### 3.2.4 Zufuhr von Oxymix

Bei beiden Apparaturen ist für die Durchführbarkeit der Versuche ein Gasanschluss zur Versorgung der Präparate mit Oxymix unbedingt notwendig. Oxymix ist ein Gasgemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid. In beiden Apparaturen befindet sich am Organbad ein Anschluss für das Gas, das über einen Schlauch in das Organbad eingeleitet wird. Um die Stärke der Gaszufuhr regulieren zu können, befindet sich am Eingang der Gaszufuhr daher eine Glasfritte, die als eine Art Filter fungiert. Über eine Schraubklemme konnte die Menge an Gas, die in das mit Tyrode befüllte Organbad eingeleitet wurde reguliert werden. Neben der Versorgung der Organe mit Sauerstoff konnte über die Gaszufuhr auch ein konstanter pH-Wert im Bereich von 7,2 bis 7,4 gewährleistet werden.

## 3.3 Präparation der Organe

Um die Substanz MAH70.HCl testen zu können, mussten zunächst die Organe entsprechend präpariert werden, um sie in den entsprechenden Apparaturen montieren zu können.

Hierfür wurden die Organe aus dem Meerschweinchen, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, entnommen und anschließend noch weiter präpariert.

### 3.3.1 Verwendete Materialien

Nach der Entnahme der Organe aus dem Versuchstier wurden diese zunächst in die Nährlösung gegeben und mit Oxymix versorgt. Zur weiteren Präparation verwendete man eine Petrischale, in die ein Kork Ring gegeben wurde, damit man die Organe an diesem mit Nadeln befestigen konnte. Damit die Organe auch während des Präparierens mit Nährstoffen versorgt wurden, füllte man die Petrischale mit Tyrode. Das Aufschwimmen des Kork Ringes wurde durch einen Gummischlauch, den man auf dem Kork anbrachte, verhindert. Ein Auflichtmikroskop ermöglichte es, die Organe exakt und einwandfrei zu präparieren. Des Weiteren wurden spezielle Scheren, Pinzetten und Sauger zur Säuberung der Organe von überflüssigem Gewebe verwendet.

**Abbildung 5:** Verwendete Präparieruntensilien



### 3.3.2 Präparation des rechten Vorhofs

Wie schon in Kapitel 3.1.2 erwähnt wurde sofort nach Eintreten des Todes der Bauchraum geöffnet und das Herz samt Lunge entnommen. Danach befestigte man das Herz mit zwei Präpariernadeln am Kork Ring und entfernte zunächst die Lunge. Nun wurde das Herz ein bis zweimal mit Tyrode gespült, um überschüssiges Blut zu entfernen und das Organ zu säubern.

Anschließend wurde der Vorhof, der den Sinus- und AV-Knoten beinhaltet, durch eine geeignete Schere vom Rest abgetrennt und in eine separate, mit Tyrode befüllten Präparierschale gegeben. In dieser wurde der Vorhof mit zwei Nadeln an der Herzspitze und der Basis befestigt. Um den Vorhof in die Apparatur zur Durchführung des Versuches einhängen zu können, musste man zwei Häkchen anbringen. Dies geschah, indem man mit einem Faden einen Knoten um ein aus Draht gebogenes Häkchen machte. Damit sich das Häkchen nicht von dem Faden löste, machte man noch ein bis zwei zusätzliche Knoten zur besseren Fixierung. Beim Anbringen dieser Häkchen war es besonders wichtig, den Vorhof nicht zu dehnen, da dies seine Funktionalität beeinträchtigt hätte. Nach der Präparation brachte man den Vorhof sofort zum Organbad und spannte ihn in der Apparatur ein.

**Abbildung 6:** eingespannter Vorhof



### 3.3.3 Präparation des Truncus pulmonalis

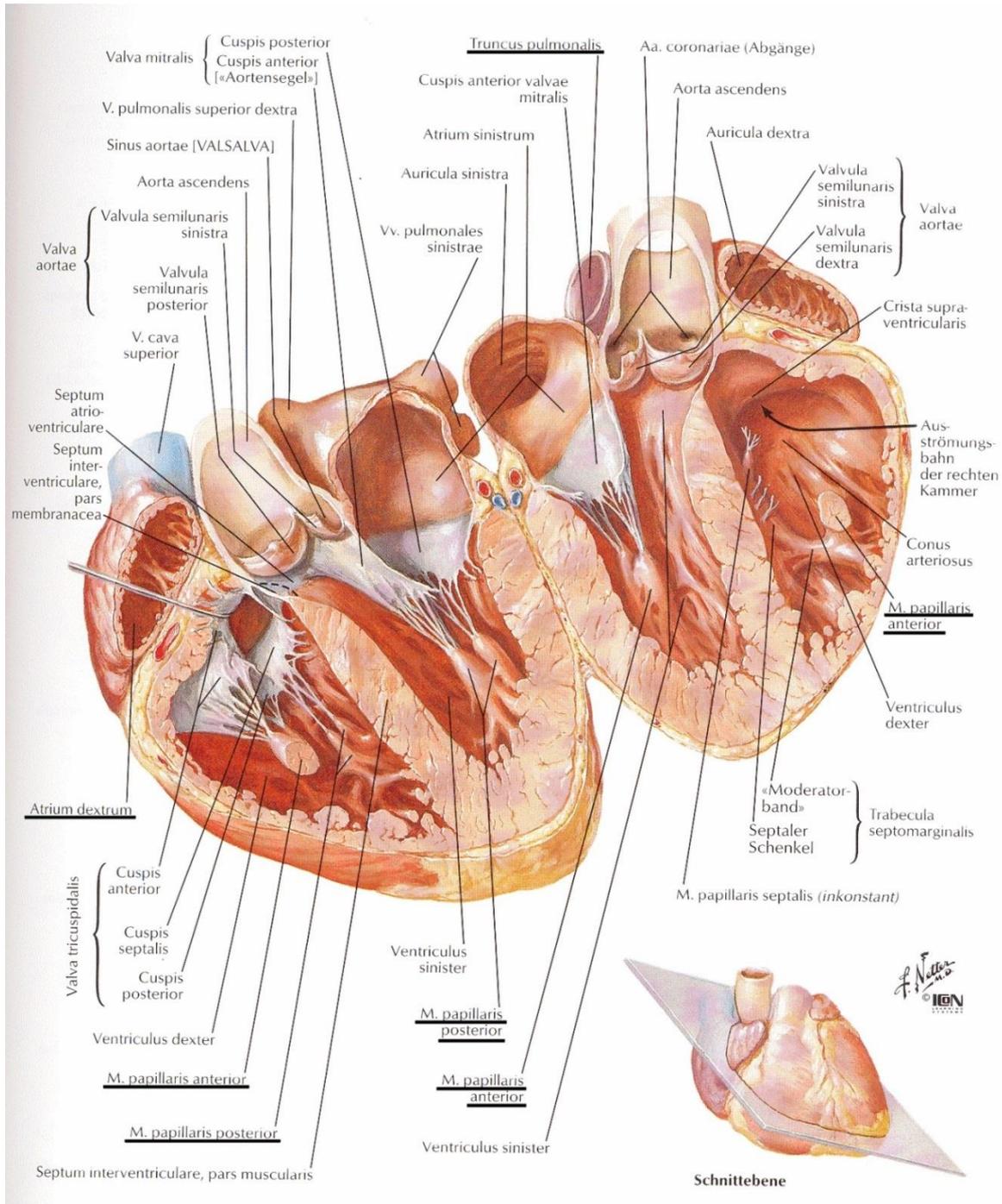
Nach der Isolation des Vorhofs vom restlichen Herzen, begann man mit der Präparation des Truncus pulmonalis. Zuerst entfernte man das Fettgewebe, um eine bessere Sicht auf das zu präparierende Organ zu haben. Dann wurde die Aorta von der Pulmonalarterie abgetrennt. Die beiden Gewebe konnte man dadurch unterscheiden, dass die Arteria pulmonalis dünnwandiger ist als die Aorta. Der Teil, der für die Versuchsreihe verwendet wurde, war der

Truncus pulmonalis, der einen Teil der Pulmonalarterie darstellt und aus dem linken Ventrikel hervorgeht. Bevor man den Truncus pulmonalis in ein bis zwei Ringe schnitt, wurde er noch von Fettgewebe und vorhandenen Thromben befreit. Die fertigen Präparate wurden anschließend sofort in ein Becherglas mit Nährlösung gegeben und mit Oxymix versorgt.

### 3.3.4 Präparation des Papillarmuskels

Nach der Entfernung des Vorhofes wurde das Herz neuerlich mit Tyrode gespült. Nun wurde das Herz entlang des Septums geöffnet und die Papillarmuskeln, die sich in den Kammern befinden, freigelegt. Die durch Blut verunreinigte Tyrode wurde erneut gewechselt und anschließend konnte man zur Präparation übergehen. Hierfür führte man mit einer Pinzette den Faden unterhalb des Papillarmuskels durch und band ihn mit einem Knoten ab. Dies führte man an beiden Seiten des Muskelansatzes durch und versah jedes Ende mit einem Silberhäkchen. Danach schnitt man den Muskel mittels einer Schere heraus. Die Anzahl der Papillarmuskeln, die man aus einem Herzen isolieren konnte, hing von der Größe ab. Zumeist konnte man 3 bis 4 Muskel zur Versuchsdurchführung verwenden. Sofort nach dem Beenden der Präparation wurden die Papillarmuskeln in ein mit Nährlösung befülltes Becherglas gegeben und bis zur Verwendung mit Oxymix begast.

**Abbildung 7:** Anatomische Darstellung des Herzens (Netter 2003)



### 3.3.5 Präparation des terminalen Ileums

Nach der Entnahme des Herzens wurde der terminale Teil des Ileums, der zum Dünndarm gehört, aus dem Bauchraum herausgezogen und ein circa 15cm langes Stück herausgeschnitten. Dieses Stück wurde mit einem Faden zur Markierung und besseren Handhabung abgebunden.

**Abbildung 8:** Terminales Ileum abgebunden



Das terminale Ileum wurde dann wie auch beim Herzen in ein mit Nährlösung befülltes Glas gegeben und bis zur endgültigen Präparation mit Sauerstoff versorgt. Zur weiteren Bearbeitung wurde ein in etwa 0,5 bis 1cm langes Stück des terminalen Ileums herausgeschnitten. Dabei war darauf zu achten, dass die Enden schräg abgeschnitten wurden, um ein besseres abbinden zu ermöglichen und das Darmlumen möglichst weit offen zu halten. Die Enden befestigte man mit jeweils einer Nadel am Korkring der Präparierschale, die wie ebenfalls in Kapitel 3.3.1 beschrieben mit Tyrode befüllt wurde. Analog zur Vorgehensweise am Vorhof wurden auch hier Silberhäkchen angebracht. Beim Anbringen der Häkchen musste darauf geachtet werden, dass das Organ nicht unnötig gedehnt wurde, da das Gewebe sonst nicht mehr für die Versuchsdurchführung geeignet gewesen wäre. Für das Funktionieren der Versuchsreihe war es auch essentiell, dass das Darmlumen beim Anbringen der Häkchen

nicht abgebunden wurde, da sonst die Substanz nicht wirken hätte können. Zum Schluss säuberte man mittels einer Pipette das Lumen von eventuellen Chymus Resten.

### 3.3.6 Präparation der Aorta

Bei der Versuchsreihe wurde der absteigende Teil der Aorta, die Aorta descendens, verwendet. Um die Aorta aus dem Tier zu isolieren, wurde sie im thorakalen Bereich zunächst durchgeschnitten, mit einer Pinzette angehoben und dann ein circa 3cm langes Stück herausgelöst, indem man mit einer Schere entlang des Rückgrates schnitt. Hierbei war besonders darauf zu achten, dass man die Aorta nicht zu sehr dehnte, da man ansonsten das Gewebe zerstört hätte.

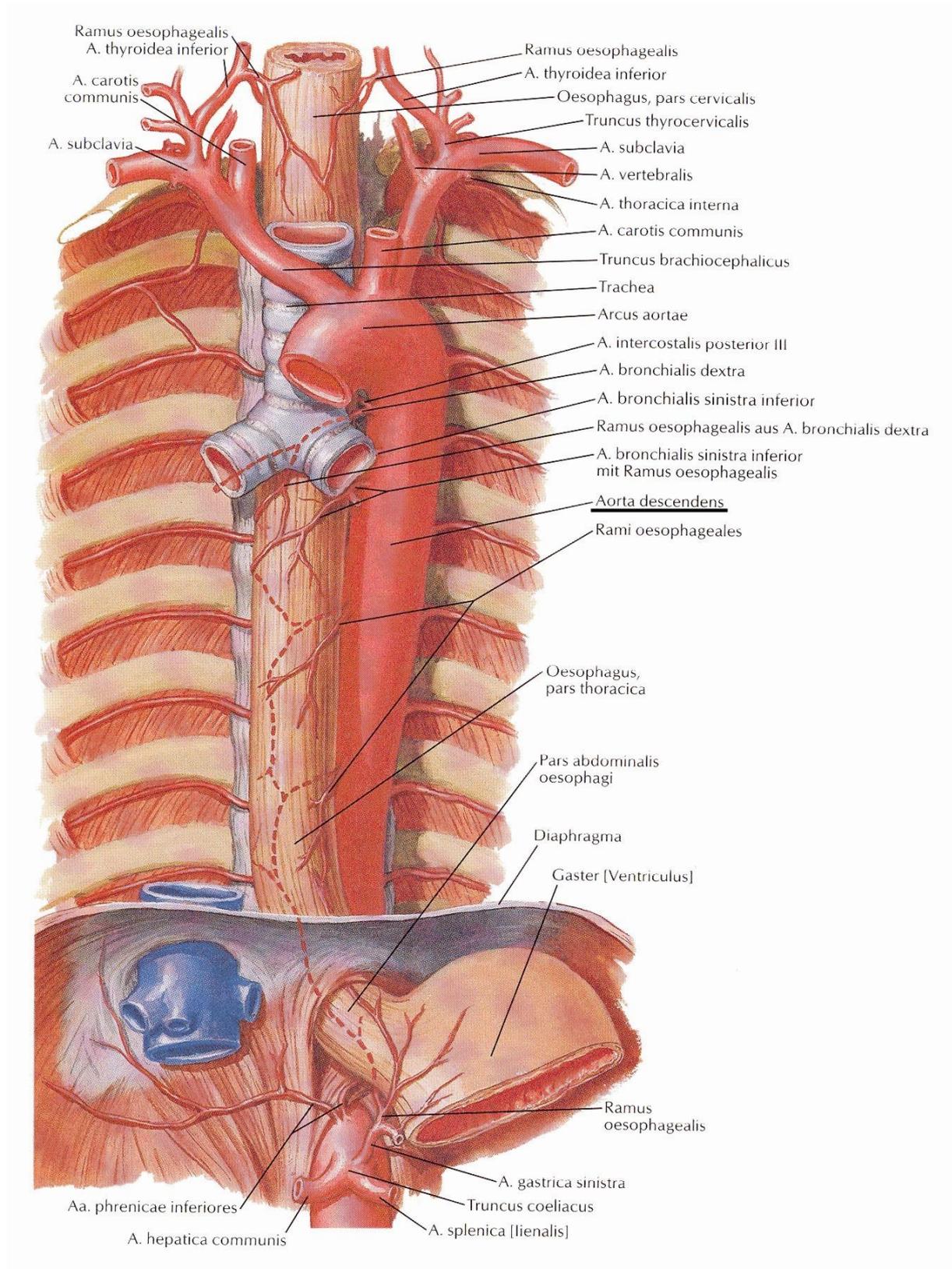
Nachdem dies geschehen war, befestigte man sie mit zwei Nadeln auf dem Kork der Präparierschale, die wiederum mit der Nährlösung befüllt wurde. Bei der Aorta musste man besonders darauf achten, dass man jegliches Fettgewebe sauber mit einer Mikro Federschere unter dem Auflichtmikroskop entfernte, da sonst die Möglichkeit bestand, dass die zu testende Substanz sich in dem Fettgewebe, das die Aorta umgab, anlagerte und daher die Versuche ein verfälschtes Ergebnis liefern würden.

**Abbildung 9:** Ansicht der Aorta unter dem Mikroskop



Nach dem Entfernen des Fettgewebes schnitt man die Aorta in circa 5mm dicke Ringe, die dann zur Versuchsdurchführung verwendet wurden. Die Ringe gab man wiederum in ein kleines mit Tyrode befülltes Becherglas und begaste es mit Oxymix bis zur Verwendung.

**Abbildung 10:** Anatomische Darstellung der Aorta descendens (Netter 2003)



### 3.4 Versuchsdurchführung

Vor Beginn eines jeden Versuches musste das zur jeweiligen Apparatur gehörende Wasserbad eingeschaltet werden, um eine konstante Temperatur von 37°C zu gewährleisten. Diese Temperatur galt für alle Organe bis auf den Papillarmuskel. Hier betrug die Temperatur 35°C. Ebenfalls vor dem Einspannen des Organs wurden die Organbäder mindestens zweimal mit Tyrode gewaschen, um Substanzrückstände aus vorherigen Versuchen zu vermeiden und der Feintrieb musste auf Null gestellt werden. Danach konnte begonnen werden, das jeweilige Präparat an der Aufhängevorrichtung einzuspannen und in das mit Tyrode angefüllte Organbad abzusenken. Je nach Fassungsvermögen des Organbads befüllte man es mit 25ml oder 8ml Nährlösung. Zum Schluss öffnete man das Gasventil, um eine ausreichende Sauerstoff-Zufuhr während der Versuchsdurchführung zu gewährleisten.

#### 3.4.1 Pipettierschema

Nachdem eine konstante Kontrollphase von mindestens 45min eingehalten wurde, konnte man die in 100µl Wasser gelöste Substanz in das Organbad pipettieren. Die Zugabe der Testverbindung erfolgte kumulativ in Abstand von jeweils 45min., da angenommen wurde, dass nach dieser Zeit der Steady State (Fließgleichgewicht) erreicht wird. Nach der Kontrollphase pipettierte man mittels einer Eppendorfpipette 3µl der Substanz in das Organbad, dann 7µl, 20µl und zum Schluss 70µl. Die Endkonzentrationen, die man auf Grund dieses Pipettierschemas im Organbad erreichte, betragen 3µmol/l, 10µmol/l, 30µmol/l und 100µmol/l. Mit Hilfe der in Kapitel 3.2 beschriebenen Apparaturen konnte man die durch die Substanz verursachten Veränderungen messen und zu Papier bringen. Tabelle 3 zeigt die gemessenen Effekte am jeweiligen Organ.

**Tabelle 3:** gemessener Effekt auf die Organe

| <b>Organ</b>       | <b>Gemessener Effekt</b> |
|--------------------|--------------------------|
| Vorhof             | Chronotropie             |
| Papillarmuskel     | Inotropie                |
| Truncus pulmonalis | Vasodilatation           |
| Terminales Ileum   | Vasodilatation           |
| Aorta descendens   | Vasodilatation           |

### 3.4.2 Versuchsdurchführung am Vorhof

Bevor man damit beginnen konnte, den präparierten Vorhof über die Haken am Silberdraht zu befestigen, musste man das Wasserbad einschalten, das Organbad mit Tyrode befüllen, die Stärke der Gaszufuhr einstellen und den Feintrieb auf „Null“ stellen. Erst nachdem diese Schritte durchgeführt wurden senkte man die Organhalterung mit dem daran befestigten Vorhof in das Organbad ab. Nun konnten die Geräte eingeschaltet werden und diverse Einstellungen der Geräte vorgenommen werden. Den Schreiber stellte man auf 5mV und die Aufzeichnungsgeschwindigkeit auf 5mm/sec ein. Danach schaltete man den Amplifier durch einen Kippschalter zu und stellte den Schreiber auf den Nullpunkt. Um eine Reproduzierbarkeit der Versuche zu erreichen, musste je nach Präparat eine bestimmte Vorspannung über den Feintrieb eingestellt werden. Die Vorspannung wurde durch empirische Daten ermittelt und betrug beim Vorhof 10,4mN. Nachdem man diese eingestellt hatte, setzte man den Schreiber wieder auf den Nullpunkt zurück. Die Einstellung des Nullpunktes erfolgte über ein Drehrad am Amplifier.

Nach dem Absenken des Vorhofes in das Organbad und nachdem alle Einstellungen vorgenommen wurden, beließ man das Präparat noch 20 bis 40 Minuten zur Gewöhnung an die vorherrschenden Verhältnisse, bevor man mit der Aufzeichnung begann. Nach der Gewöhnungsphase begann der eigentliche Versuch, indem man alle 5 Minuten die

Schlagfrequenz für die Dauer von 12sec aufzeichnete. Dies entsprach einer Anzahl von 6 Kästchen auf dem Millimeterpapier. Zu diesem Zweck drückte man am Schreiber die Tasten „Record on“ und „Pen down“ möglichst gleichzeitig. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis die Schlagfrequenz konstant war. In der Regel musste man 7 bis 9 Aufzeichnungen machen, bis es zur Konstanz kam. Diese Werte dienten als Kontrolle und die nachfolgenden Aufzeichnungen, bei denen die Testsubstanz in kumulativen Schritten zugegeben wurde, wurden in Abhängigkeit von dieser Kontrolle ausgewertet. Nachdem man eine konstante Schlagfrequenz erreicht hatte, konnte man die Substanz MAH70.HCl in Wasser lösen und mit einer Eppendorf Pipette 3 $\mu$ l dieser Substanz in das Organbad pipettieren. Die Schlagfrequenz wurde dann wieder alle 5 Minuten in einer Zeitspanne von 45 Minuten gemessen. Nach 45 Minuten gab man die nächst höhere Konzentration zu und wiederholte diesen Vorgang wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, bis die Konzentration 100 $\mu$ l/mol im Organbad betrug. Um die Schlagfrequenz des Vorhofes in 60sec zu ermitteln multipliziert man die ausgezählten Schläge pro 12sec mit 5.

### 3.4.3 Versuchsdurchführung am Papillarmuskel

Die Versuchsreihe am Papillarmuskel wurde im Gegensatz zu allen anderen Präparaten an der Apparatur B (Kapitel 3.2.2) durchgeführt. Die Einstellungen, die vor dem Versuchsbeginn gemacht werden mussten entsprachen in etwa denen des Vorhofes.

Der Musculus papillaris wurde an der Organaufhängung angebracht, indem man das eine Ende durch ein Häkchen am Silberdraht befestigte und das andere Ende zwischen einer Platinelektrode und einer Plexiglasscheibe einklemmte. Man senkte die Halterung soweit in das mit 25ml Tyrode befüllte Organbad ein, sodass das Präparat nur knapp mit der Nährlösung bedeckt wurde. Während des Versuches verdampfte immer etwas Tyrode, die dann mit einer Pipette wieder bis auf 25ml angefüllt wurde.

Die Vorspannung, die bei diesem Versuch eingestellt werden musste, betrug 3,92mN. Beim Schreiber stellte man die Spannung, wie schon beim Vorhof, auf 5mV und die Geschwindigkeit auf 5mm/sec. (Reiter 1967)

Die Spannung konnte bei Bedarf auf 2mV oder 1mV geändert werden. Anders als beim Vorhof, der sich durch den Sinusknoten selbst kontrahiert, musste der Papillarmuskel durch ein Reizgerät elektrisch stimuliert werden. Die Reizung erfolgte mit der Frequenz von 1Hz und einer Stromstärke von maximal 999mA. Sobald der Schreiber eine Kontraktion des

Papillarmuskels anzeigte, konnte man die Stromstärke, mit der das Präparat stimuliert wurde, soweit reduzieren, bis er aufhörte zu schlagen.

Die Stromstärke, bei der Musculus papillaris aufhörte zu schlagen, ist die sogenannte Schwellenstromstärke. Hatte man diese erreicht, musste man um eine adäquate Kontraktion zu erreichen die Schwellenstromstärke wiederum um 10% erhöhen.

Durch diese Vorgehensweise wurde eine frühzeitige Entleerung der im Muskel gespeicherten Katecholamine verhindert werden. Dieses Phänomen nennt man einen Katecholamin Rundown. (Furchgott et al. 1959)

Erreichte die vom Schreiber aufgezeichnete Kontraktion eine Amplitude von über 2cm, konnte man mit der Kontrollphase beginnen. Hier dokumentierte man die Kontraktion, wie schon beim Vorhof, alle 5 Minuten auf einer Länge von 6 Kästchen. Die Messungen führte man solange durch, bis die Kontraktion 5 bis 6 Messungen lang stabil war und eine maximale Abweichung von 0,1cm ergab.

Nach der Kontrollphase begann der eigentliche Versuch, indem man in 45 minütigen Abständen erst 3µl, dann 7µl, danach 20µl und zum Schluss 70µl in das Organbad pipettierte und alle 5 Minuten aufzeichnete.

#### 3.4.4 Versuchsdurchführung am Truncus pulmonalis und der Aorta descendens

Die Versuche am Truncus pulmonalis und an der Aorta descendens unterscheiden sich lediglich in einem Schritt, daher werden sie hier gemeinsam behandelt.

Im Unterschied zu den anderen Organen können diese beiden Gefäßpräparate, ohne weitere Anbringung von Häkchen, direkt am Silberdraht eingefädelt werden. Wie vor jedem Versuch wurden Amplifier und Schreiber eingeschaltet. Die Versuchsreihen wurden bei einer Vorspannung von 10mN, einer Geschwindigkeit von 1mm/min und einer Spannung von 5mV durchgeführt. Bevor man mit der Aufzeichnung beginnen konnte, beließ man die Organe für 20 Minuten in dem mit Tyrode befüllten und begastem Organbad. Dies diente zur Gewöhnung an die vorherrschenden Bedingungen. Während der Gewöhnungsphase betrug die Spannung an der Aorta 10mV und nicht 5mV. Nach dieser Phase wurde die Tyrode durch Öffnen des Ablass-Schlauches aus dem Organbad entfernt. Bei der Versuchsreihe an der

Aorta descendens veränderte man nun die Spannung von 10mV auf 5mV. Sofort danach wurde das Organbad mit der Kaliumchloridlösung für Gefäßpräparate (Kapitel 3.1.4) angefüllt. Dieser Schritt wurde durchgeführt um eine annähernd maximale Kontraktion der Gefäße zu erreichen, damit im Anschluss die potentielle dilatierende Wirkung von MAH70.HCl getestet werden konnte. Die vom Schreiber aufgezeichnete Kontraktionskurve musste vor der Testung der Substanz eine konstante Plateauphase erreichen und einen Mindestausschlag von 5cm auf dem Millimeterpapier aufweisen. Wenn diese Voraussetzungen erfüllt waren, konnte mit der Zugabe der Testsubstanz nach dem in Kapitel 3.4.1 beschriebenen Pipettierschema im Abstand von 45 Minuten erfolgen. Als Kontrollwert, an der eine mögliche Dilatation gemessen wurde, diente die Höhe, die die konstante Plateauphase vor Zugabe der ersten Konzentration von MAH70.HCl erreicht hatte.

### 3.4.5 Versuchsdurchführung am terminalen Ileum

Das Präparat des terminalen Ileums wurde durch die daran angebrachten Haken am Silberdraht der Apparatur A befestigt und in das Organbad, das zuvor mit der Nährlösung befüllt wurde, abgesenkt. Anschließend stellt man die Stärke des zugeführten Gases ein und Schreiber sowie Verstärker wurden zugeschaltet. Nun konnte die Vorspannung von 4,92mN angelegt werden. Wie schon bei der Pulmonalarterie und der Aorta folgte auch beim Darm eine Kontrollphase von 20 Minuten. Nach dieser Gewöhnungszeit wurde die 60 mmol Kaliumchloridlösung für das terminale Ileum zugegeben und die Aufzeichnung gestartet. Durch die Zugabe der Kaliumchloridlösung wollte man auch beim Darm eine maximale Kontraktion auslösen, um anschließend die vasodilatative Wirkung der Testsubstanz messen zu können. Analog zu den Versuchsreihen in Kapitel 3.4.4 musste die Kontraktionskurve eine konstante Phase erreichen und die Kontraktion über eine Höhe von 5cm auf dem Millimeterpapier erreichen. Erst dann durfte man mit der kumulativen Zugabe von MAH70.HCl nach dem üblichen Pipettierschema beginnen.

Am Ende eines jeden Versuches wurde das Organbad mit einer HCl-Lösung gereinigt, um eventuelle Rückstände der Testsubstanz zu beseitigen, damit der nächste Versuch nicht verfälschte Ergebnisse liefern würde.

### 3.5 Wirkmechanismus

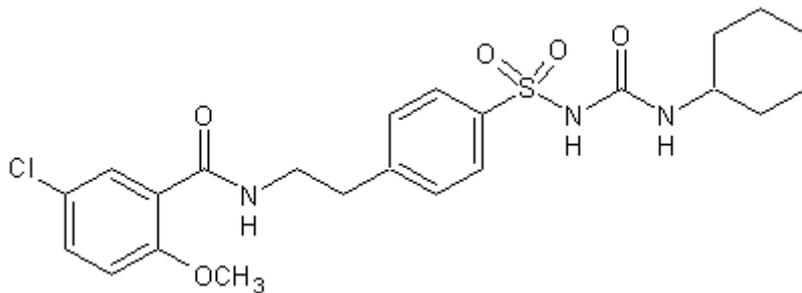
Konnte bei einer der durchgeführten Versuchsreihen eine EC-50 ermittelt werden, so wurde dieses Präparat weiter auf einen möglichen Wirkmechanismus getestet. Der EC-50 Wert ist jener Wert, bei dem eine 50%-ige Wirkung auftritt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Wirkmechanismus am terminalen Ileum getestet.

Wegen der schwefelhaltigen Struktur der Testsubstanz MAH70.HCl wurde angenommen, dass die vasodilatative Wirkung durch eine Öffnung von K-Kanälen zu Stande kommt. Daher wurde zur Untersuchung des Wirkmechanismus Glibenclamid herangezogen, das zu einer spannungsabhängigen Blockade von ATP-abhängigen Kaliumkanälen führt.

#### 3.5.1 Herstellung der Testlösung von Glibenclamid

Die Versuchsreihen zur Untersuchung des Wirkmechanismus wurden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Glibenclamid durchgeführt. Zunächst verwendete man eine 30µM und danach eine 100µM Konzentrationen dieses Sulfonylharnstoff-Derivates. Als Lösungsmittel wurden 100µl Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet.

**Abbildung 11:** Strukturformel von Glibenclamid



Die Menge an Glibenclamid, die eingewogen werden musste, um eine 30µM und 100µM Konzentration zu erhalten, war abhängig von der Größe des Organbades und wurde mit der in Kapitel 3.1.1 angegebenen Formel berechnet. Für eine 30µM Lösung mussten in einem Organbad mit 25ml Fassungsvermögen 0,37mg und für eine 100µM Lösung 1,24mg Glibenclamid eingewogen werden.

### 3.5.2 Versuchsdurchführung mit Glibenclamid

Zur Versuchsdurchführung musste das terminale Ileum gemäß Kapitel 3.4.5 präpariert werden. Das Organbad wurde mit Tyrode befüllt und ausreichend begast. Das Präparat wurde an den zwei Silberhäkchen in die Apparatur eingespannt und die Geräte zugeschaltet. Der Schreiber wurde wie auch bei der Testung der Wirkung von MAH70.HCl auf 1mm/min und 5mV eingestellt. Die Vorspannung betrug 4,92mN. Nach einer 20 minütigen Gewöhnungsphase wurde die Tyrode abgelassen und durch die 60mmol Kaliumchloridlösung ersetzt. Nachdem eine konstante Kontraktion erreicht wurde, die auf dem Millimeterpapier mindestens 5cm erreichen musste, wurde die 30 $\mu$ M beziehungsweise 100 $\mu$ M Lösung von Glibenclamid in das Organbad pipettiert und der Kontraktionsverlauf für 45 Minuten aufgezeichnet. Nach dieser Zeit wurden dann 100 $\mu$ l einer 100 $\mu$ M Lösung von MAH70.HCl für 45 Minuten zugegeben und etwaige Veränderungen aufgezeichnet. Es musste die Konzentration von 100 $\mu$ mol/l der Testsubstanz für die Versuchsdurchführung verwendet werden, da sich erst bei dieser Konzentration eine 50%-igen Veränderung ergab.

## 3.6 Auswertung

### 3.6.1 Auswertung der Präparate

Zur Auswertung wurden die vom Schreiber aufgezeichneten Versuchsabläufe herangezogen. Die Wirkung von MAH70.HCl wurde immer in Relation zu dem am Ende der Kontrollphase erhaltenen Wert (100%) gesetzt. Alle Werte, die bei einer Spannung von 5mV erhalten wurden, mussten mit 0,98 multipliziert damit die Ergebnisse auf mN umgerechnet werden konnten.

#### 3.6.1.1 Auswertung des Vorhofes

Am Vorhof wurde der Herzschlag, also die Chronotropie des Herzens, gemessen. Hierfür wurde alle 5 Minuten eine Messung durchgeführt. Bei einer Aufzeichnungsgeschwindigkeit von 5mm/sec ergab dies eine Länge von 6cm auf dem Millimeterpapier. Um die Schläge pro Minute angeben zu können, zählte man die auf den 6cm erhaltenen Ausschläge ab und multiplizierte diese mit 5.

Man nahm immer den letzten Wert einer jeden Aufzeichnungsphase, da sich erst in den letzten 10 Minuten ein Fließgleichgewicht einstellte und somit die Werte dann konstant waren. Der Wert der Kontrollphase entsprach 100% und die Zu- oder Abnahme der Chronotropie bei den Konzentrationen von 3 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 30 $\mu$ M und 100 $\mu$ M wurde in Bezug auf den Kontrollwert errechnet.

### 3.6.1.2 Auswertung des Papillarmuskels

Durch die Versuchsreihe am Musculus papillaris wurde die Kontraktionskraft, mit der das Herz schlug, ermittelt. Die Kontraktionskraft wird als Inotropie bezeichnet. Wie schon beim Vorhof wurde auch hier mit einer Geschwindigkeit von 5mm/sec alle 5 Minuten eine Messung durchgeführt. Es wurden zur Auswertung wieder die letzten Aufzeichnungen der jeweiligen Messungen von 3 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 30 $\mu$ M und 100 $\mu$ M herangezogen und in Relation zum letzten Wert der Kontrollphase, der 100% betrug, gesetzt. Die Werte werden ermittelt, in dem man die Höhe der Amplitude mit einem Lineal genau abmisst. Da am Papillarmuskel die Versuche bei unterschiedlichen Spannungen durchgeführt werden konnten, mussten die Ergebnisse je nach Spannung mit einem bestimmten Faktor multipliziert werden um einheitliche Werte in mN zu erzielen. Tabelle 4 gibt die Multiplikationsfaktoren an.

**Tabelle 4:** Multiplikationsfaktoren

| Spannung | Multiplikationsfaktor |
|----------|-----------------------|
| 5mV      | 0,98                  |
| 2mV      | 0,39                  |
| 1mV      | 0,39                  |

### 3.6.1.3 Auswertung von Aorta, terminalem Ileum und Truncus pulmonalis

Die Auswertung an der Aorta descendens, dem terminalen Ileum und dem Truncus pulmonalis verläuft gleich. Auf dem Millimeter Papier wurde die Position des Schreibers mit Bleistift markiert, an der man nach der Kontrollphase die erste Substanzkonzentration zum Organbad pipettierte. Bei allen weiteren Substanzzugaben ging man gleichermaßen vor. Nach Beendigung des Versuches maß man die Höhe des vom Schreiber aufgezeichneten Kontraktionsverlaufes bei den Markierungen ab und notierte sie. Die erste Markierung, die das Ende der Kontrollphase kennzeichnete, stellte den 100%- Wert dar. Das Ende der zweiten Markierung lieferte den Wert bei einer Konzentration von  $3\mu\text{M}$ , die dritte Markierung den Wert von  $10\mu\text{M}$ , die vierte Markierung den Wert von  $30\mu\text{M}$  und das Ende der Aufzeichnung entsprach zugleich auch dem Wert von  $100\mu\text{M}$ . Die Werte erhält man, indem man den Abstand vom Nullpunkt bis zur vom Schreiber aufgezeichneten Linie bei der Markierung mit einem Lineal genau abmisst.

### 3.6.1.4 Auswertung des Wirkmechanismus

Die Vorgehensweise ist ähnlich wie die in Kapitel 3.6.1.3. Das Ende der Kontrollphase wird wieder mit Bleistift markiert, bevor  $30\mu\text{M}$  oder  $100\mu\text{M}$  von Glibenclamid zugegeben werden und man markiert auch die Stelle, bevor man  $100\mu\text{M}$  von MAH70.HCl zugibt. Auch hier werden die Werte mit einem Lineal abgemessen. Der Wert, der am Ende der Kontrollphase erreicht wurde entspricht wieder den 100% und alle weiteren Werte werden hierzu in Relation gesetzt.

## 3.6.2 Computergestützte Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Versuche wurden aus den bei der manuellen Auswertung erhaltenen Ergebnissen mittels einer Excel-Tabelle Mittelwerte und Standardfehler dieser Mittelwerte errechnet.

Um eine graphische Darstellung der Versuche zu ermöglichen, wurde mit dem Programm Sigmaplot 9.0 gearbeitet. Mit diesem Programm wurde für jede Versuchsreihe eine Konzentrations-Wirkungskurve erstellt, an der man auch die  $\text{EC}_{50}$  Werte ablesen konnte. Auf

der x-Achse wurden die Konzentrationen von MAH70.HCl aufgetragen und auf der y-Achse die Werte, die man bei der manuellen Auswertung erhalten hatte.

Der Wirkmechanismus wurde nicht durch eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve, sondern mit Hilfe eines Balkendiagramms graphisch dargestellt.

## 4 Ergebnisse

Zur Darstellung der Ergebnisse wurde für jede Versuchsreihe eine Tabelle erstellt. Aus dieser wird die Anzahl der Versuche, die arithmetischen Mittelwerte in mN und Prozent, sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit bei den entsprechenden Konzentrationen ersichtlich. Ab einem Wert von  $P \geq 0,05$  sind die Werte signifikant.

Des Weiteren wird zu jeder Versuchsreihe eine Konzentrations-Wirkungskurve erstellt. Die Abszisse gibt hier die Konzentration von MAH70.HCl in  $\mu\text{mol/l}$  an und auf der Ordinate wird die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent angezeigt. Eine Ausnahme stellt hier der Vorhof dar, bei dem die Abnahme der Schlagfrequenz auf der y-Achse angegeben wird. Es wurden für jede Konzentrations-Wirkungskurve die aus der jeweiligen Versuchsreihe ermittelten Mittelwerte verwendet. Sollte es zu einer 50%-igen Abnahme der Kontraktionskraft beziehungsweise der Schlagfrequenz gekommen sein, so wird diese durch die gestrichelte Linie ersichtlich.

## 4.1 Ergebnisse von MAH70.HCl

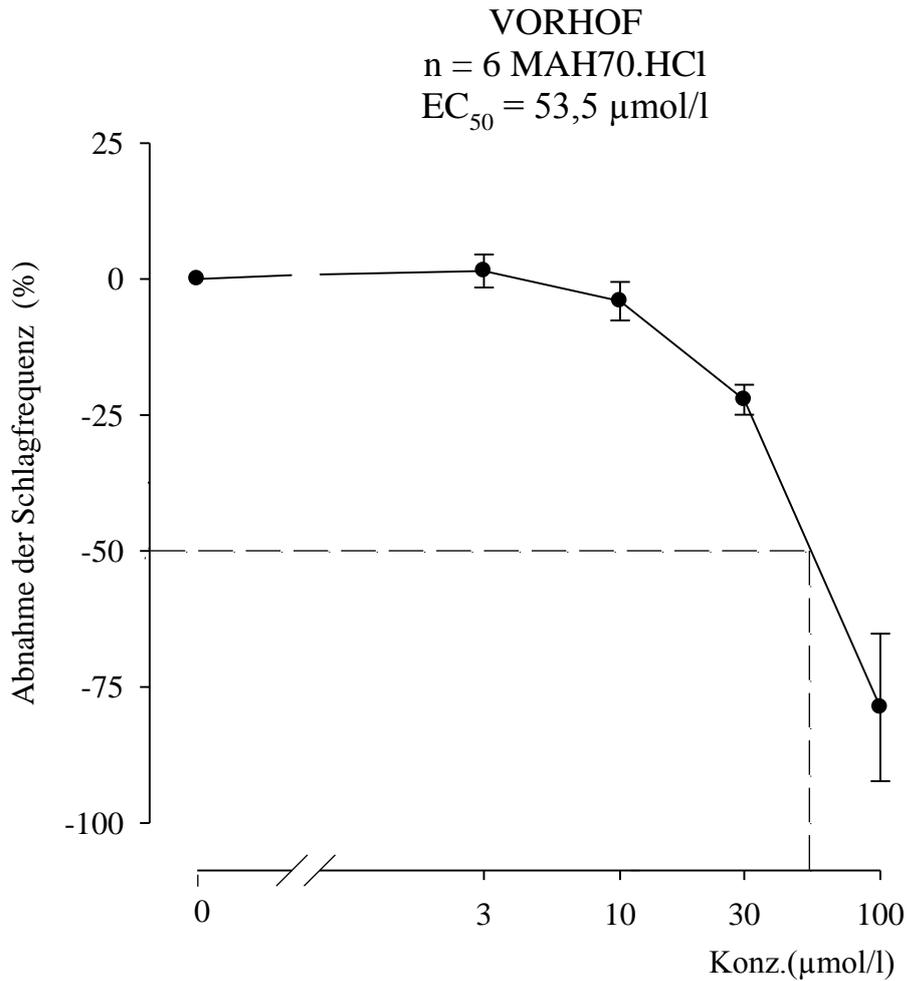
### 4.1.1 Rechter Vorhof

MAH70.HCl zeigte am Vorhof eine negativ chronotrope Wirkung. Durchschnittlich ergab sich bei der Versuchsreihe nach Zugabe der ersten Substanzkonzentration eine leichte Zunahme der Schlagfrequenz. Bei allen weiteren Konzentrationen von MAH70.HCl kam es dann zu einer stetigen Abnahme von im Schnitt 78,76% der Chronotropie. Mittelwerte und Standardabweichungen aus allen sechs Versuchen wurden berechnet und sind in Tabelle 5 dargestellt. Die prozentuelle Zu- bzw. Abnahme der Schlagfrequenz wird immer in Relation zur Kontrolle (0%) gesetzt.

**Tabelle 5:** Versuchsergebnisse des Rechten Vorhofs

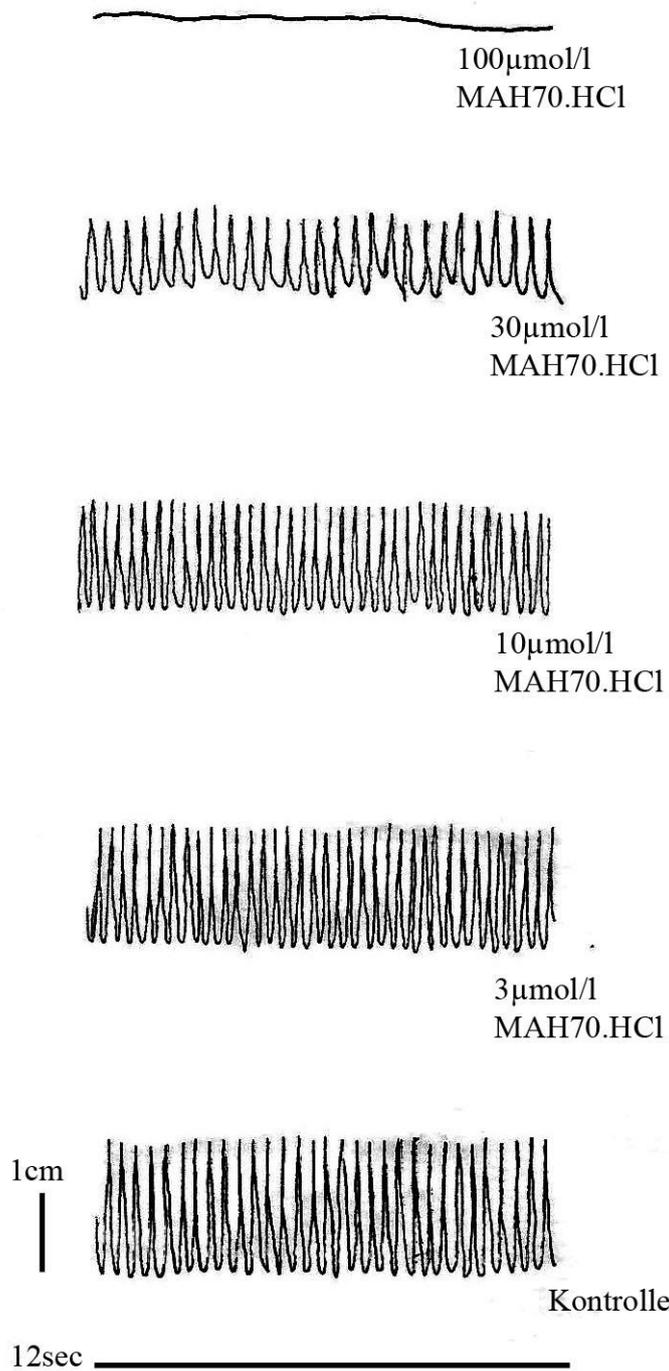
| <b>Konzentration<br/>(<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b> | <b>Anzahl der<br/>Versuche</b> | <b>f <math>\pm</math> SEM<br/>(Schläge/min)</b> | <b>f <math>\pm</math> SEM<br/>(%)</b> | <b>Irrtums-<br/>wahrscheinlichkeit<br/>(P)</b> |
|---|--------------------------------|---|---------------------------------------|--|
| Kontrolle   | 6                              | 192,50 $\pm$ 8,83                               | 0 $\pm$ 0                             | –  |
| 3   | 6                              | 194,17 $\pm$ 4,73                               | 1,49 $\pm$ 3,02                       | 0,05   |
| 10  | 6                              | 183,33 $\pm$ 4,59                               | -4,07 $\pm$ 3,55                      | 0,05   |
| 30  | 6                              | 149,17 $\pm$ 6,38                               | -22,19 $\pm$ 2,75                     | 0,05   |
| 100   | 6                              | 40,83 $\pm$ 26,03                               | -78,76 $\pm$ 13,57                    | 0,01   |

**Abbildung 12:** Konzentrations-Wirkungs-Kurve des rechten Vorhofs



Durch die Konzentrations-Wirkungs-Kurve wird die Abnahme der Schlagfrequenz nochmal verdeutlicht. Daneben kann man aus der Kurve auch die EC<sub>50</sub> ablesen, die hier 53,5µmol beträgt. Bereits nach der Zugabe der dritten Substanzkonzentration wird die Abnahme der Schlagfrequenz sehr deutlich und es kommt zu einem starken negativ chronotropen Effekt.

**Abbildung 13:** Originalversuch des Vorhofes



Die Abbildung zeigt die Anzahl der Schläge pro Minute, die in einem Zeitraum von 12sec aufgenommen wurden. Die Reduktion der Schläge bei den jeweiligen Konzentrationen ist deutlich sichtbar. Bei einer Konzentration von 100µmol/l sind die Schläge nicht mehr auswertbar.

### 4.1.2 Papillarmuskel

Die Versuchsreihe am Papillarmuskel hat zum Ziel, die Kontraktionskraft des Herzens, also den inotropen Effekt der Testsubstanz, zu bestimmen.

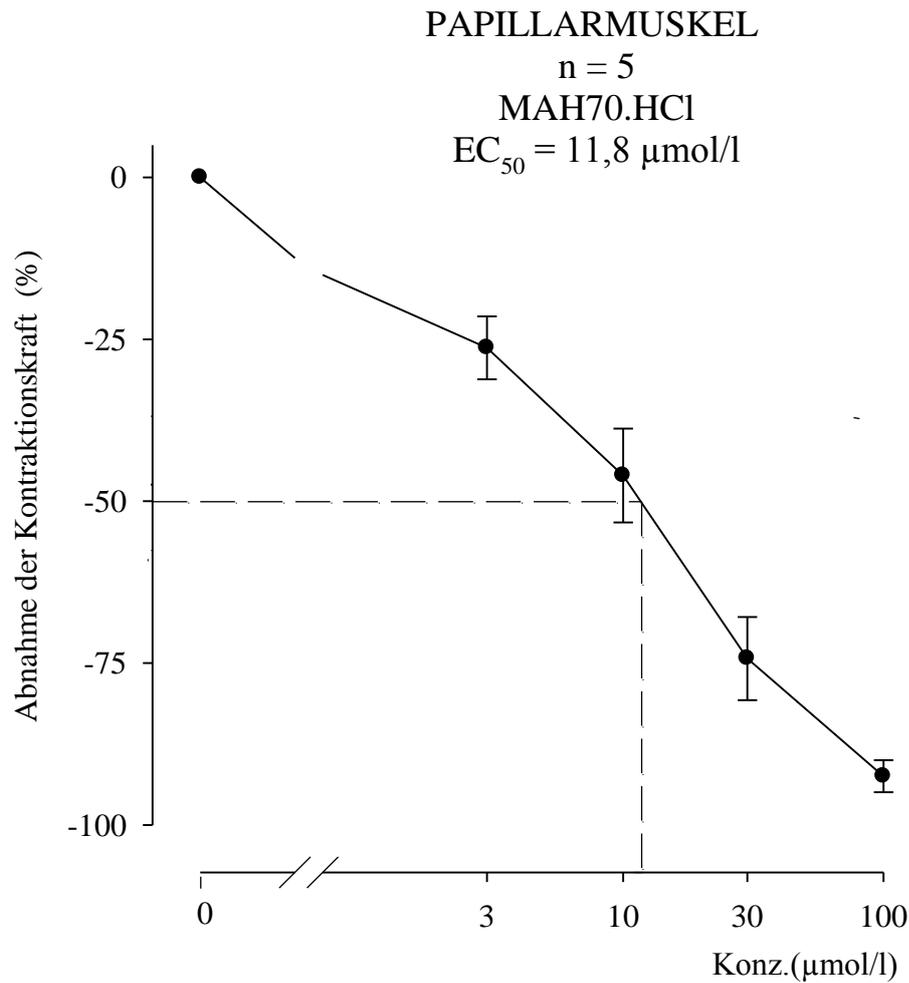
Am Papillarmuskel wurden 5 Versuche durchgeführt. Die untenstehende Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen der Versuchsreihe. Wie bei allen anderen Versuchsreihen auch wird die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent, bezogen auf die Kontrolle, angegeben.

Es konnte bei der Substanz MAH70.HCl eine starke negativ inotrope Wirkung festgestellt werden. Schon nach der Zugabe von 3  $\mu\text{mol/l}$  der zu testenden Substanz kam es zu einer Abnahme der Kontraktionskraft von durchschnittlich 26,30 Prozent. Zum Ende des Versuchs lag die Kontraktionsamplitude bei -92,48% im Vergleich zu dem Kontrollwert.

**Tabelle 6:** Versuchsergebnisse des Papillarmuskels

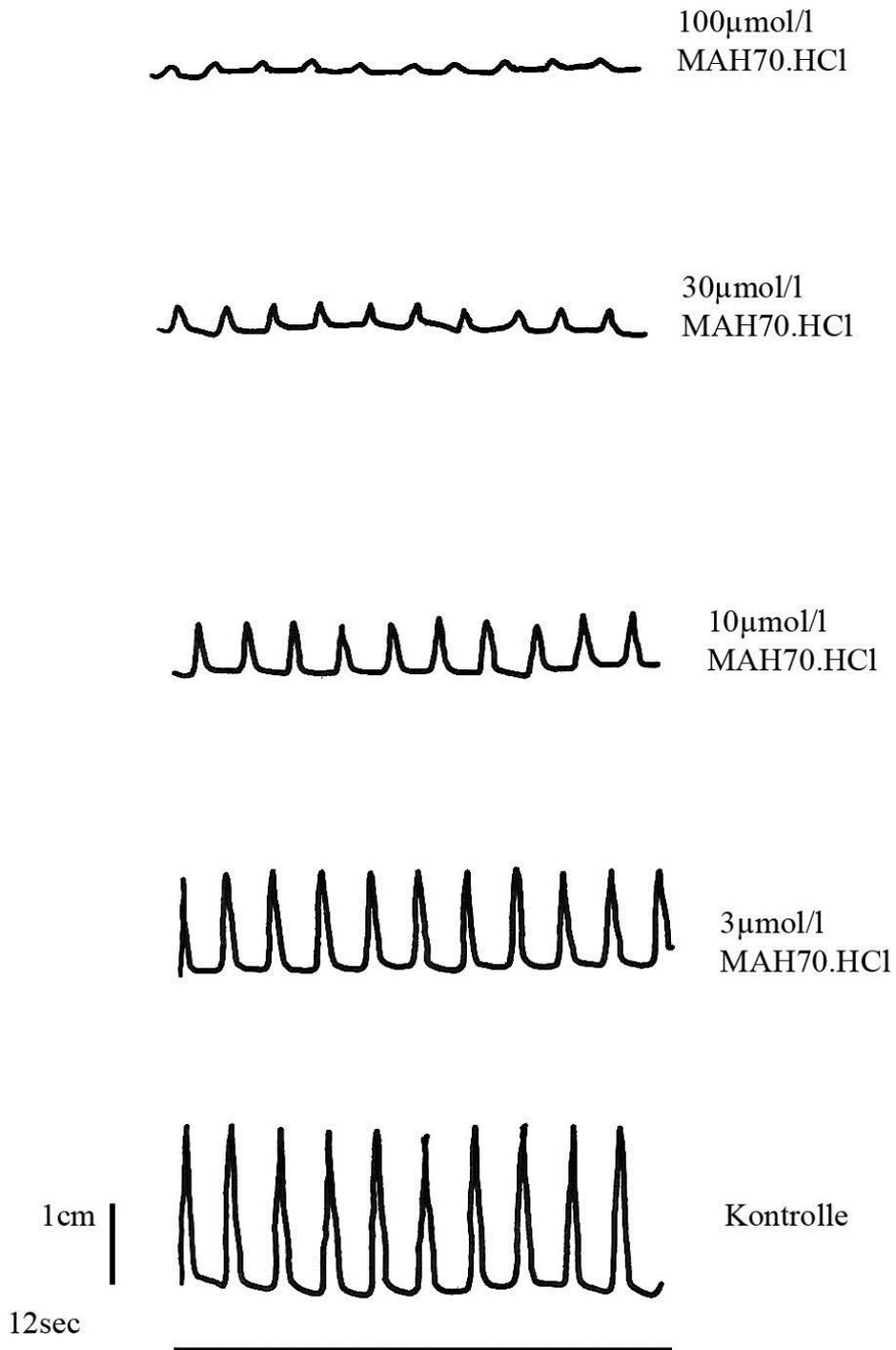
| <b>Konzentration<br/>(<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b> | <b>Anzahl der<br/>Versuche</b> | <b><math>f_c \pm \text{SEM}</math><br/>(mN)</b> | <b><math>f_c \pm \text{SEM}</math><br/>(%)</b> | <b>Irrtums-<br/>wahrscheinlichkeit<br/>(P)</b> |
|---|--------------------------------|---|--|--|
| Kontrolle   | 5                              | $1,12 \pm 0,11$                                 | $0 \pm 0$                                      | –  |
| 3   | 5                              | $0,85 \pm 0,14$                                 | $-26,30 \pm 4,86$                              | 0,05   |
| 10  | 5                              | $0,64 \pm 0,15$                                 | $-46,04 \pm 7,26$                              | 0,05   |
| 30  | 5                              | $0,31 \pm 0,10$                                 | $-74,30 \pm 6,43$                              | 0,01   |
| 100   | 5                              | $0,09 \pm 0,03$                                 | $-92,48 \pm 2,47$                              | 0,01   |

**Abbildung 14:** Konzentrations-Wirkungs-Kurve des Papillarmuskels



Besonders deutlich wird die Abnahme der Kontraktionskraft durch die Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Die hieraus abgelesene EC<sub>50</sub> beträgt 11,80µmol/l, wobei schon bei der Zugabe der ersten Substanzkonzentration eine Abnahme erkennbar war. Aus dieser Graphik ergibt sich ein stark negativ inotroper Effekt der Substanz MAH70.HCl auf das Herz.

**Abbildung 15:** Originalversuch des Papillarmuskels



Der Originalversuch zeigt anschaulich die kontinuierliche Abnahme der Kontraktionsamplitude bei steigenden Substanzkonzentrationen.

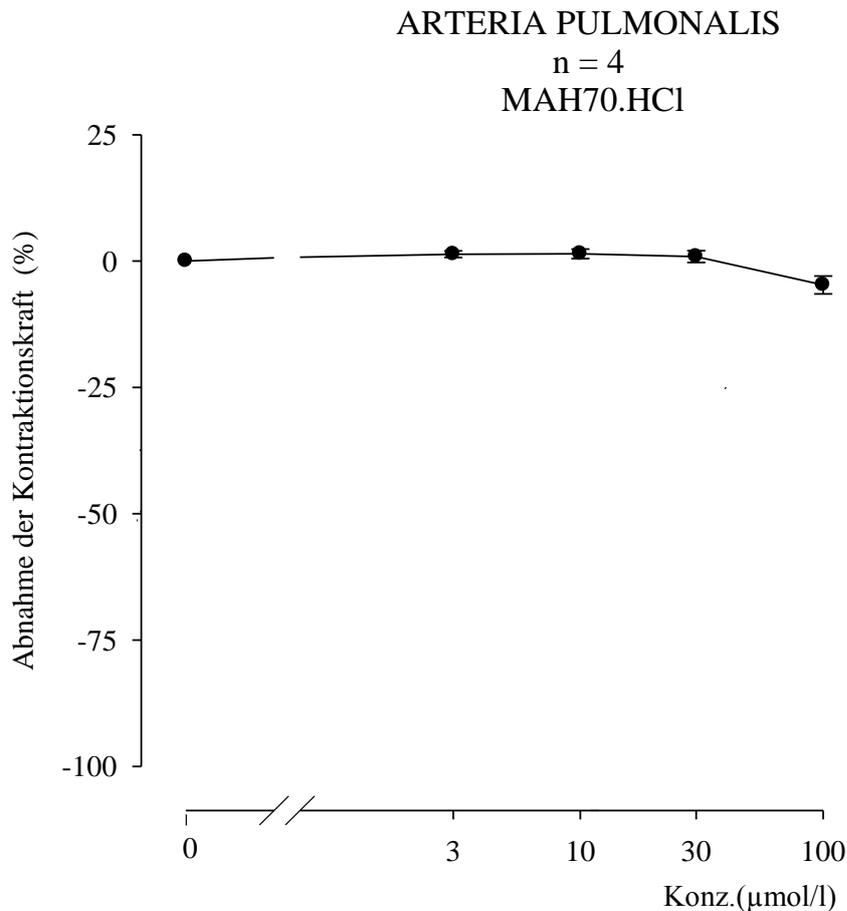
### 4.1.3 Truncus pulmonalis

Am Präparat des Truncus pulmonalis wurde in 4 Versuchen untersucht, inwiefern sich die Zugabe von MAH70.HCl auf die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur auswirkte. Anhand der Tabelle kann man die arithmetischen Mittelwerte und die dazugehörigen Standardfehler der Zu bzw. Abnahme der Kontraktion in mN aus allen 4 Versuchen ablesen, sowie die Veränderung der Kontraktion in Prozent, bezogen auf den Kontrollwert.

**Tabelle 7:** Versuchsergebnisse des Truncus pulmonalis

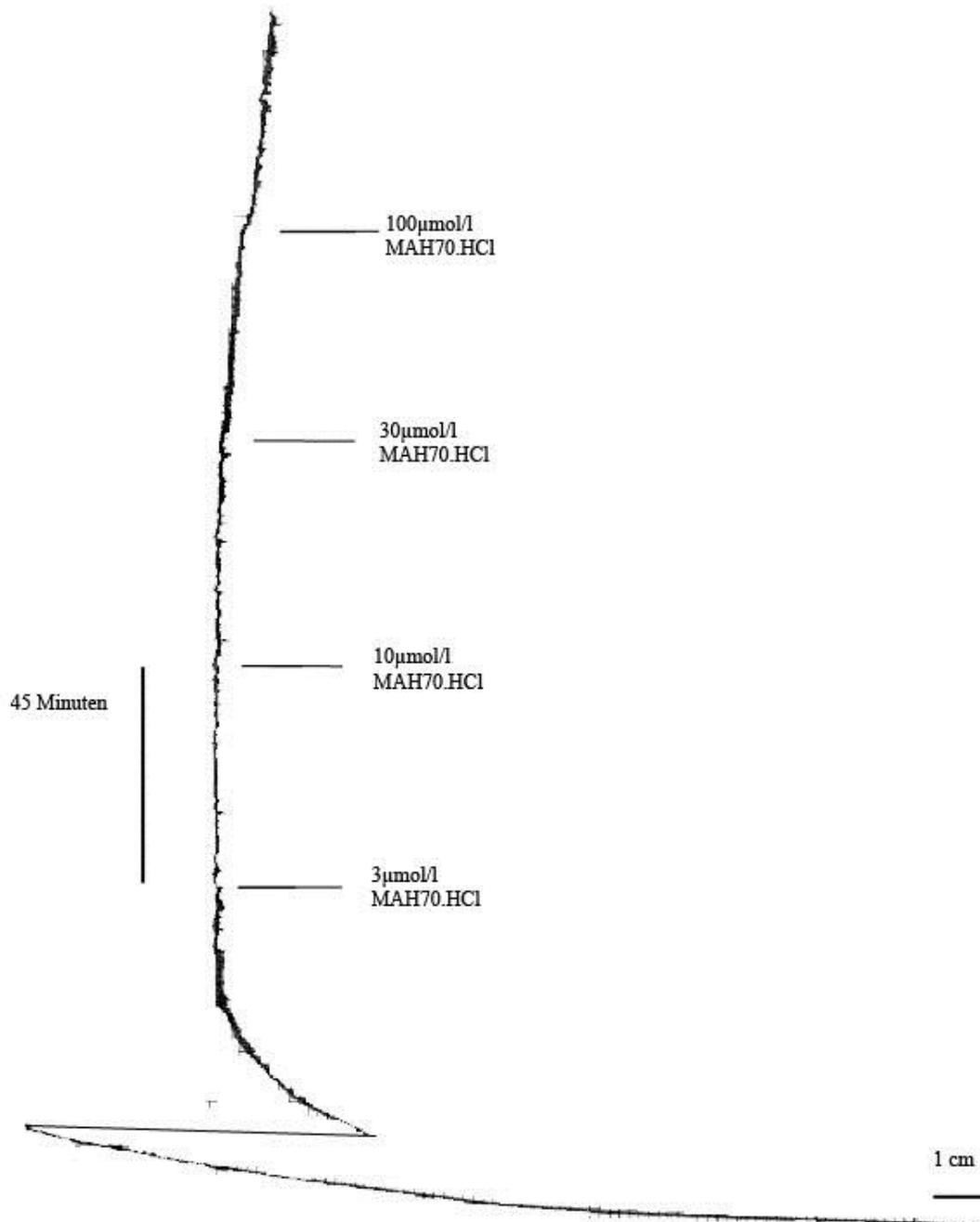
| <b>Konzentration<br/>(<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b> | <b>Anzahl der<br/>Versuche</b> | <b><math>f_c \pm \text{SEM}</math><br/>(mN)</b> | <b><math>f_c \pm \text{SEM}</math><br/>(%)</b> | <b>Irrtums-<br/>wahrscheinlichkeit<br/>(P)</b> |
|---|--------------------------------|---|--|--|
| Kontrolle   | 4                              | $11,31 \pm 2,02$                                | $0 \pm 0$                                      | –  |
| 3   | 4                              | $11,44 \pm 2,00$                                | $1,36 \pm 0,65$                                | n.s  |
| 10  | 4                              | $11,45 \pm 1,99$                                | $1,44 \pm 0,92$                                | n.s  |
| 30  | 4                              | $11,35 \pm 1,90$                                | $0,88 \pm 1,17$                                | n.s  |
| 100   | 4                              | $10,73 \pm 1,86$                                | $-4,72 \pm 1,75$                               | n.s  |

**Abbildung 16:** Konzentrations-Wirkungs-Kurve des Truncus pulmonalis



Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve erlaubt eine graphische Darstellung der ermittelten Mittelwerte, die in Tabelle 7 angegeben sind. Auf der x-Achse sind die jeweiligen Konzentrationen der Testsubstanz in  $\mu\text{mol/l}$  eingezeichnet und auf der y-Achse die Zu- oder Abnahme der Kontraktion in Prozent. Bis zu einer Konzentration von  $30\mu\text{mol/l}$  lässt sich eine minimale Zunahme der Kontraktion erkennen, bevor sie bei einer Konzentration von  $100\mu\text{mol/l}$  wieder leicht absinkt. Die Zu- und anschließende Abnahme der Kontraktion ist zu gering, um eine  $\text{EC}_{50}$  erreichen zu können.

**Abbildung 17:** Originalversuch des Truncus pulmonalis



An Hand des Originalversuches der Pulmonalarterie kann man deutlich erkennen, dass die Auswirkungen von MAH70.HCl nur sehr gering sind. Die Striche markieren den Zeitpunkt an dem eine neue Konzentration der Testsubstanz zum Organbad pipettiert wurde.

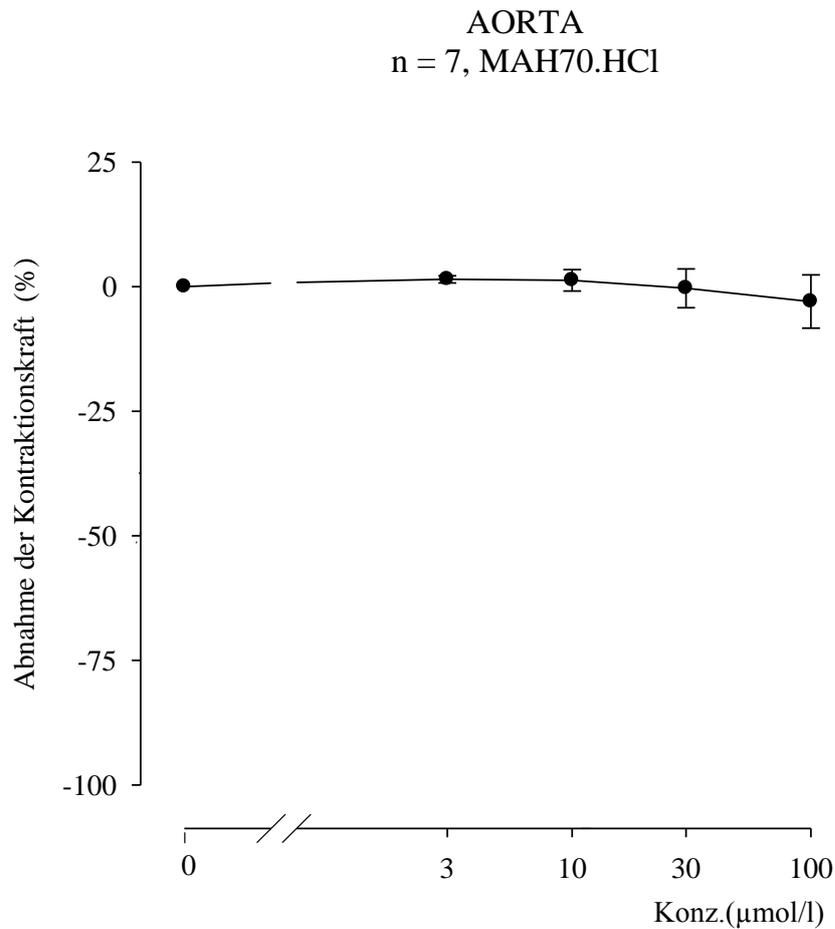
#### 4.1.4 Aorta

Wie auch bei der Versuchsreihe am Truncus pulmonalis wurde auch am Aortenpräparat untersucht, ob die Substanz auf die Aorta descendens eine vasodilatative Wirkung ausübte. Die untenstehende Tabelle zeigt die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen aus sieben Versuchen. Es wird auch die prozentuelle Abnahme bzw. Zunahme der Kontraktion der Gefäßmuskulatur in Prozent angegeben. Die Veränderung der Kontraktion wird in Abhängigkeit vom Kontrollwert, der  $12,39\text{mN} \pm 1,48\text{mN}$  beträgt angegeben.

**Tabelle 8:** Versuchsergebnisse der Aorta

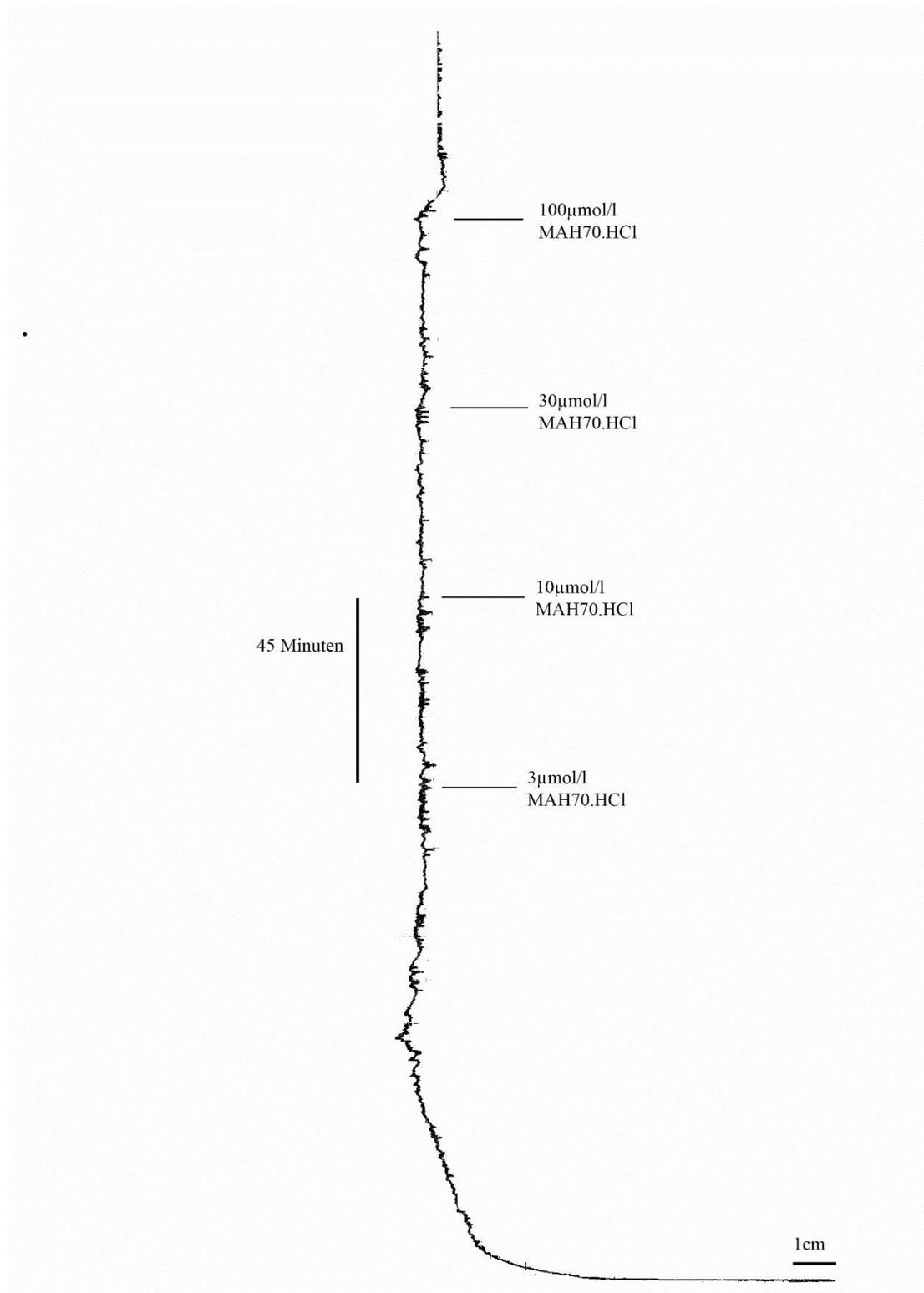
| <b>Konzentration<br/>(<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b> | <b>Anzahl der<br/>Versuche</b> | <b><math>f_c \pm \text{SEM}</math><br/>(mN)</b> | <b><math>f_c \pm \text{SEM}</math><br/>(%)</b> | <b>Irrtums-<br/>wahrscheinlichkeit<br/>(P)</b> |
|---|--------------------------------|---|--|--|
| Kontrolle   | 7                              | $12,39 \pm 1,48$                                | $0 \pm 0$                                      | –  |
| 3   | 7                              | $12,54 \pm 1,44$                                | $1,48 \pm 0,73$                                | n.s  |
| 10  | 7                              | $12,43 \pm 1,33$                                | $1,27 \pm 2,15$                                | n.s  |
| 30  | 7                              | $12,13 \pm 1,19$                                | $-0,32 \pm 3,90$                               | n.s  |
| 100   | 7                              | $11,75 \pm 1,17$                                | $-2,98 \pm 5,34$                               | n.s  |

**Abbildung 18:** Konzentrations-Wirkungs-Kurve der Aorta



Um die Ergebnisse aus der obenstehenden Tabelle graphisch darzustellen, wurde auch hier eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve erstellt. Die Abszisse zeigt die verschiedenen Konzentrationen von MAH70.HCl in µmol/l und auf der Ordinate ist die Abnahme der Kontraktion in Prozent eingezeichnet. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die der Pulmonalarterie. Auch hier kam es zunächst zu einer geringfügigen Zunahme der Kontraktion. Jedoch zeigt sich bei der Versuchsreihe an der Aorta bereits bei einer Konzentration von 30µmol/l eine minimale Abnahme der Kontraktion, die bis zur Endkonzentration weiter zunimmt.

**Abbildung 19:** Originalversuch der Aorta



Der Originalversuch zeigt anschaulich, dass trotz Substanzzugabe nur eine minimale Abnahme der Kontraktion erreicht wird. Anhand der Striche kann abgelesen werden, wann die unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz in das Organbad gegeben wurden.

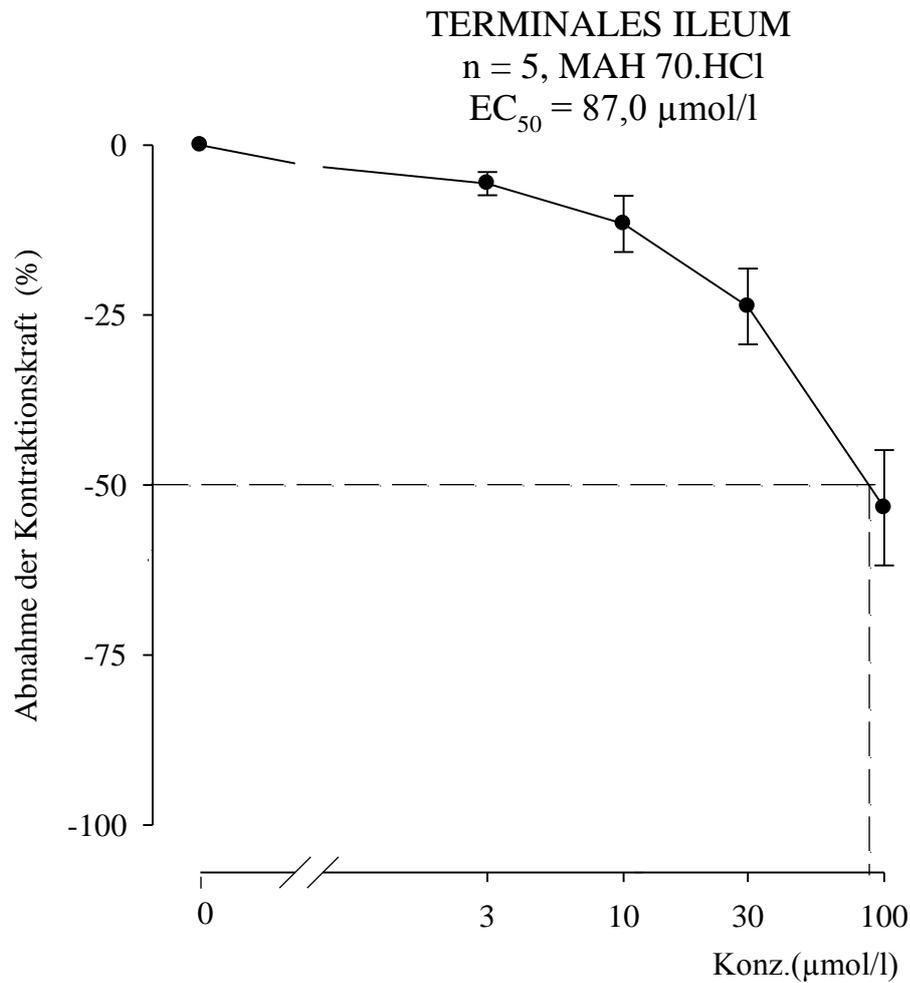
#### 4.1.5 Terminales Ileum

Wie schon bei den Präparaten in Kapitel 4.1.3 und 4.1.4 wurde auch bei der Versuchsreihe am terminalen Ileum die Abnahme der Kontraktion durch MAH70.HCl erforscht. Aus der Tabelle werden wieder die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen aus den durchgeführten Versuchen ersichtlich. Die arithmetischen Mittelwerte sind in mN angegeben, wohingegen die Abnahme der Kontraktion in Prozent angegeben wird. Die prozentuelle Abnahme der Kontraktion wird in Bezug auf den Kontrollwert von  $8,22\text{mN} \pm 0,72\text{mN}$  berechnet.

**Tabelle 9:** Versuchsergebnisse des terminalen Ileums

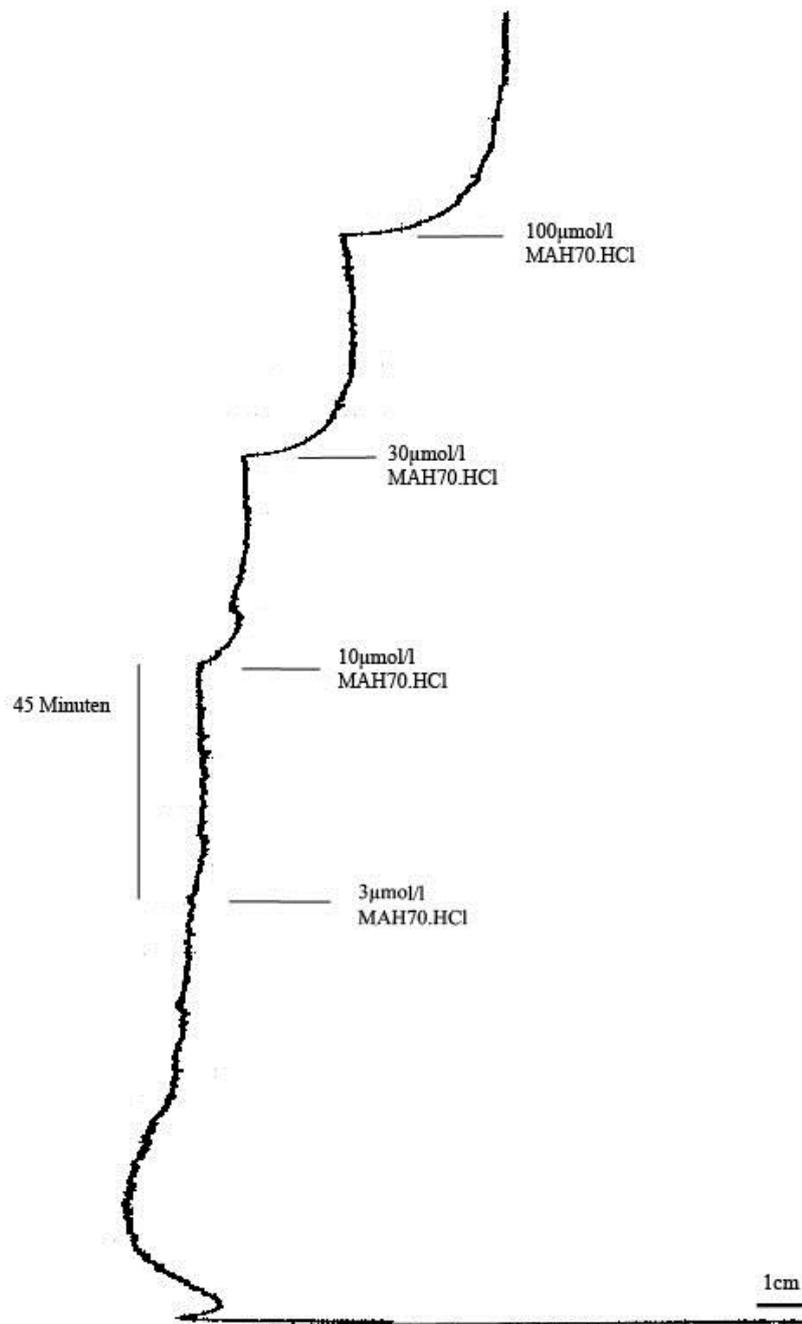
| <b>Konzentration<br/>(<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b> | <b>Anzahl der<br/>Versuche</b> | <b><math>f_c \pm \text{SEM}</math><br/>(mN)</b> | <b><math>f_c \pm \text{SEM}</math><br/>(%)</b> | <b>Irrtums-<br/>wahrscheinlichkeit<br/>(P)</b> |
|---|--------------------------------|---|--|--|
| Kontrolle   | 4                              | $8,22 \pm 0,72$                                 | $0 \pm 0$                                      | –  |
| 3   | 4                              | $7,77 \pm 0,72$                                 | $-5,67 \pm 1,71$                               | n.s  |
| 10  | 4                              | $7,29 \pm 0,75$                                 | $-11,59 \pm 4,14$                              | 0,05   |
| 30  | 4                              | $6,24 \pm 0,63$                                 | $-23,75 \pm 5,58$                              | 0,05   |
| 100   | 4                              | $3,76 \pm 0,65$                                 | $-53,34 \pm 8,48$                              | 0,01   |

**Abbildung 20:** Konzentrations-Wirkungs-Kurve des terminalen Ileums



Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve veranschaulicht die Abnahme der Kontraktion. Bei jeder einzelnen Konzentration kommt es zu einer weiteren Abnahme der Kontraktion im Vergleich zum Ausgangswert. Bei einer Konzentration von 87,0 µmol/l konnte ein EC<sub>50</sub> Wert ermittelt werden. Die gestrichelte Linie in der Konzentrations-Wirkungskurve zeigt den Wert, bei dem es zu einer 50%igen Abnahme der Kontraktion kommt.

**Abbildung 21:** Originalversuch des Dünndarmpräparates



Dieser Originalversuch eines Dünndarmpräparats zeigt eine kontinuierliche Abnahme der Kontraktion. Die Striche markieren den Zeitpunkt, an dem die unterschiedlichen Konzentrationen von MAH70.HCl zugegeben wurden. Nach jeder Erhöhung der Konzentration kam es zu einem weiteren spasmodischen Effekt.

## 4.2 Ergebnisse des Wirkmechanismus

Nachdem am terminalen Ileum eine  $EC_{50}$  ermittelt werden konnte, wurde hier zusätzlich noch ein potenzieller Wirkmechanismus untersucht.

Da MAH70.HCl ein Schwefelwasserstoff-Derivat ist, geht man davon aus, dass über die Freisetzung von  $H_2S$  aus der Testsubstanz ATP-abhängige  $K^+$ -Kanäle geöffnet werden, wodurch es dann zur Vasodilatation kommt.

Um diese Theorie zu verifizieren wurde nach dem Erreichen einer konstanten Kontraktion in einer Versuchsreihe  $30\mu\text{mol/l}$  und in der anderen  $100\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid für je 45 Minuten zugegeben. Diese Substanz blockiert die ATP-abhängigen Kaliumkanäle. Wenn nun der vasodilatative Effekt der Testsubstanz über die Öffnung dieser Kanäle zustande kommt, sollte durch die Zugabe von MAH70.HCl die Wirkung von Glibenclamid aufgehoben werden. Die Konzentration der Testsubstanz, die man für die Untersuchung des Wirkmechanismus verwendete, war  $100\mu\text{mol/l}$ , da erst bei dieser Konzentration eine  $EC_{50}$  ermittelt werden konnte. Die Zugabe von MAH70.HCl erfolgte 45 Minuten nach der Zugabe von Glibenclamid und wurde ebenfalls für 45 Minuten aufgezeichnet.

Für beide Versuchsreihen wurden Tabellen erstellt. Aus den Tabellen können Anzahl der Versuche, Mittelwerte und entsprechende Standardfehler, Irrtumswahrscheinlichkeit, sowie die Abnahme der Kontraktion in Prozent abgelesen werden.

Ein Balkendiagramm dient zur graphischen Darstellung der Ergebnisse.

Zusätzlich zu der Tabelle und dem Balkendiagramm ist noch ein Originalversuch zu jeder Konzentration von Glibenclamid abgebildet.

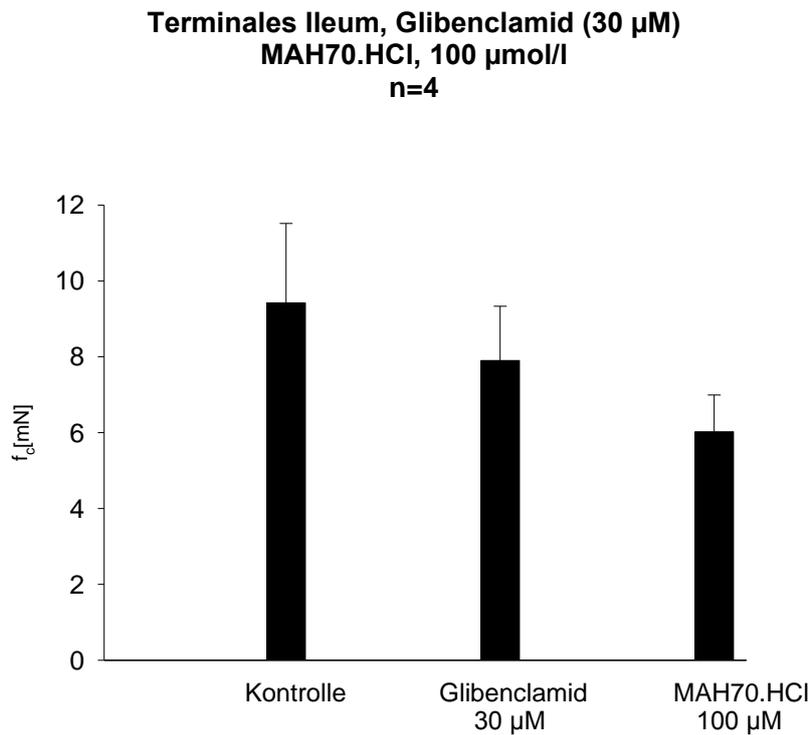
#### 4.2.1 Ergebnisse mit 30 $\mu$ mol/l Glibenclamid

Es wurden 4 Versuche mit einer 30 $\mu$ M Konzentration von Glibenclamid durchgeführt. Mittelwerte der Kontraktionsabnahme und Standardfehler, wie auch die Irrtumswahrscheinlichkeit können aus der untenstehenden Tabelle abgelesen werden.

**Tabelle 10:** Versuchsergebnisse des Wirkmechanismus (30 $\mu$ M)

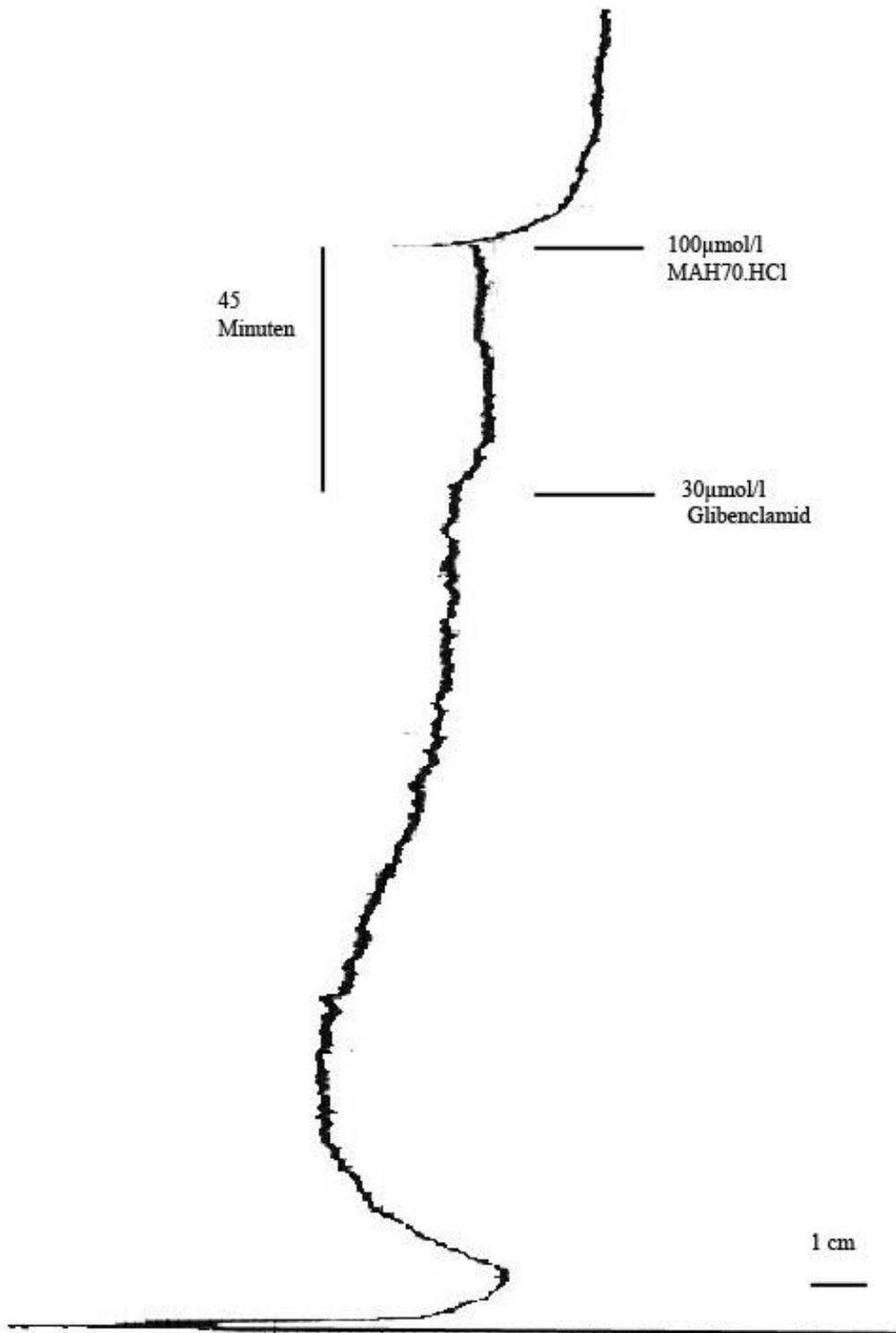
| <b>Konzentration<br/>(<math>\mu</math>mol/l)</b> | <b>Anzahl der<br/>Versuche</b> | <b><math>f_c \pm</math> SEM<br/>(mN)</b> | <b>Irrtums-<br/>wahrscheinlichkeit (P)</b> |
|--|--------------------------------|--|--|
| Kontrolle  | 4                              | 9,42 $\pm$ 2,09                          | –  |
| 30 $\mu$ mol/l<br>Glibenclamid                   | 4                              | 7,90 $\pm$ 1,43                          | –  |
| 100 $\mu$ mol/l<br>MAH70.HCl                     | 4                              | 6,02 $\pm$ 0,97                          | n.s  |

**Abbildung 22:** Balkendiagramm des Wirkmechanismus (30 $\mu$ M)



Es sind mit Hilfe des Balkendiagramms die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardfehler der jeweiligen Konzentrationen abgebildet. Anhand dieses Diagramms kann man sehen, dass es sowohl durch Glibenclamid als auch durch Zugabe von MAH70.HCl zu einer Abnahme der Kontraktion am Dünndarm gekommen ist.

**Abbildung 23:** Originalversuch vom Wirkmechanismus (30 $\mu$ M)



Am Originalversuch des Wirkmechanismus sieht man, dass es trotz einer Konzentration von 30 $\mu$ mol/l Glibenclamid zu einer weiteren Abnahme der Kontraktionskurve mit 100 $\mu$ mol/l MAH70.HCl kommt.

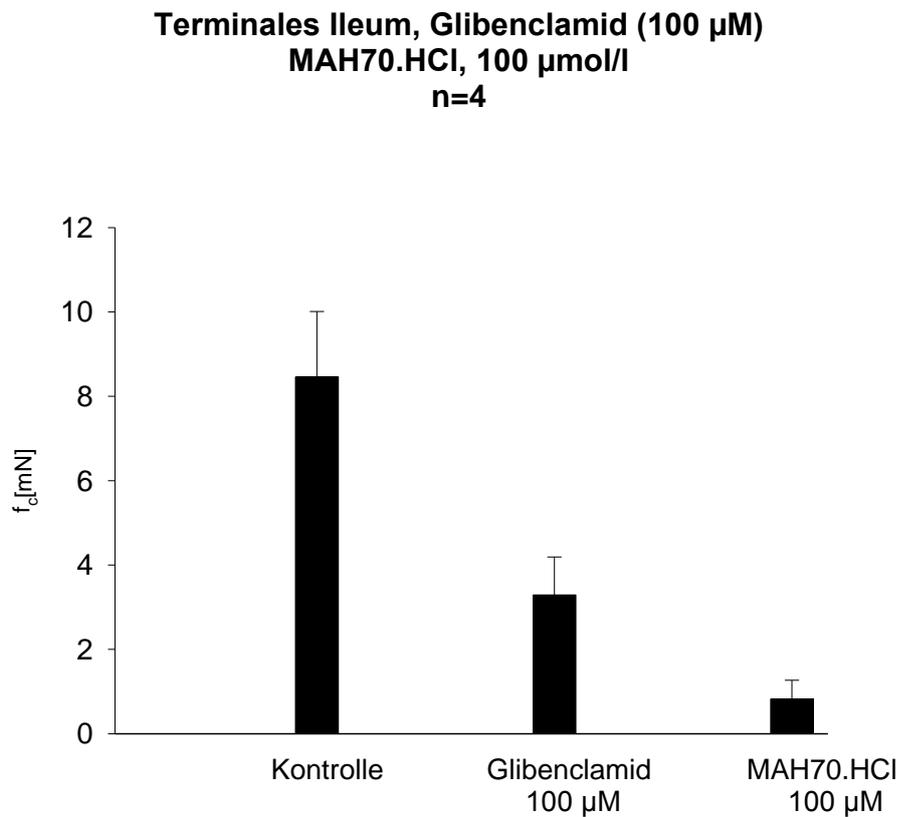
#### 4.2.2 Ergebnisse mit 100µmol/l Glibenclamid

Aus 4 Versuchen wurde bei einer Konzentration von 100µmol/l die spasmolytische Wirkung von Glibenclamid und MAH70.HCl untersucht. Die arithmetischen Mittelwerte und die entsprechenden Standardfehler werden in mN angegeben. Durch die Zugabe von Glibenclamid kam es zu einer Abnahme der Kontraktionskraft von 8,45mN auf 3,29mN. Nach der Zugabe von MAH70.HCl ist die Kontraktion auf einen Wert von durchschnittlich 0,82mN abgefallen.

**Tabelle 11:** Versuchsergebnisse des Wirkmechanismus (100µmol)

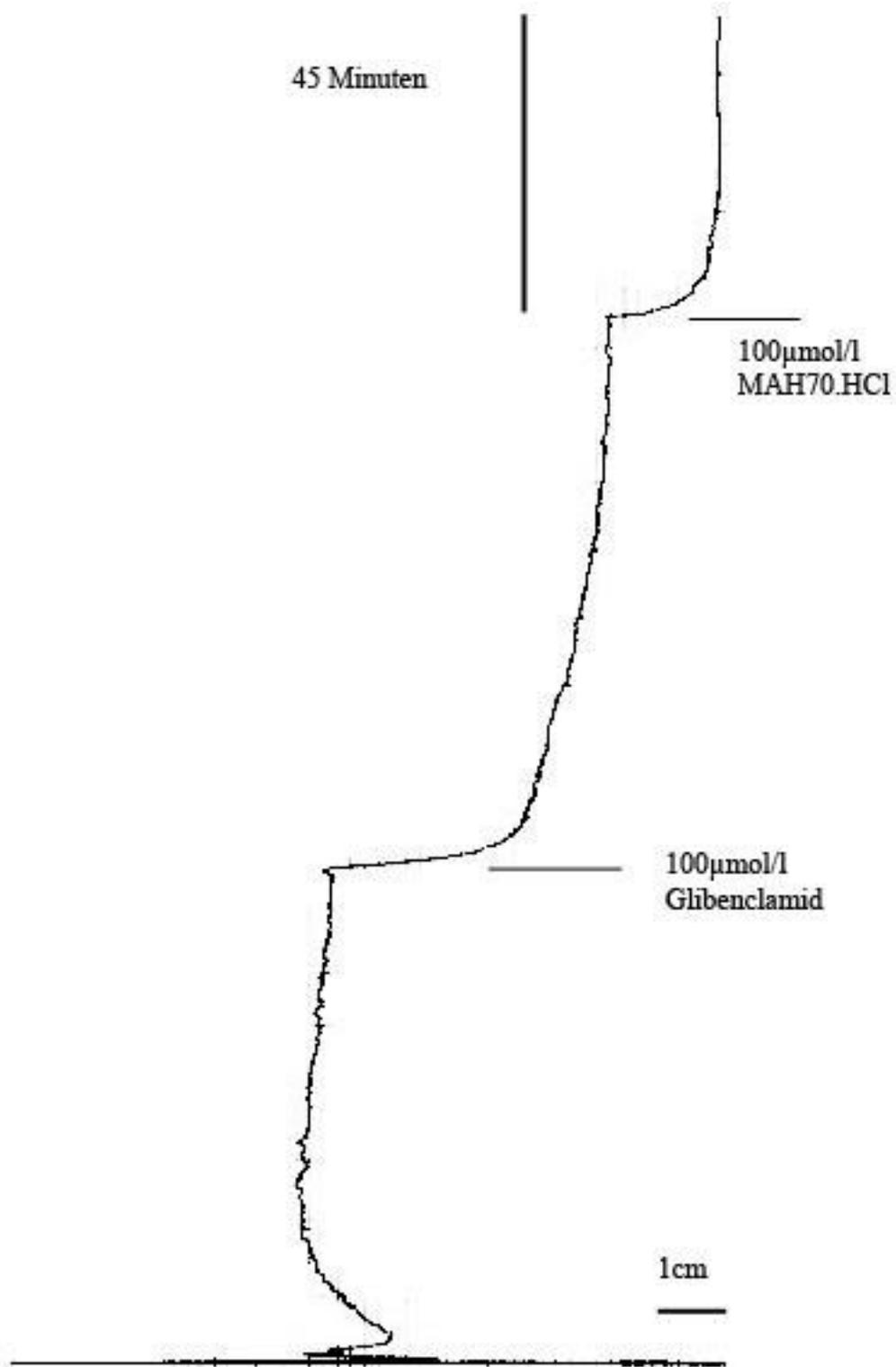
| <b>Konzentration<br/>(µmol/l)</b> | <b>Anzahl der<br/>Versuche</b> | <b>f<sub>c</sub> ± SEM<br/>(mN)</b> | <b>Irrtums-<br/>wahrscheinlichkeit (P)</b> |
|-----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--|
| Kontrolle                         | 4                              | 8,45 ± 1,56                         | –  |
| 100µmol/l<br>Glibenclamid         | 4                              | 3,29 ± 0,90                         | –  |
| 100µmol/l<br>MAH70.HCl            | 4                              | 0,82 ± 0,45                         | 0,05                                       |

**Abbildung 24:** Balkendiagramm des Wirkmechanismus (100 $\mu$ M)



Das Balkendiagramm zeigt die die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardfehler aus allen 4 Versuchen. Nach der Zugabe von 100 $\mu$ mol Glibenclamid und MAH70.HCl kommt es zu einer starken Spasmolyse.

**Abbildung 25:** Originalversuch des Wirkmechanismus (100 $\mu$ M)



Der Originalversuch zeigt, dass es trotz Glibenclamid zu einer weiteren Abnahme der Kontraktion durch die Testsubstanz kommt.

## 5 Diskussion

Die ausgewerteten Ergebnisse werden in diesem Teil diskutiert und miteinander verglichen

### 5.1 Wirkung von MAH70.HCl auf die Präparate mit glatter Muskulatur

Zur Testung der Wirkung von MAH70.HCl wurden Präparate der Aorta descendens, der Arteria pulmonalis und des terminalen Ileums verwendet. Die beiden Gefäßpräparate dienten zur Untersuchung einer möglichen Vasodilatation durch MAH70.HCl und am terminalen Ileum wurde die spasmolytische Wirkung der Testsubstanz untersucht. Aorta und Pulmonalarterie zeigten unter dem Einfluss von MAH70.HCl kaum eine Wirkung, wohingegen die spasmolytische Wirkung am Dünndarm deutlich erkennbar war. Der EC<sub>50</sub>-Wert am terminalen Ileum beträgt 87,0 µmol/l.

**Tabelle 12:** Vergleich der Änderungen der Kontraktion an glattemuskulären Präparaten

| <b>Präparat</b>           | <b>Veränderung der Kontraktion (%) bei 3 µmol MAH70.HCl</b> | <b>Veränderung der Kontraktion (%) bei 100 µmol MAH70.HCl</b> |
|---------------------------|---|---|
| <b>Truncus pulmonalis</b> | 1,36 ± 0,65   | -4,72 ± 1,75  |
| <b>Aorta descendens</b>   | 1,48 ± 0,73   | -2,98 ± 5,34  |
| <b>terminales Ileum</b>   | -5,67 ± 1,71  | -53,34 ± 8,48   |

#### 5.1.1 Wirkungen von MAH70.HCl auf den Truncus pulmonalis

Die Wirkung der Testsubstanz auf die Präparate des Truncus pulmonalis ist sehr gering. Anfänglich kommt es zu einer Zunahme der Kontraktion im Vergleich zur Kontrollphase. Bei einer Konzentration von 3 µmol/l beträgt der Mittelwert aus allen vier Versuchen 11,44 mN ± 2,00 mN im Vergleich zur Kontrollphase, bei der der Mittelwert 11,31 mN ± 2,02 mN beträgt. Dies entspricht einer Zunahme von 1,36%. Die Kontraktion steigt nach Zugabe der nächsten Konzentration weiter an, bevor es dann zu einer geringfügigen Vasodilatation kommt. Im Vergleich zur Kontrolle kommt es zu einer Abnahme der Kontraktion an der Pulmonalarterie

um insgesamt  $4,72\% \pm 1,75\%$ . Eine  $EC_{50}$  konnte nicht ermittelt werden, da keine Abnahme der Kontraktion von über 50% zustande kam. Der Effekt, den die Substanz auf das Präparat ausübt reicht nicht aus, um eine Wirkung festzustellen.

### 5.1.2 Wirkung von MAH70.HCl auf die Aorta descendens

Die Testsubstanz zeigte auf die Aorta descendens eine ähnliche Wirkung, wie auf den Truncus pulmonalis. Nach dem Erreichen der konstanten Plateauphase kam es zunächst noch zu einer weiteren Kontraktion von  $1,48\% \pm 0,73\%$  des Ausgangswertes bei einer Konzentration von  $3\mu\text{mol/l}$ . Danach fiel die Kontraktion ab. Nach er Zugabe der zweiten Substanzkonzentration bis zum Erreichen des steady states kam es zu einer geringfügigen Abnahme der Kontraktion, insgesamt gesehen lag sie jedoch noch  $1,27\% \pm 2,15\%$  über dem Kontrollwert. Erst nachdem weitere  $20\mu\text{mol}$  von MAH70.HCl in das Organbad pipettiert wurden, kam es zu einer minimalen Dilatation der Gefäßmuskulatur um  $0,32\% \pm 3,90\%$ . Nach Beendigung des Versuches kam man im Durchschnitt auf eine Abnahme der Kontraktion von  $2,98\% \pm 5,34\%$ . Diese Abnahme reichte nicht aus, um eine  $EC_{50}$  berechnen zu können. Die anfängliche Zunahme der Kontraktion könnte auch daran liegen, dass während der Kontrollphase die Kontraktion noch keine Konstanz erreicht hatte. Die Auswirkungen der Substanz auf die Gefäßmuskulatur der Aorta descendens sind zu gering um einen therapeutischen Effekt erreichen zu können.

### 5.1.3 Wirkung von MAH70.HCl auf das terminale Ileum

Im Gegensatz zu den zwei Gefäßpräparaten zeigt die Testsubstanz eine deutliche Wirkung auf die glatte Muskulatur des terminalen Ileums. Bereits nach der ersten Substanzzugabe lässt sich eine spasmolytische Wirkung auf das Dünndarmpäparat erkennen. Die Kontraktion der Muskulatur nimmt hier um  $5,67\% \pm 1,71\%$ , bezogen auf den Wert der Kontrollphase von  $8,22\text{mN} \pm 0,72\text{mN}$ , ab. Im weiteren Verlauf des Versuches kommt es zu einer stetigen Spasmolyse bis auf einen Wert von durchschnittlich  $3,76\text{mN} \pm 0,65\text{mN}$ . Dies entspricht einer Kontraktionsabnahme von  $53,34\% \pm 8,48\%$ . Die Spasmolyse ist ausreichend stark um einen  $EC_{50}$  Wert zu berechnen. Dieser beträgt hier  $87,0\mu\text{mol/l}$ .

Aus den Wirkungen von MAH70.HCl auf die glattemuskulären Präparate ergibt sich eine sehr selektive Wirkung auf die Muskulatur des terminalen Ileums. Einem möglichen Einsatz als

Spasmolytikum steht der hohe  $EC_{50}$  Wert entgegen, da die therapeutischen Dosen sehr hoch gewählt werden müssten und dann auch die Gefahr von Nebenwirkungen bestünden.

## 5.2 Wirkungen von MAH70.HCl auf die Herzmuskulatur

Neben den Wirkungen auf die glatte Muskulatur wurden auch die Effekte auf die Herzmuskulatur, welche zur quergestreiften Muskulatur gehört, untersucht. Am Atrium dextrum wurde die Chronotropie untersucht, während man am Musculus papillaris eine Wirkung der Testsubstanz auf die Inotropie erfasste.

Im Gegensatz zum Papillarmuskel, kontrahiert sich der rechte Vorhof auf Grund des Sinusknotens selbstständig und muss nicht zusätzlich gereizt werden. Durch das Fehlen solcher Schrittmacherzellen am Papillarmuskel wurde dieser durch eine Elektrode zusätzlich elektrisch stimuliert.

MAH70.HCl zeigt an beiden Präparaten eine potente Wirkung. Am Vorhof ergibt sich aus den Versuchen eine starke negativ chronotrope Wirkung und am Papillarmuskel eine stark negativ inotrope Wirkung.

**Tabelle 13:** Vergleich der Abnahme der Kontraktion an Präparaten mit quergestreifter Muskulatur

| <b>Präparat</b>            | <b>Abnahme der Kontraktilität (<math>f \pm SEM</math>) bei <math>100\mu\text{mol/l}</math></b> | <b><math>EC_{50}</math> (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b> |
|----------------------------|--|--|
| <b>Atrium dextrum</b>      | $-78,76 \pm 13,57$   | 53,5   |
| <b>Musculus papillaris</b> | $-92,48 \pm 2,47$  | 11,8   |

### 5.2.1 Wirkungen von MAH70.HCl auf das Atrium dextrum

Zur Beurteilung der Chronotropie am Vorhof wurden die Schläge pro Minute gemessen. Sobald man eine konstante Phase erreicht hatte, wurde die Substanz wie schon in Kapitel 3 geschildert wurde kumulativ zugegeben. Der Kontrollwert, der aus allen 6 Versuchen ermittelt wurde betrug durchschnittlich  $192,50 \pm 8,83$  Schläge pro Minute. Bei einer Konzentration von  $3\mu\text{mol/l}$  MAH70.HCl nahmen die Schläge pro Minute um  $1,49\% \pm 3,02\%$  zu, bevor sich die Anzahl reduzierte. Nach dem Erreichen einer Konzentration von  $10\mu\text{mol/l}$  konnte bereits ein moderater negativ chronotroper Effekt der Testsubstanz festgestellt werden. Im weiteren Versuchsverlauf verstärkte sich dieser Effekt, bis bei einer Konzentration von  $100\mu\text{mol/l}$  sich eine durchschnittliche Abnahme der Schlagfrequenz auf  $40,83 \pm 26,03$  Schläge pro Minute ergab. Dies entspricht einer prozentuellen Abnahme von  $78,76\% \pm 13,57\%$  vom Kontrollwert. Die größte Reduktion der Schlagfrequenz ergab sich zwischen einer Konzentration von  $30\mu\text{mol/l}$  und einer Konzentration von  $100\mu\text{mol/l}$ . Erreichte die Konzentration von MAH70.HCl  $53,5\mu\text{mol/l}$  im Organbad, so kam es zu einer 50%igen Reduktion der Schlagfrequenz. Der negativ chronotrope Effekt der Testsubstanz auf den Vorhof ist somit deutlich erkennbar.

### 5.2.2 Wirkungen von MAH70.HCl auf den Musculus papillaris

Zur Untersuchung des Einflusses von MAH70.HCl auf die Kontraktionskraft am Papillarmuskel wurden 5 Versuche durchgeführt. Die Mittelwerte aus allen 5 Versuchen zeigen eine starke negativ inotrope Wirkung der Testsubstanz auf das Präparat. Nach Zugabe von  $3\mu\text{mol/l}$  kam es bereits zu einer Abnahme der Kontraktionskraft von  $26,30\% \pm 4,86\%$ . Dieser Effekt nahm nach weiteren Substanzzugaben stetig zu. Nachdem eine Konzentration von  $10\mu\text{mol/l}$  im Organbad erreicht wurde sank die Kontraktilität auf einen Wert von  $-46,04\% \pm 7,26$  im Vergleich zum Ausgangswert von  $1,12\text{mN} \pm 0,11\text{mN}$ . Bei einer Konzentration von  $100\mu\text{mol/l}$  betrug die Abnahme der Konzentration verglichen mit dem Kontrollwert  $92,48\% \pm 2,47\%$ . Die  $EC_{50}$  wird bei einer Konzentration von  $11,8\mu\text{mol/l}$  erreicht und zeigt, dass die Wirkung am Papillarmuskel sehr stark ausgeprägt ist.

Die Testsubstanz hat sowohl am Papillarmuskel als auch am Vorhof und dem terminalen Ileum eine deutliche Wirkung. Wobei die Wirkungen an der quergestreiften Muskulatur stärker ausgeprägt sind als die geringe spasmolytische Wirkung am Dünndarm.

Da es sowohl an der glatten Muskulatur als auch an der quergestreiften Muskulatur zu einer signifikanten Wirkung kommt fehlt der Testsubstanz die Selektivität, die für einen möglichen therapeutischen Einsatz gewünscht wäre.

### 5.3 Beurteilung der Ergebnisse des Wirkmechanismus

Neben den Wirkungen auf Vorhof, Papillarmuskel, Dünndarm, Aorta und Pulmonalarterie war auch die Untersuchung auf einen möglichen Wirkmechanismus Teil dieser Arbeit. Um eine Versuchsreihe zum Wirkmechanismus durchführen zu können, musste ein Präparat gewählt werden, an dem eine  $EC_{50}$  festgestellt werden konnte. In diesem Fall wurde für die Versuchsreihe das terminale Ileum herangezogen, bei dem ein  $EC_{50}$ -Wert von  $87,0\mu\text{mol/l}$  ermittelt wurde.

Da die Testsubstanz ein Schwefelwasserstoff-Derivat ist, wurde angenommen, dass die Wirkung auf die Organe durch die Freisetzung von  $\text{H}_2\text{S}$  und die dadurch vermittelte Öffnung ATP-abhängiger Kaliumkanäle zustande kommt. Der genaue Mechanismus durch den es zur Vasodilatation kommt, wurde bereits in der Einleitung beschrieben.

Auf Grund dieser Annahme, wurde zur Testung des Wirkmechanismus Glibenclamid, das die Öffnung ATP-abhängiger Kaliumkanäle verhindert, herangezogen. Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt mit unterschiedlichen Konzentrationen von Glibenclamid.

In der ersten Versuchsreihe wurde eine Konzentration von  $30\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid gewählt. Der Versuch wurde wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben durchgeführt. Nach der Zugabe von Glibenclamid kam es bereits zu einer Abnahme der Kontraktion. Diese Veränderung in der Kontraktion lässt sich eventuell durch das Lösungsmittel DMSO erklären. Der Wert der Kontraktion sank von  $9,42\text{mN} \pm 2,09\text{mN}$  des Kontrollwertes auf  $7,09\text{mN} \pm 1,43\text{mN}$  unter dem Einfluss von Glibenclamid.

Nach der Zugabe von  $100\mu\text{mol}$  der Testsubstanz kam es zu einer weiteren Reduktion der Kontraktion auf  $6,02\text{mN} \pm 0,97\text{mN}$ .

Die zweite Versuchsreihe, bei der eine Konzentration von  $100\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid zugegeben wurde, lieferte ähnliche Ergebnisse wie die erste Versuchsreihe. Auch hier kam es bereits durch das hinzu pipettieren von  $100\mu\text{mol/l}$  zu einer Vasodilatation. Der Mittelwert aus

allen 4 Versuchen ergab eine Abnahme der Kontraktion auf  $3,29\text{mN} \pm 0,90\text{mN}$ . Der Ausgangswert betrug  $8,45\text{mN} \pm 1,56\text{mN}$ . Nach der Zugabe von  $100\mu\text{mol/l}$  MAH70.HCl nahm die Spasmolyse weiter zu und die Kontraktion sank auf einen Wert von  $0,82\text{mN} \pm 0,45\text{mN}$ . Die Ergebnisse ähneln denen aus der ersten Versuchsreihe, mit dem Unterschied, dass die Dilatation der glatten Muskelzellen bei einer Konzentration von  $100\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid stärker ist, als bei einer Konzentration von  $30\mu\text{mol/l}$ .

Auf Grund der erhaltenen Daten aus der Versuchsreihe mit  $100\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid kann eine Wirkung über die Freisetzung von  $\text{H}_2\text{S}$  und die damit verbundene Öffnung ATP-abhängiger Kaliumkanäle ausgeschlossen werden. Bei der Versuchsreihe mit einer Konzentration von  $30\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid kann man eine Beteiligung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle nicht ausschließen. Möglich ist auch, dass mehrere verschiedene Wirkmechanismen für den Effekt der Testsubstanz auf die Präparate verantwortlich sind.

Für die Verifizierung dieses Ergebnisses bzw. die endgültige Klärung des Wirkmechanismus sind jedoch weitere Versuche notwendig.

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit wurde die Substanz MAH70.HCl auf mögliche Wirkungen auf isolierte Organe von Meerschweinchen getestet.

Die Organe, die hierfür verwendet wurden waren Aorta, Pulmonalarterie, Dünndarm, Vorhof und Papillarmuskel.

An der Aorta, der Pulmonalarterie und dem Dünndarm wurde die Vasodilatative Wirkung der Substanz an den Präparaten getestet. Am Vorhof wurde der Effekt der Substanz auf die Schlagfrequenz pro Minute und am Papillarmuskel die Kontraktionskraft untersucht.

Die Substanzzugabe zum Organbad erfolgte in kumulativen Schritten. Man begann mit einer Konzentration von  $3\mu\text{mol/l}$  und erhöhte diese nach jeweils 45 Minuten auf  $10\mu\text{mol/l}$ , dann auf  $30\mu\text{mol/l}$  und zum Schluss betrug die Konzentration von MAH70.HCl  $100\mu\text{mol/l}$  im Organbad.

Es wurde an jedem Präparat eine Versuchsreihe durchgeführt mit mindestens 4 Versuchen.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden ausgewertet und die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen ermittelt. Es wurden auch die Änderungen der Kontraktion in Prozent angegeben.

Zu jeder Versuchsreihe wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve ermittelt und sofern möglich eine  $EC_{50}$  ermittelt.

Nach Auswertung der Versuche kam man zu dem Ergebnis, dass die Testsubstanz auf die Präparate mit glatter Gefäßmuskulatur nur eine geringe vasodilatative Wirkung hat. Präparate mit glatter Gefäßmuskulatur sind Aorta und Pulmonalarterie. Die Abnahme der Kontraktion war so gering, dass man zu keinem  $EC_{50}$ -Wert kam. Im Gegensatz dazu kam es am Dünndarm zu einer stärkeren Vasodilatation, mit einem  $EC_{50}$ -Wert von  $87,0\mu\text{mol/l}$ .

Die Versuchsreihen am Vorhof und am Papillarmuskel ergaben eine sehr ausgeprägte Wirkung von MAH70.HCl. Die  $EC_{50}$ -Werte betragen  $53,5\mu\text{mol/l}$  am Vorhof und  $11,8\mu\text{mol/l}$  beim Papillarmuskel. Somit ergibt sich die stärkste Wirkung der Testsubstanz am Papillarmuskel.

Zur Untersuchung des Wirkmechanismus wurde der Dünndarm herangezogen. Es wurde geprüft, ob die Wirkung der Substanz auf einer Öffnung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen beruht. Dies konnte nicht eindeutig geklärt werden. Zur Ermittlung des Wirkmechanismus müssten noch weitere Versuche durchgeführt werden.

## 7 Literaturverzeichnis

Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K (2013) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 11. Auflage, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München, ISBN 978-3-437-42523-3

Ammon HPT (2004) Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch, 9. Auflage, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin, ISBN 3-11-017487-1

Auterhoff H, Knabe J, Höltje HD (1999) Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie, 14. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, ISBN 3-8047-1645-8

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

Hosoki R, Matsuki N, Kimura H (1997) The Possible Role of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Smooth Muscle Relaxant in Synergy with Nitric Oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 237: 527-531

Liu H, Bai X-B, Shi S, Cao Y-X (2009) Hydrogen sulfide protects from intestinal ischaemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 61: 207–212

Mortimer E, Müller U (2007) Chemie, 9. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, ISBN 978-3-13-484309-5

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Menzel S, Ruth P (2013), Mutschler Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie, 10. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, ISBN 978-3-8047-2898-1

Reiter M (1967) Die Wertbestimmung inotrope wirkender Arzneimittel am isolierten Papillarmuskel. *Arzneimittelforschung* 17: 1249-1253

Steinhilber D, Schubert-Zsilavec M, Roth HJ (2010) Medizinische Chemie, 2. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, ISBN 978-3-7692-5002-2

Wagner F, Asfar P, Calzia E, Radermacher P, Szabó C (2009) Bench-to-bedside review: hydrogen sulfide—the third gaseous transmitter: applications for critical care. *Critical Care* 13: 213-222

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

Yang C, Yang Z, Zhang M, Dong Q, Wang X, Lan A, Zeng F, Chen P, Wang C, Feng J (2011) Hydrogen sulfide protects against chemical hypoxia-induced cytotoxicity and inflammation in hacat cells through inhibition of ROS/NF- $\kappa$ B/COX-2 pathway. *PLoS ONE* 6: e21971

Yang G, Wu L, Jiang B, et al (2008) H<sub>2</sub>S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine  $\gamma$ -lyase. *Science* 322: 587–590

Yan H, Du J, Tang C (2003) The possible Role of Hydrogen Sulfide on pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313: 22-27

Yong QC, Pan TT, Hu LF, Bian JS (2008) Negative regulation of beta-adrenergic function by hydrogen sulphide in the rat hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 44: 701-710

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

## 8 Curriculum vitae

Julia Nagl

geboren am 31.10.1988 in Vilsbiburg, Bayern

deutsche Staatsbürgerschaft



### Kontaktdaten

---

Morizgasse 11/17

1060 Wien

### Ausbildung

---

|                     |   |
|---------------------|---|
| 10.2008 bis 1.2016  | Studium der Pharmazie an der Universität Wien<br><br>Diplomarbeit am Department für Pharmakologie bei Prof. Dr.Christian Studenik |
| 09.1999 bis 06.2008 | Karl von Cloßen Gymnasium in Gern   |
| 09.1995 bis 06.1999 | Grundschule Falkenberg  |

### Schüler und Studentenjobs

---

|                     |  |
|---------------------|--|
| seit September 2015 | Studentische Hilfskraft in der Apotheke zur heiligen Agnes, Klosterneuburg |
| Juli 2015-Aug 2015  | Praktikum in der Apotheke zur heiligen Agnes, Klosterneuburg               |
| 2008-2014 (Sommer)  | Fließbandarbeit bei Mann und Hummel in Marklkofen                          |
| 2006-2007           | Wäscherei der Behindertenwerkstätte in Eggenfelden                         |
| Juli 2005           | Pflegehilfe im Parkwohnstift Arnstorf                                      |