



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Pharmakologische Aktivität eines neu synthetisierten
Wirkstoffs (MAH 40 HCl) an isolierten Organen von
Meerschweinchen

Verfasserin

Petra Kitzler

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt.
Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt.
Studienblatt:

Pharmazie

Betreuer:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

Danksagung

Diese Diplomarbeit ist meiner Familie gewidmet.

Sie haben nicht nur größtenteils mein Studium finanziert, sondern hatten während harter Zeiten auch immer tröstende und aufmunternde Worte für mich übrig.

Ich danke euch aus tiefstem Herzen, ohne euch wäre dieses Studium nicht möglich gewesen.

Ein spezieller Dank gebührt meinem Freund, der mir während des Studiums den Rücken gestärkt und mich auch in den lernintensiven und stressigen Zeiten ertragen hat.

Auch bei meinen Freunden, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mich immer wieder aufmuntern konnten, möchte ich mich bedanken.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Christian Studenik für die kompetente und außerordentlich freundliche Betreuung und Unterstützung.

Außerdem möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe rund um Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker vom Department für Medizinische Chemie und Pharmazeutische Chemie für die Bereitstellung der Testsubstanz bedanken.

Obwohl ich erst kürzlich durch einen tragischen Todesfall meinen guten Freund Martin Hirsch verloren habe, halfen mir die positiven Gedanken an unsere lustige gemeinsame Zeit speziell in den letzten Wochen durchzuhalten und sich auch an den kleinen Dingen des Lebens zu erfreuen.

1. EINLEITUNG	1
2. ZIELSETZUNG	5
3. MATERIAL UND METHODIK	6
3.1 Testsubstanzen.....	6
3.1.1 MAH 40 HCl.....	6
3.1.2 Lösungsmittel	6
3.2 Versuchstiere.....	8
3.3 Physiologische Elektrolytlösung	8
3.4 Verwendete Organe	10
3.4.1 Die Präparation.....	10
3.4.1.1 Verwendete Materialien	10
3.4.1.2 Rechter Vorhof.....	11
3.4.1.3 Arteria pulmonalis.....	12
3.4.1.4 Musculus papillaris	12
3.4.1.5 Dünndarm (Terminales Ileum)	14
3.4.1.6 Aorta (Aorta descendens)	14
3.5 Verwendete Apparaturen.....	16
3.5.1 Apparatur 1	16
3.5.2 Apparatur 2	18
3.5.3 Der Kraftwandler.....	20
3.5.4 Versorgung mit Oxymix.....	21
3.6 Durchführung der Versuche	22
3.6.1 Wirkung der Substanzen auf die isolierten Meerschweinchenorgane	22
3.6.1.1 Atrium Dexter (Rechter Vorhof).....	22
3.6.1.2 Musculus papillaris (Papillarmuskel)	24
3.6.1.3 Terminales Ileum (Dünndarm)	26
3.6.1.4 Aorta descendens	27
3.6.1.5 Arteria pulmonalis (Lungenarterie)	28
3.6.2 Untersuchung des Wirkmechanismus von MAH 40 HCl an der Aorta	28
3.6.2.1 Untersuchung mit Glibenclamid.....	28
3.7 Verwendete Substanz zur Untersuchung des Wirkmechanismus.....	29
3.7.1 Glibenclamid.....	29
3.8 Auswertung der Daten und Statistik.....	30
3.8.1 Atrium dexter und Musculus papillaris.....	30
3.8.2 Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum	31
3.8.3 Statistik.....	31
4. ERGEBNISSE.....	33
4.1 Ergebnisse der Testsubstanz MAH 40 HCl.....	33
4.1.1. Atrium cordis dexter	33
4.1.2 Musculus papillaris	37
4.1.3 Aorta descendens	40
4.1.4 Arteria pulmonalis	43
4.1.5 Terminales ileum	46

4.2	Versuche zur Analyse des Wirkmechanismus von MAH 40 HCl auf die Aorta.....	49
4.3	Effekt von MAH 40 HCl in Kombination mit Glibenclamid auf die isolierte Aorta.....	49
5.	DISKUSSION	53
5.1	Einfluss von MAH40 HCl auf Meerschweinchenorgane.....	53
5.1.1	Einfluss von MAH40 HCl auf glattmuskulären Organen.....	53
5.1.1.1	Einfluss von MAH 40 HCl auf die isolierte Aorta.....	54
5.1.1.2	Einfluss von MAH 40 HCl auf Arteria pulmonalis.....	54
5.1.1.3	Einfluss von MAH 40 HCl auf das terminale Ileum.....	54
5.1.2	Einfluss von MAH 40 HCl auf die Herzmuskulatur.....	55
5.1.2.1	Wirkung von MAH 40 HCl auf den Papillarmuskel.....	55
5.1.2.2	Wirkung von MAH 40 HCl auf das Atrium cordis dextrum	55
5.2	Untersuchung des möglichen Wirkmechanismus an der isolierten Aorta.....	56
6.	ZUSAMMENFASSUNG	58
7.	LITERATURVERZEICHNIS	60
8.	LEBENS LAUF	63

1. EINLEITUNG

Schwefelwasserstoff ist ein farbloses, giftiges, nach verdorbenen Eiern riechendes Gas, welches auch als H_2S oder Sulfan bezeichnet wird und in größeren Mengen im Erdöl und Erdgas vorkommt (Holleman et al. 1995).

Der abstoßende Geruch, der vom Abbau schwefelhaltiger Aminosäuren durch Bakterien herrührt, kann ab einer Konzentration von 500 ppm nicht mehr olfaktorisch wahrgenommen werden, da es zu einer Desensitivierung von Geruchsrezeptoren kommt (Weismann 2007).

Ab 10-15ml/m³ spricht man von einer Reizwirkung, wobei es hier auch zum Lungenödem kommen kann. Bei chronischer Exposition kann es zu Schäden an der Kornea, Erhöhung des Atemwiderstandes, Pneumonie, Herzmuskeldegeneration kommen. Ab 500ml/ m³ kommt es zum Tod durch Atemlähmung (Reichl et al. 2002).

Die Wirkung des Schwefelwasserstoffs beruht auf einer Blockade von Enzymen durch Sulfid- oder Disulfidbildung. Ähnlich wie bei einer Cyanidvergiftung blockiert ein durch Deprotonierung entstandenes Hydrogensulfidion das dreiwertige Eisen der Cytochromoxidase und somit die oxidative Phosphorylierung (Estler und Schmidt 2007).

Die Therapie muss schnellstmöglich erfolgen und strebt an, dem Organismus große Mengen dreiwertiges Eisen zur Verfügung zu stellen. Man verwendet Natriumnitrit oder 4-Dimethylaminophenol um einen Teil des Hämoglobins in Methämoglobin überzuführen (Lüllmann et al. 2010).

Durch die zu erwartende Entstehung eines Lungenödems empfiehlt sich auch die Gabe von Glukocorticoiden (Vohr 2012).

Die Entgiftung im menschlichen Organismus erfolgt durch Oxidation von H_2S und anschließender Elimination als Sulfat. Schwefelwasserstoff wird auch in verschiedenen Geweben, vor allem im ZNS, im kardiovaskulären System, in Leber und Nieren aus der Aminosäure L-Cystein synthetisiert. Als Katalysatoren fungieren die Cystathionon- β -Synthase und die Cystathionon- γ -Lyase. Momentan wird die Rolle von H_2S als Signalmolekül, ähnlich wie NO und CO diskutiert. Eine Reihe an biologischen Effekten, wie zum Beispiel eine Aktivierung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen, Stimulierung der Adenylatcyclase, ein Anstieg der intrazellulären

Calciumkonzentration werden mit Schwefelwasserstoff in Verbindung gebracht. Anders als bei NO und CO kommt es aber zu keiner Aktivierung der Guanylatcyclase. Die genaue physiologische Rolle von H₂S im menschlichen Körper ist derzeit nicht geklärt (Vohr, 2010).

Carbonylsulfid, auch als COS bezeichnet, ist ein farbloses, harzartiges Gas. Der Geruch erinnert an Schwefelwasserstoff (Roscoe und Schorlemmer, 1871).

Verschiedene Studien zeigten die relaxierende Wirkung von Schwefelwasserstoff auf das kardiovaskuläre System im Tierversuch (Zhao et al. 2001). Außerdem konnte bei einer intravenösen Gabe von H₂S der Blutdruck bei Ratten um 15-30mm Hg gesenkt werden. (Hosoki et al. 1997).

Es wurde auch herausgefunden, dass Schwefelwasserstoff infolge einer Aktivierung von ATP-sensitiven Kaliumkanälen, eine vasodilatorische Wirkung auf isolierte Aorten hat (Zhao et al. 2001).

Der Aufbau der Kaliumkanäle ist sehr komplex. Zwei Gene, Kir6.1 und Kir6.2, codieren für den porenbildenden Teil des Kanals. Insgesamt besteht ein Kanal aus vier Kanalproteinen und vier regulatorischen Untereinheiten. Sulfonylharnstoffe blockieren die Untereinheiten, weshalb diese auch als Sulfonylharnstoffrezeptoren bezeichnet werden. Nachdem ATP an die Kir-Untereinheit bindet, wird der Kanal geschlossen, und erst nach Hydrolyse von ATP zu ADP wieder geöffnet. Bindet ATP an den Kanal, depolarisiert die Membran. Wird das Schwellenpotential erreicht, öffnen spannungsabhängige Calciumkanäle und ein Aktionspotential entsteht. Am Ende der Kaskade steht die Insulinausschüttung. Dieses Prinzip wird bei der Therapie von Diabetes mellitus Typ 2 ausgenutzt (Klebe, 2009).

Die Auswirkung von endogen freigesetztem Schwefelwasserstoff wird in einigen Studien aufgegriffen. Es gibt Anhaltspunkte, die darauf hindeuten, dass die Wirkung von H₂S nicht nur auf der Öffnung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen basiert.

Eine Studie beschäftigt sich mit der Therapie von hypertensiven Ratten, die zusätzlich an diabetischer Nephropathie leiden. Durch Verabreichung von NaHS, ein

H₂S Donor, konnte der hohe Blutdruck gesenkt werden, sowie die Progression der Nephropathie verhindert werden (Ahmad et al. 2012).

Eine weitere Studie zeigt, dass die Interaktion von verabreichtem Schwefelwasserstoff und NO kardioprotektiv auf Ratten mit metabolischem Syndrom wirken (Rong-na. 2011).

Obwohl die Rolle des Gasotransmitters H₂S noch nicht vollständig geklärt ist, konnten jedoch antiapoptotische, antiinflammatorische und antioxidative Wirkungen beobachtet werden (Lavu M. et al, 2011)

An Ratten mit Herzinsuffizienz konnte mithilfe von NaHS gezeigt werden, dass H₂S zu einer verstärkten Genexpression von Bcl2, und einer verringerten Genexpression von Bax und Caspase 3 führt. Histologische Beobachtungen zeigten positive Effekte von H₂S auf herzinsuffiziente Ratten und verhinderten weitere apoptotische Prozesse (Wang et al. 2011)

Kardiale Hypertrophie entsteht oft infolge einer Herzinsuffizienz. Diese Studie zeigte, dass die Gabe von Schwefelwasserstoff signifikant die fortschreitende Hypertrophie und Fibrose verhindern kann (Huang et al. 2012).

Als Herzinsuffizienz bezeichnet man die Unfähigkeit des Herzens, bei normalem Füllungsdruck, die peripheren Körperregionen ausreichend mit Blut zu versorgen (Krautzig, 2008).

Man unterscheidet die akute und die chronische Form der Herzinsuffizienz. Ursachen für eine akute Form sind Myokardinfarkt, diffuse Myokarditis, akute Überbelastung des Herzens durch eine Lungenembolie oder einen Abriss einer Herzklappe.

Die chronische Herzinsuffizienz kann durch das Vorliegen einer koronaren Herzkrankheit, einer unbehandelten Hypertonie, Kardiomyopathien und Herzrhythmusstörungen entstehen. Selten können auch angeborene oder erworbene Herzfehler zu dieser Erkrankung führen.

Infolge der verringerten Auswurfleistung des Herzens sinkt der renale Blutfluss und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (kurz RAAS) wird aktiviert.

Diese Mechanismen führen zu Vasokonstriktion, Ödembildung wird begünstigt, Aldosteron wird verstärkt ausgeschieden und der Sympathikus aktiviert.

Die New York Heart Association (NYHA) teilt die chronische Herzinsuffizienz in 4 Stadien ein:

- NYHA 1: vorhandene Herzerkrankung ohne körperliche Einschränkung bei alltäglichen Belastungen
- NYHA 2: vorhandene Herzerkrankung mit leichten Beschwerden bei alltäglichen Belastungen. Stärkere körperliche Aktivität kann zu Luftnot, Angina pectoris, Erschöpfung, Rhythmusstörungen führen.
- NYHA 3: vorliegende Herzerkrankung mit Einschränkung bei alltäglichen Bewegungen, aber nicht in Ruhephasen. Geringe körperliche Aktivität hat bereits Erschöpfungszustände zur Folge
- NYHA 4: vorliegende Herzerkrankung mit Beschwerden in Ruhe.

Um die Herzinsuffizienz effektiv therapieren zu können, ist es wichtig Pharmaka zu verwenden, welche die Herzarbeit ökonomisieren und die Kompensationsreaktionen, wie zum Beispiel die Aktivierung von RAAS, ausschalten. Folgende Wirkstoffe werden zur Therapie der Herzinsuffizienz verwendet:

- Diuretika
- ACE-Hemmer
- AT₁-Rezeptorenblocker
- β -Blocker
- Herzwirksame Glykoside

Zur Therapie der akuten Herzinsuffizienz werden unter anderem Sympathomimetika (Dopamin, Dobutamin), Phosphodiesterase-III-Hemmer (Milrinon, Enoximon) und Nitrate herangezogen (Mutscher, 2008).

2. ZIELSETZUNG

Ziel meiner Diplomarbeit ist es, die Wirkung der neu synthetisierten Verbindung MAH 40 HCl auf isolierte Meerschweinchenorgane zu testen. Diese Substanz stellt ein Prodrug dar, welches Schwefelwasserstoff, aber vor allem Carbonylsulfid freisetzt.

Untersucht wurde die Wirkung der Substanz in unterschiedlichen Konzentrationen auf Papillarmuskel, Vorhof, Aorta, Arteria pulmonalis und das Ileum. Die jeweiligen Veränderungen in der Kontraktionskraft beziehungsweise der Schlagfrequenz wurden mit dem Schreiber aufgezeichnet und anschließend ausgewertet.

Im Anschluss wurde das isolierte Organ, an dem die stärkste Wirkung erzielt werden konnte, zur Untersuchung des möglichen Wirkungsmechanismus herangezogen.

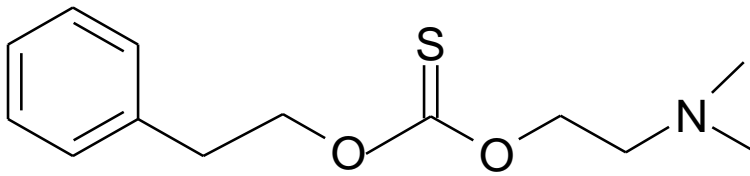
3. MATERIAL UND METHODIK

3.1. Testsubstanz

Die Arbeitsgruppe unter der Leitung von Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie stellte mir den neu synthetisierten Wirkstoff zu Verfügung.

3.1.1. MAH 40 HCl

Abbildung 1: Chemische Struktur von MAH 40 HCl



MG= 289,82g/mol

Nomenklatur: 2-Phenylethyl-(2'-dimethylaminoethoxy)methanthioat

3.1.2. Lösungsmittel

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten musste ich die Substanz in Lösung bringen. Als Lösungsmittel wurde Wasser verwendet, indem sich die Substanz innerhalb kürzester Zeit löste.

Die Substanz wurde kumulativ den Organbädern zugegeben, bis ich eine Konzentration von 100µmol/l erreichte. Die Einwaage meiner Substanz musste abhängig von dem jeweiligen Fassungsvermögen der Organbäder berechnet werden. Diese verfügten über 8ml beziehungsweise 25ml.

Tabelle 1: Stammlösungen

Substanz	Molare Masse	Volumen Organbad (ml)	Einwaage Substanz (100µmol/l)
MAH40 HCl	289,82g/mol	8	0,23mg
		25	0,73mg

Von der 100µl Stammlösung wurden jeweils der Reihe nach 3µl, 7µl, 20µl und dann die restlichen 70µl entnommen und in einem zeitlichen Abstand von 45min dem Organbad kummulativ zugesetzt. In dieser Zeitspanne kann man davon ausgehen, dass sich ein Fließgleichgewicht einstellt.

Man misst also den Effekt, den die jeweiligen Konzentrationen beginnend mit 3µmol/l, dann 10µmol/l, 30µmol/l und 100µmol/l auf die verschiedenen Organe des Meerschweinchens ausüben.

Tabelle 2: Darstellung des Pipettierschemas

Zugebene Menge	Endkonzentration
100µl (MAH40 HCl)	100µmol/l
3µl	3µmol/l
7µl	10µmol/l
20µl	30µmol/l
70µl	100µmol/l

3.2 Versuchstiere

Für die verschiedenen Versuche die ich im Rahmen der Diplomarbeit durchführte, wurden Meerschweinchen (Stamm TRIK) als Versuchstiere herangezogen.

Sie eignen sich besonders gut, da sie physiologische Gemeinsamkeiten mit dem menschlichen Organismus aufweisen, vor allem was die Ionenkanalverhältnisse am Herzen, insbesondere die Kaliumkanäle, betrifft.

Die Tiere wurden mit einem präzisen Schlag auf das Genick getötet. Sofort wurde der Thorax mit einer Schere geöffnet, Herz und Lunge entnommen, die sofort in eine begaste Nährlösung gelegt wurden. Weiters wurde ein etwa 20cm langes Stück des Krummdarms entnommen, sowie die thorakale Aorta herausgeschnitten, die ebenfalls bis zur weiteren Präparation in der begasten Lösung aufbewahrt wurden.

3.3 Physiologische Elektrolytlösung

Die Nährlösung in der die entnommenen Organe versorgt werden, wird auch als Tyrodelösung bezeichnet, die nach Maurice Vejux Tyrode benannt ist. Begast wird diese Lösung mit einem Gasgemisch namens Oxymix, das sich aus 95% Sauerstoff und 5%CO₂ zusammensetzt.

Diese physiologische Lösung ist wichtig um die Organe optimal zu versorgen und den pH-Wert aufrechtzuerhalten, der zwischen 7,2 und 7,4 liegen soll.

Definitionsgemäß handelt es sich hier um abgeänderte Krebs-Henseleit-Lösung.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Nährlösung

Substanz	Molare Masse	Stocklösung	ml/Stocklösung/l Tyrode	mmol/l
NaCl	58,44g/mol	1000,25g/5l	33,60	115,01
KCl	74,55g/mol	50,33g/5l	35,00	4,73
NaHCO ₃	84,01g/mol	125,00g/5l	83,70	24,91
MgSO ₄	120,37g/mol	147,02g/5l	1,18	0,29
KH ₂ SO ₄	136,09g/mol	62,00g/250ml	1,18	2,15
CaCl ₂	110,98g/mol	34g/250ml	3,20	3,92
Glucose	180,16g/mol	Reinsubstanz	1,98	-

Tabelle 4: Zusammensetzung für 2 Liter

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

Am Beginn jedes Arbeitstages wurde die Tyrodelösung frisch zubereitet. In einem Messkolben mit einem Fassungsvermögen von 2 Liter wurden die oben angeführten Stammlösungen vermennt und anschließend mit destilliertem Wasser versetzt. Darin wurde dann Glucose als Festsubstanz gelöst und der Kolben mit Oxy mix 20 Minuten begast um eine gesättigte Lösung zu erhalten. Anschließend wurden 6,4ml CaCl_2 tropfenweise hinzugefügt um eine Trübung der Lösung zu verhindern. Diese entsteht nämlich durch das Ausfallen von Calciumsalzen.

Zum Schluss wurde der Messkolben bis zur Markierung mit Aqua dest. befüllt.

3.4 Verwendete Organe

Jeden Tag wurden Herz, Lunge, Dünndarm entnommen und daraus Vorhof, Pulmonalarterie, Aorta, Dünndarm und Papillarmuskel präpariert.

3.4.1 Die Präparation

3.4.1.1 Verwendete Materialien

Unter Verwendung des Auflichtmikroskops und verschiedener Scheren und Pinzetten wurden die Präparate in Petrischalen bearbeitet. Diese wurden mit Kork ausgelegt, um die Organe mit Präpariernadeln fixieren zu können. Um ein Verrutschen zu verhindern, wurde der Kork mit einem seitlich liegenden Gummischlauch fixiert. Die Schalen wurden mit Tyrodelösung befüllt, um die Organe während des Präparierens optimal versorgen zu können.

Abbildung 2: Auflichtmikroskop und Petrischale



3.4.1.2 Atrium cordis dextrum (Rechter Vorhof)

Nach gemeinsamer Entnahme von Herz und Lunge aus dem Thorax des Tieres, wurde das Herz von Lungen- und überschüssigem Fettgewebe getrennt, mit 2 Präpariernadeln fixiert und anschließender der Vorhof präpariert. Dabei ist es von größter Wichtigkeit den Vorhof nicht zu verletzen, das heißt zu dehnen, da sonst die Spontanaktivität des so genannten Sinusknotens verloren gehen könnte und das Präparat somit für den weiteren Versuch unbrauchbar wäre.

Am isolierten Vorhof wurden beide Enden mit einem Faden gebunden, daran je ein Silberhäkchen angebracht, das mit einem weiteren Knoten fixiert wurde. Anschließend transportierte man den Vorhof in einem mit Tyrode gefüllten Becherglas zum Organbad.

3.4.1.3 Arteria pulmonalis

Die Lungenarterie wurde vom Truncus pulmonalis, zu deutsch, Lungenstamm, entnommen, welcher dem rechten Ventrikel entspringt. Meistens lagen nur wenige Millimeter der Arterie frei, sodass nur ein oder zwei 2-3mm breite Ringe als Präparate verwendet werden konnten. Die Arterie wurde von etwaigen Blutgerinnseln und Fettgewebe befreit und in die Tyrode überführt.

Abbildung 3: Arteria pulmonalis

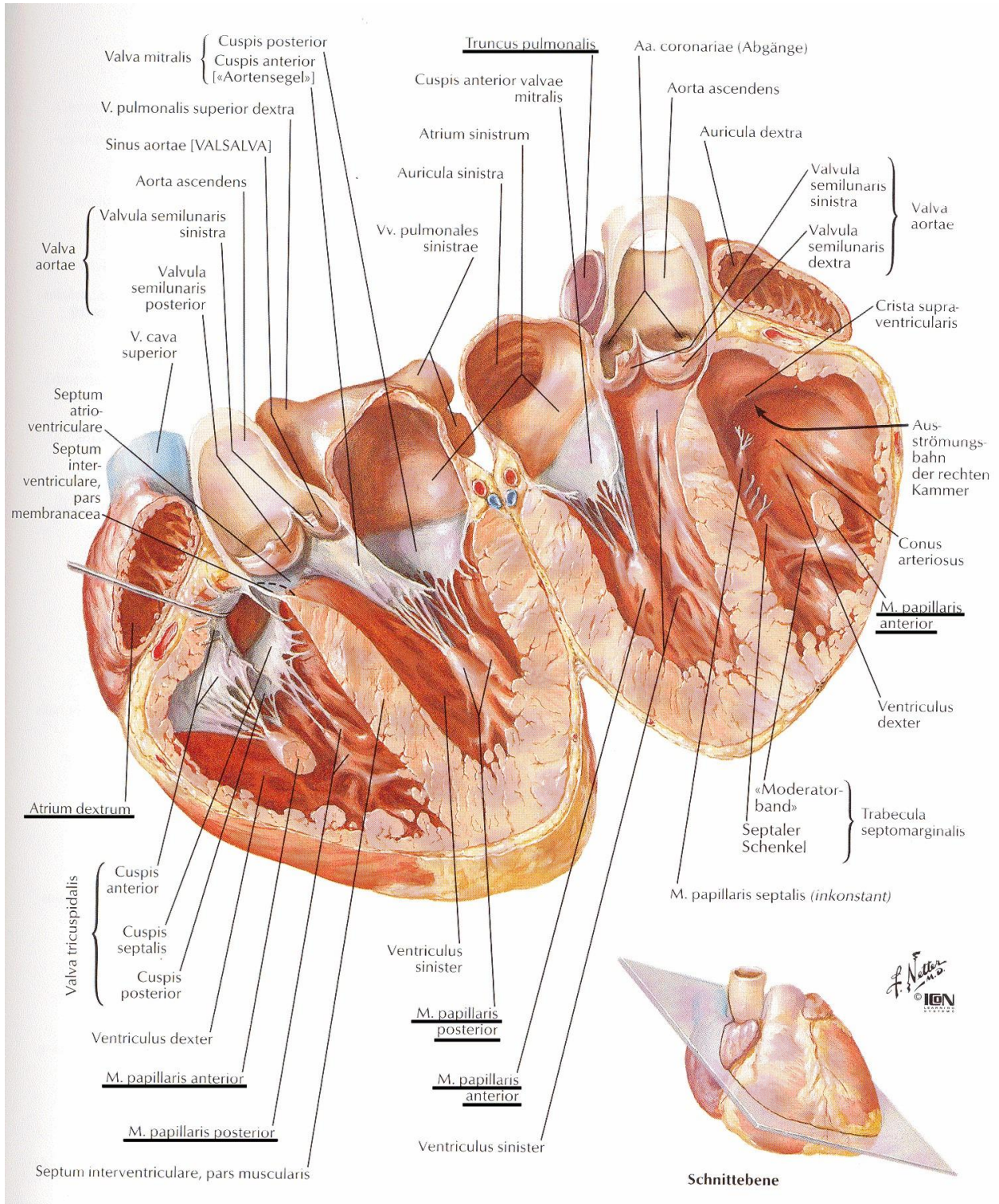


3.4.1.4 Musculus papillaris

Zum Schluss wurden aus dem Herz noch die Papillarmuskel präpariert. Dazu wurde dieses entlang des Septums aufgeschnitten und die beiden Herzkammern freigelegt. Da das Blut die Tyrodelösung trübte, musste diese gewechselt werden. Fremdes Gewebe, sowie Purkinjefasern waren zu entfernen, da diese spontan depolarisieren können und somit den Versuch stören könnten.

Mit einer Pinzette wurden die Bindfäden um die Muskelansätze gebunden, ein Silberhäkchen daran geknotet, und mit einer Schere aus der Herzwand geschnitten. Je nach Meerschweinchen konnten pro Versuchstag 3-5 Papillarmuskel präpariert und bis zur Verwendung in begaster Nährlösung aufbewahrt werden.

Abbildung 4: Darstellung des Herzens (Netter FH 2003)



3.4.1.3 Terminales Ileum (Dünndarm)

Aus dem Abdomen des Meerschweinchens entfernte man einen Teil des Dünndarms, den Krummdarm, der zwischen Jejunum und Dickdarm liegt. Mit einer Schere wurde der Darm durchgeschnitten, mit einem Faden abgebunden, ein ungefähr 20cm langes Stück herausgenommen, und in einer begasten Tyrodelösung aufbewahrt. Der Faden diente zur Markierung des richtigen Endes und zur leichteren Handhabung des Darms.

Ein ca. 0,5cm langes Stück wurde herausgeschnitten. Dabei war es wichtig die Enden schräg abzuschneiden um das Einrollen des Darms zu verhindern und ihn mit Präpariernadeln auf dem Kork richtig platzieren zu können.

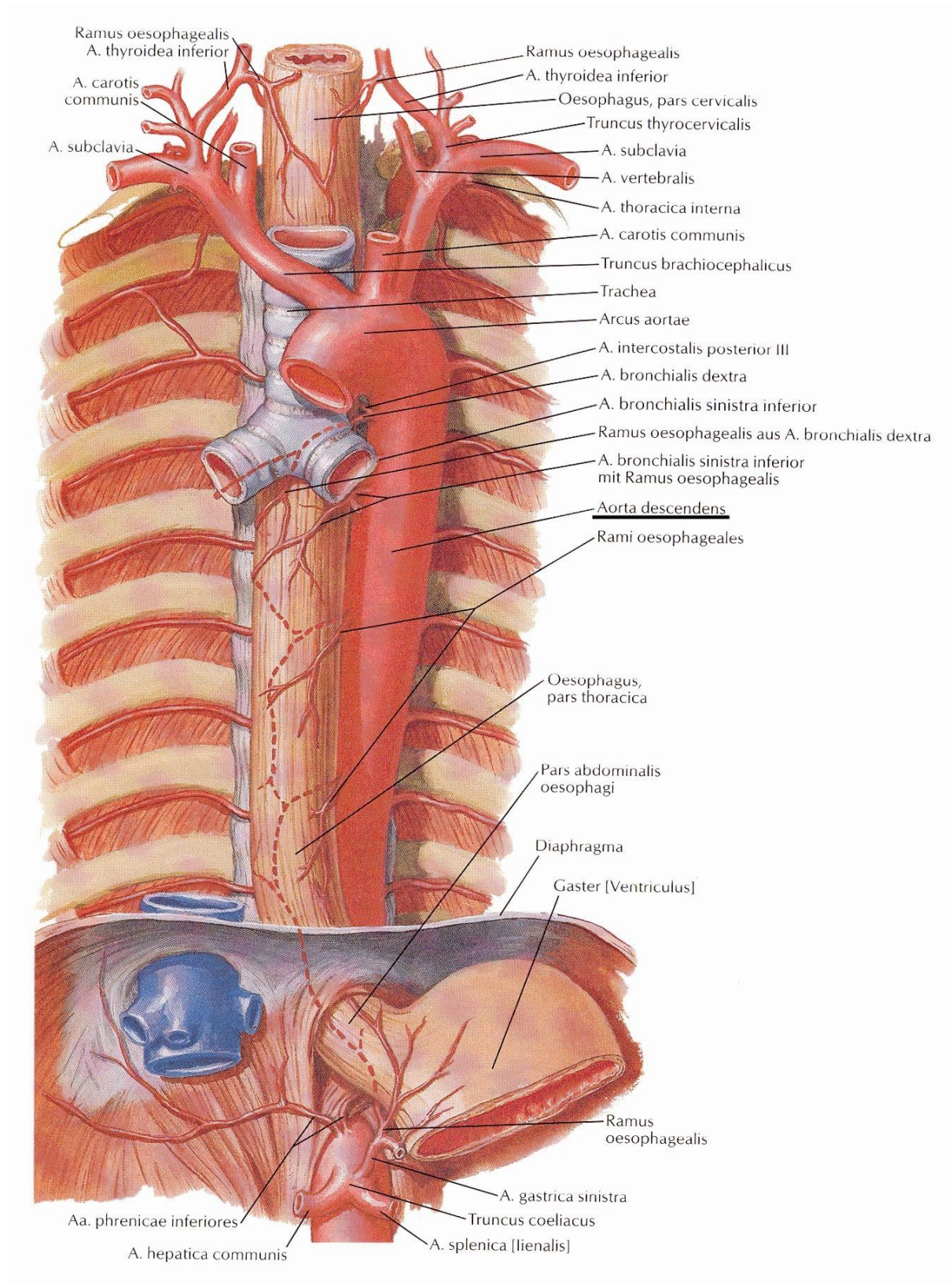
Wie auch bei den anderen Organen, war darauf zu achten den Darm dabei nicht zu überdehnen, was die Peristaltik und damit das Überleben des Darms negativ beeinflusst hätte.

Mithilfe eines Fadens wurde an beiden Öffnungen des Darms Silberhäkchen angebracht und mit diese mit weiteren Knoten gesichert. Dabei war es wichtig die Öffnungen nicht abzubinden und zu verschließen, da das Zirkulieren der Nährlösung um und im Darm gewährleistet sein musste. Außerdem musste das Darmstück während der Präparation mit einer Pipette durchgespült werden um ihn von eventuell zurückgebliebenem Darminhalt zu befreien.

3.4.1.6 Aorta descendens

Als letztes Organ wurde die thorakale Aorta entlang des Rückgrats herausgeschnitten. Dafür musste der Thorax weit geöffnet und überdehnt werden. Mithilfe einer Pinzette wurde die Aorta gehalten, während millimeterweise mit einer spitzen Schere ein etwa 3cm langes Stück entfernt wurde. Die Aorta wurde mit Präpariernadeln am Kork der Petrischale fixiert und mithilfe des Aufsichtmikroskops von Fett- und Muskelgewebe, sowie von Blutgerinnseln befreit, bis die Aorta nur noch einen glatten, weißen Schlauch darstellte. Dann wurde sie in viele 1-2mm breite Ringe geschnitten und in begaster Tyrodelösung aufbewahrt.

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Aorta (Netter FH 2003)



3.5 Verwendete Apparaturen

Für die Versuche wurden zwei unterschiedliche Apparaturen verwendet. Apparatur 1 wurde für die Versuche am Papillarmuskel benutzt. Für alle anderen Präparate stand die Apparatur 2 zur Verfügung.

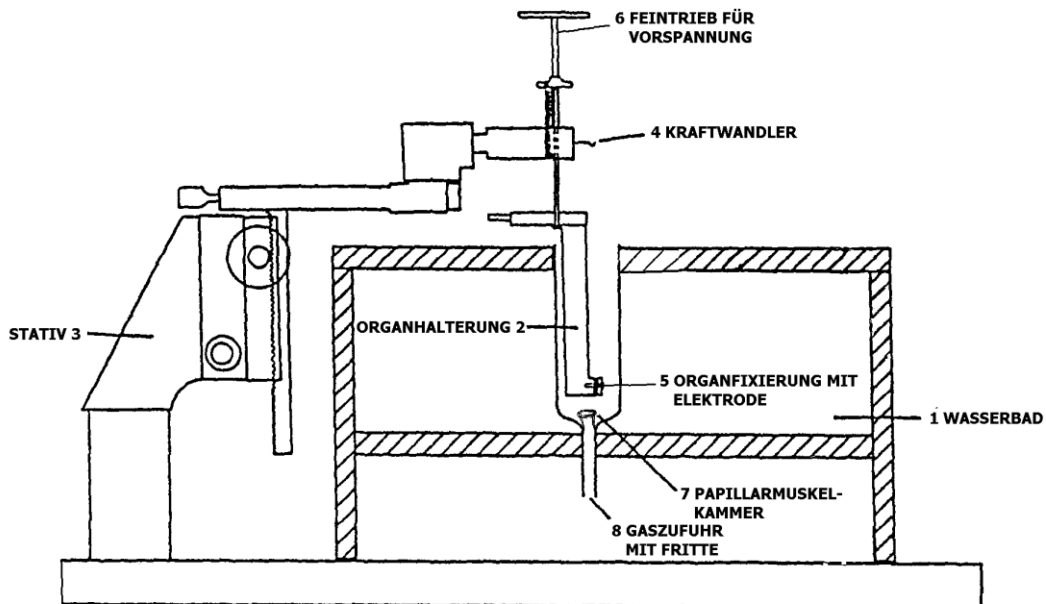
Mit einem Silberdraht wurden die Organe mit dem Kraftwandler verbunden, der ein mechanisches in ein elektrisches Signal umwandelte, dieses wurde zum Verstärker weitergeleitet und letztendlich vom Schreiber auf Millimeterpapier aufgezeichnet.

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten war es wichtig, Vorspannung an die Organe anzulegen, sowie Temperatur, pH-Wert, Zusammensetzung der Tyrode, Sauerstoffversorgung möglichst konstant zu halten.

3.5.1 Apparatur 1

Wie bereits oben erwähnt, stand diese Apparatur nur für Versuche am Papillarmuskel zur Verfügung. Die Apparatur besteht aus einem Wasserbad mit einem Deckel, der eine Muskelkammer enthält, die ein paar Zentimeter in das Wasser hineinragt. Der Feintrieb, die Organhalterung und der Kraftwandler sind hier am Stativ angebracht.

Abbildung 6: Skizze der Apparatur 1

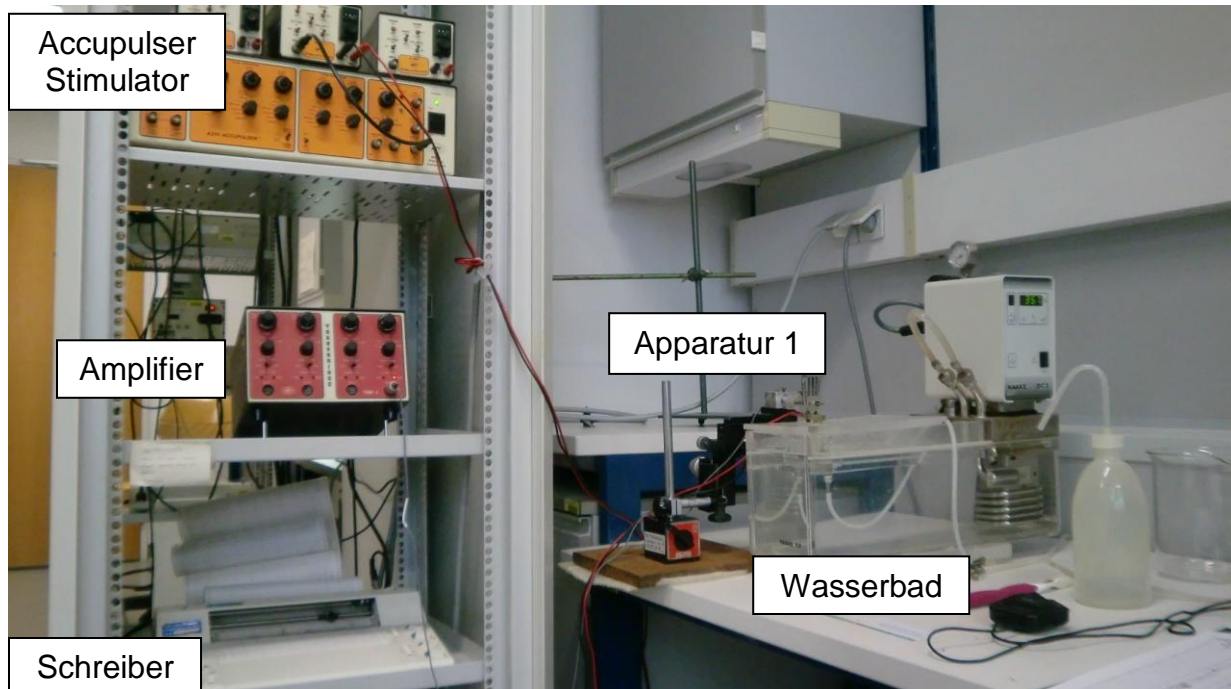


Die Muskelkammer, welche in die aus Acrylglas gefertigte Wanne ragt, hat ein Fassungsvermögen von 25ml. Bereits zehn Minuten vor Versuchsbeginn wird die Kammer mit 25ml Tyrodelösung gefüllt und mit Oxymix begast. Um physiologischen Bedingungen zu ermöglichen, wird das Wasserbad mittels Thermostat auf 35°C erwärmt. Die Präparation des Musculus papillaris wurde bereits in Kapitel 3.4.1.4 beschrieben.

Der mit einem Silberhäkchen versehene Papillarmuskel wurde an der Organhalterung angebracht und vorsichtig zwischen einer Elektrode und einem Plexiglasplättchen eingeklemmt. Wurde das Präparat in die richtige Position gebracht, konnte er vollständig in die erwärmte Tyrodelösung eingetaucht werden.

Mit einem Accupulser Stimulator, Model Isostim 301T, WPI, Hamden, CT, USA wurde der Papillarmuskel elektrisch gereizt und zur Kontraktion gebracht. Über den Silberdraht wurde die Inotropie auf den Kraftwandler übertragen und über den Flachbettschreiber auf Millimeterpapier aufgezeichnet.

Abbildung 7: Originalaufzeichnung der Versuchsanordnung



3.5.2 Apparatur 2

Für Versuche am rechten Vorhof, der Aorta, der Pulmonalarterie und des Dünndarms stand die Apparatur 2 zur Verfügung.

Darm und Vorhof wurden mithilfe zweier Silberhäkchen am Silberdraht befestigt, während die ringförmigen Präparate von Aorta und Pulmonalarterie direkt an den Drähten angebracht wurden. Die Temperatur des Wasserbades beträgt 37°C.

Wie bei Apparatur 1 sind auch hier die Silberdrähte mit dem Kraftwandler verbunden, die ein mechanisches Signal weiterleiten. Somit kann beim Darm eine spasmolytische, bei den Gefäßen eine vasodilatierende und beim spontan aktiven Vorhof eine kontraktile Wirkung beobachtet werden, die wiederum vom Schreiber festgehalten wurde.

Mittels Feintrieb musste auch hier dementsprechend eine Vorspannung an das Organ angelegt werden um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.

Abbildung 8: Skizze der Apparatur 2

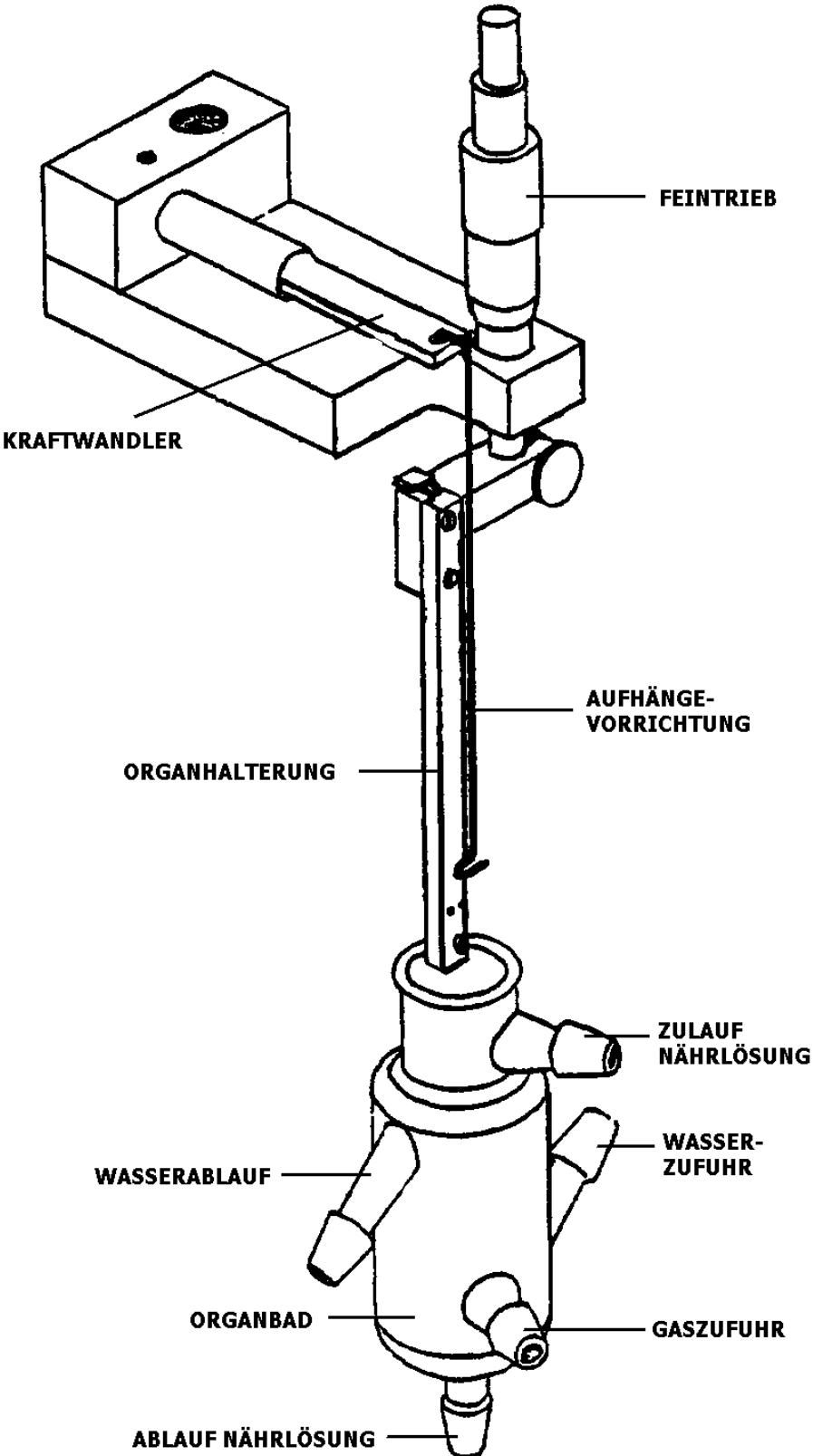
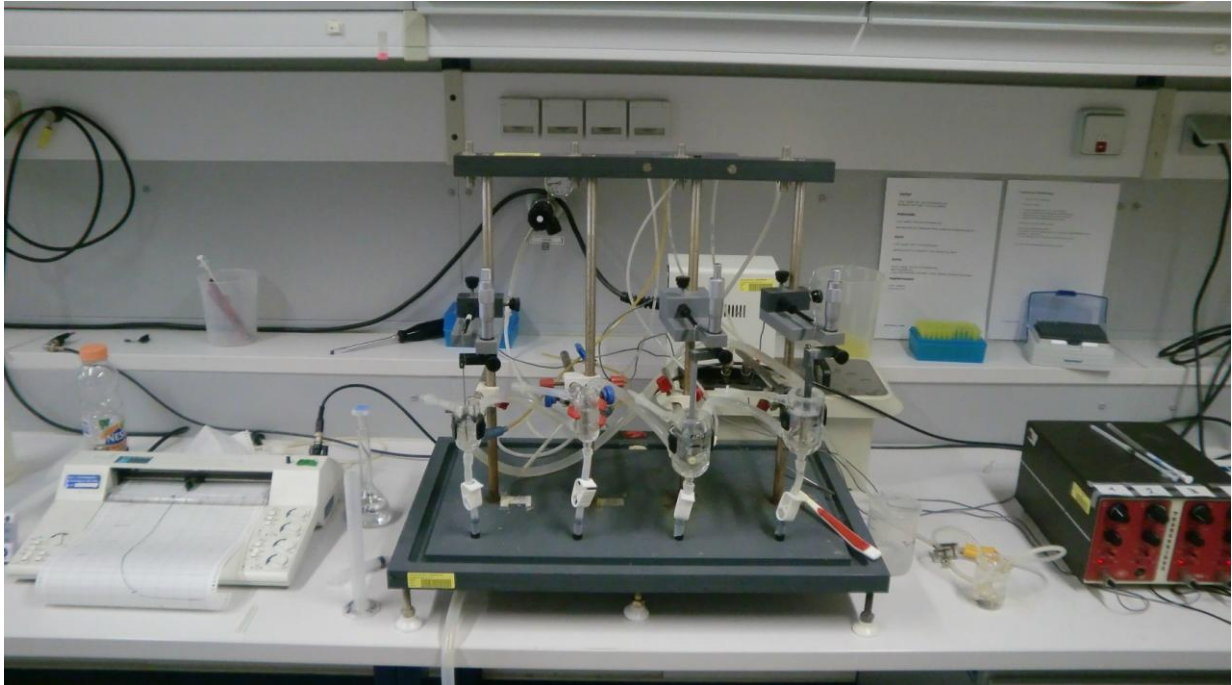


Abbildung 9: Originalabbildung der Versuchsanordnung

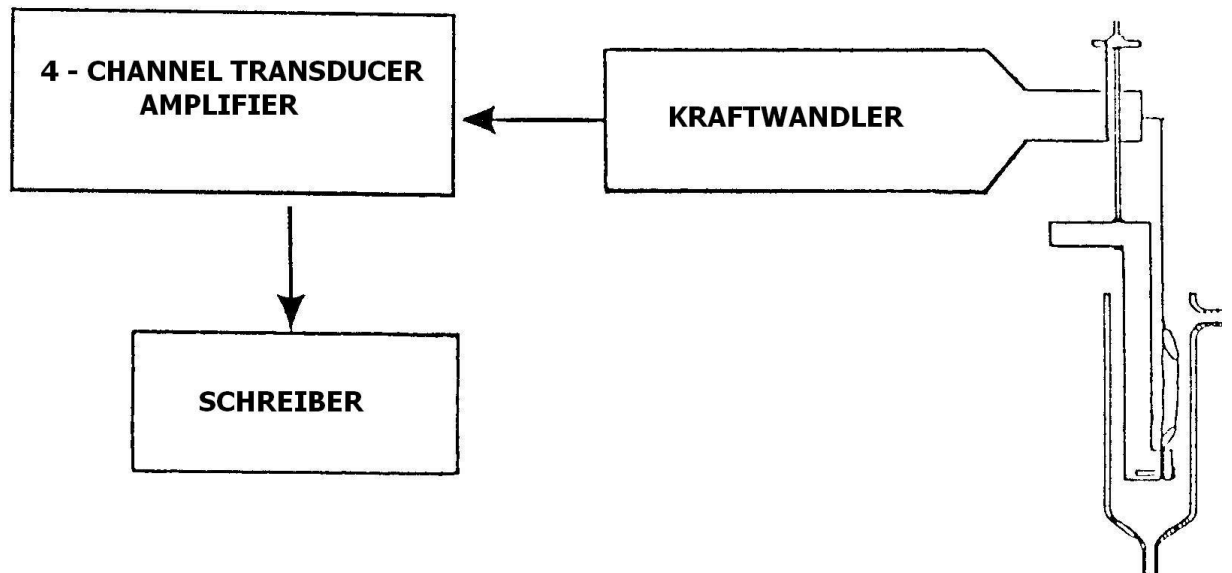


3.5.3 Der Kraftwandler

Um elektrische Signale zu erhalten, müssen die mechanischen Signale mittels des Kraftwandlers überführt werden. Das funktioniert über eine Veränderung des Dehnungsstreifens, der auf mechanische Kontraktionen reagiert. Über einen Widerstandswandler kommt es zu einer Veränderung im Stromfluss.

Ein Verstärker Firma WPI intensiviert das Signal, welches mit einem Flachbettschreiber der Firma Kipp & Zonen) auf Millimeterpapier übertragen wird.

Abbildung 10: Skizze des Kraftwandlers



3.5.4 Versorgung mit Oxymix

Wie schon mehrmals erwähnt, mussten die Organe ständig mit dem Carbogengas versorgt werden. Das Gas setzt sich aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid zusammen und war für die Versorgung, die Aufrechterhaltung des pH-Wertes und für die optimale Durchmischung der Substanz im Organbad wichtig. Eingeleitet wurde das Carbogen mittels eines Schlauchsystems, an den Schläuchen selbst konnte mit Klemmen die Menge des einströmenden Gases kontrolliert werden. Am Ende des Schlauches, der direkt ins Organbad mündet, befanden sich Glasfritten.

Abbildung 11: Originalabbildung der Gaszufuhr



3.6 Durchführung der Versuche

Im nachfolgenden Kapitel werden nun die Abläufe der Versuche, die im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführt wurden, beschrieben.

Zuerst wurden die Organbäder gut mit destilliertem Wasser gespült, anschließend mit Salzsäure gereinigt und eventuelle Verschmutzungen mit einer Bürste entfernt. Anschließend wieder mit destilliertem Wasser, sowie zweimal mit Tyrodelösung gespült bevor die Organbäder mit selbiger befüllt wurden.

3.6.1 Wirkung der Substanz auf die isolierten Meerschweinchenorgane

3.6.1.1 Atrium Dexter

Nach der Präparation (siehe Kapitel 3.4.1.2) wurde der Vorhof mithilfe, der an ihm angebrachten Silberhäkchen, in die Organhalterung eingespannt. Es musste unbedingt darauf geachtet werden den Vorhof nicht zu überdehnen, um eine fortdauernde Spontanaktivität durch die Sinuszellen zu gewährleisten.

Im nächsten Schritt wurde der Vorhof in das mit Tyrode befüllte und auf 37°C temperierte Organbad hinabgesenkt und die Geräte eingeschaltet. Je nach verwendetem Organ mussten unterschiedliche Einstellungen vorgenommen werden.

Beim rechten Vorhof wurde der Flachbetschreiber auf 5mV und einer Schreibgeschwindigkeit von 5mm/sec eingestellt.

Der Schreiber selbst wurde am Millimeterpapier auf den Nullpunkt gestellt und mit einem Kippschalter der Amplifier zugeschaltet.

Indem man den Feintrieb im Uhrzeigersinn drehte, konnte die notwendige Vorspannung an das Organ angelegt werden. Beim Vorhof beträgt diese 10,4mN. Dies war wichtig um gleiche Bedingungen zu schaffen und somit reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Zum Schluss wurde der Schreiber mithilfe des Drehrads von 10,4 wieder auf den Nullpunkt justiert.

Für gewöhnlich konnte ab diesem Zeitpunkt schon die Spontanaktivität des Vorhofes beobachtet werden. Es folgte eine 45minütige Gewöhnungsphase, in der sich das Organ auf die gegebenen Bedingungen einstellen konnte. In dieser Zeit wurde die Substanz eingewogen und vorbereitet. Danach folgten die Messungen in Abstand von je 5 Minuten. Dafür wurde der Schreiber gesenkt und die Schlagfrequenz, auch als Chronotropie bezeichnet, zwölf Sekunden lang am Millimeterpapier aufgezeichnet. Diese Zeitspanne entsprach dem Speed von 5mm/sec, wobei eine Messung 6 Kästchen am Millimeterpapier betrug.

Bei mindestens vier konstanten Messungen konnte frühestens nach 30 Minuten mit dem Versuch der Testsubstanz begonnen werden. Über eine Dauer von 45 min wurden alle 5 Minuten am Millimeterpapier Aufzeichnungen über die Schlagfrequenz vorgenommen. Dabei wurde mit der niedrigsten Konzentration begonnen und alle 45 Minuten die nächste Konzentration kumulativ in das Organbad zugegeben. Das genaue Pipettierschema wurde bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben. Die Zugabe der Substanz erfolge mithilfe verschiedener Pipetten. Dabei musste sehr vorsichtig hantiert werden und eine Berührung der Pipettenspitze mit dem Organ oder Silberdraht unbedingt vermieden werden, da die sonst erzeugten Fehlströme zu verfälschten Ergebnissen führten.

Abbildung 12: Originalabbildung des eingespannten Vorhofs



3.6.1.2 Musculus papillaris

Nach der im Kapitel 3.4.1.4 beschriebenen Präparation wurde der Papillarmuskel nach einer Ruhezeit von etwa 10 Minuten am oberen Ende mit dem Silberhaken in die Organhalterung an der Apparatur 1 eingehängt und am unteren Ende zwischen einer Elektrode und einem Plexiglasplättchen eingeklemmt und die Muskelkammer ins Organbad abgesenkt.

Wie auch beim Vorhof wurden die Geräte eingeschaltet und der Flachbettschreiber auf 5mV und einem Speed von 20mm/sec eingestellt. Es wurde eine Vorspannung von 3,92 mN angelegt und der Schreiber danach auf den Nullpunkt eingestellt.

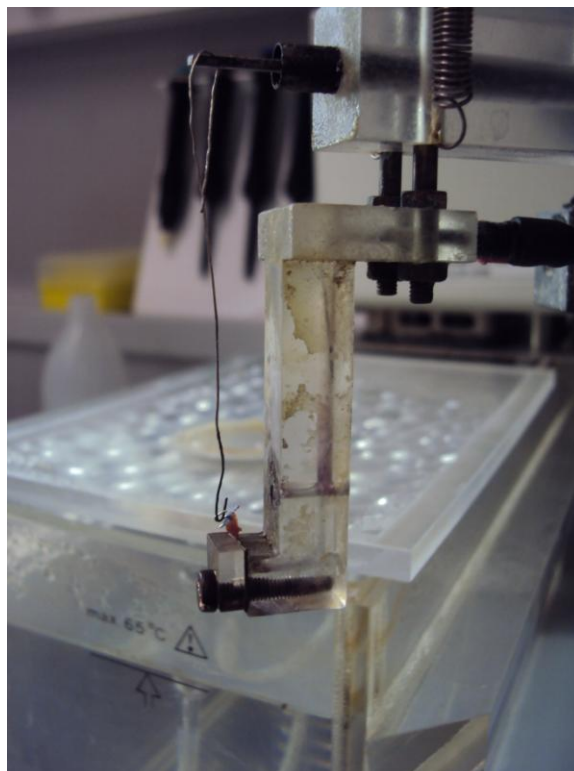
Um sicher zu gehen, dass es infolge einer Abnahme der Ausgangsspannung zu keiner Verringerung der Kontraktionskraft kommt, musste während des Versuchs die Spannung mit dem Feintrieb immer wieder nachjustiert werden (Reiter 1967).

Da der Papillarmuskel, anders als der Vorhof, keine Spontanaktivität aufwies, musste dieser mit einem Accupulser (Firma WPI) gereizt werden und somit zur Kontraktion gebracht werden. Konnte ohne Reizung gleich nach dem Einspannen eine Aktivität beobachtet werden, wies das auf ein Vorhandensein von Purkinjefasern hin. In diesem Falle konnte nur nach Entfernen beziehungsweise durch das Abwarten des Zugrundegehens dieser Fasern mit dem Versuch fortgefahren werden.

Stimuliert wurde der Papillarmuskel mit Rechteckimpulsen mit einer Länge von 3ms^{-1} und einer Frequenz von 1 Hz. Wichtig war es mit der Stromstärke nur gering, etwa 10% über der minimalen Reizschwelle zu liegen, da es sonst durch die hohen Stromstärken zur raschen Entleerung des Katecholaminspeichers, und somit zu einer Abweichung der Versuchsergebnisse gekommen wäre (Furchgott et al. 1959).

In einer mindestens 45minütigen Gewöhnungs- und Kontrollphase erfolgten Messungen, wobei 7-9 Amplituden auf dem Millimeterpapier aufgezeichnet wurden. Erst bei Konstanz der Amplituden konnte mit den Messungen der Substanz begonnen werden. Dabei wurden wie auch beim Vorhof bereits beschrieben, beginnend bei der niedrigsten Konzentration (siehe Pipettierschema 3.1.2) Messungen zu je 45 Minuten durchgeführt.

Abbildung 13: Originalabbildung des Papillarmuskels in Apparatur 1



3.6.1.3 Terminales Ileum

Auch dieses Organ (siehe Kapitel 3.4.1.5) wird mithilfe der Silberhaken, ähnlich wie beim Vorhof, vorsichtig in die Organhalterung eingespannt und in die begaste Nährlösung eingetaucht. Nachdem die Gerätschaften aktiviert und der Schreiber auf eine Schreibgeschwindigkeit von 1 Millimeter/Minute eingestellt wurde, konnte eine Vorspannung von 4,92mN angelegt werden. Von diesem Zeitpunkt an, ließ man dem Darmstück eine 20minütige Gewöhnungsphase, um sich an seine Umgebung anzupassen. Es konnten Abweichungen, die auf eine Veränderung der Peristaltik hinweisen, am Schreiber wahrgenommen werden. Dieser musste nach Ablauf der Zeit wieder auf den Nullpunkt zurückgestellt werden.

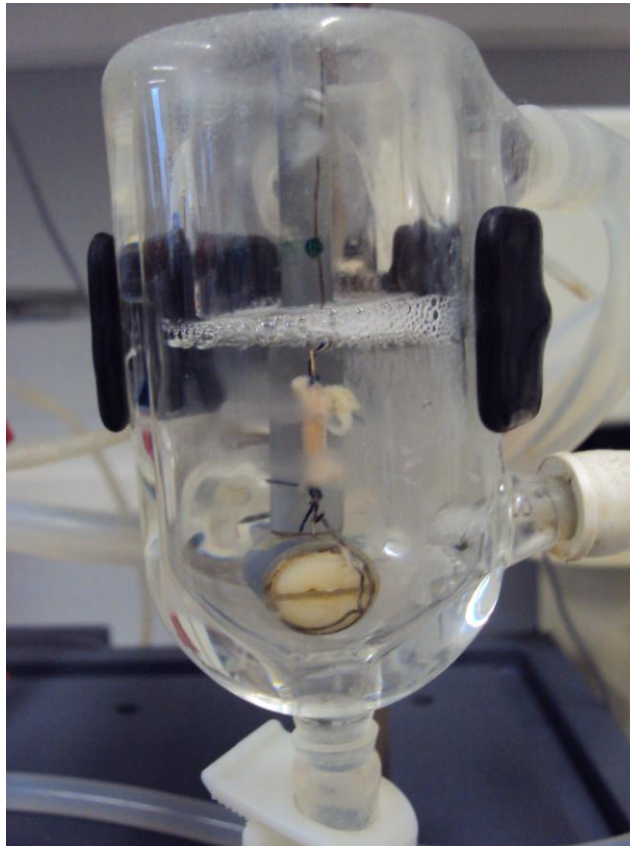
Im nächsten Schritt wurde der Kippschalter betätigt, der Schreiber somit abgesenkt und mit der Aufzeichnung der Messung begonnen. Nach Ablassen der Tyrode über einen Schlauch, wurde das Organbad sofort mit 25ml einer 60mmol Kaliumchloridlösung wiederbefüllt.

Diese Lösung wurde täglich in einem 100ml Messkolben frisch zubereitet. Dafür wurden 450mg KCl abgewogen, mittels Wägepapier direkt in den Kolben übergeführt und bis zur Eichmarkierung mit modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung aufgefüllt.

Die Kaliumchloridlösung diente zur chemischen Kontraktion, da am Darm eine spasmolytische Wirkung untersucht wurde. Nach Zugabe dieser, konnte mit bloßem Auge eine deutliche Kontraktion beobachtet werden. Sofort zeichnete sich auch am Flachbettschreiber eine deutliche Veränderung ab, die aber eben so schnell wieder abnahm und sich für gewöhnlich bei der Hälfte der ursprünglichen einpendelte. Nun wurden mindestens 45 Minuten auf Konstanz gewartet, ehe man mit dem bereits beim Vorhof beziehungsweise Papillarmuskel verwendeten Pipettierschema fortfahren konnte.

Ein zu verwerfendes Präparat konnte man dadurch erkennen, dass nach erfolgter Kontraktion, der Schreiber sofort gegen null ging oder der Zeit proportional immer weiter abnahm.

Abbildung 14: Originalabbildung des terminalen Ileums



3.6.1.4 Aorta descendens

Nach dem Zerschneiden des Gefäßes in wenige Millimeter breite Ringe (siehe Kapitel 3.4.1.6), konnten diese direkt an den Silberdrähten, ohne Verwendung von Silberhäkchen wie bei den anderen Präparaten, befestigt werden. Das Aortastück durfte dabei nicht gespannt werden. Nachdem das Präparat in das Organbad abgesenkt wurde, konnten Schreiber und Verstärker aktiviert werden. Bei 10mV und einem Speed von 1mm/min wurde eine Vorspannung von 19,6mN angelegt und eine Nullpunkteinstellung am Flachbettschreiber vorgenommen. Nach 20 Minuten Gewöhnungsphase, wurde das Gerät auf 5 mV gestellt. Das ergab eine Kraft von 9,81mN. Nach wiederholter Nullpunktangleichung wurde der Schreiber für nachfolgende Aufzeichnungen aktiviert. Nach Ablassen der Nährlösung über ein Schlauchsystem wurde das Gefäß mit 25ml KCl-Lösung befüllt.

Auch die Aorta wurde, ähnlich wie beim Darm, chemisch stimuliert, wobei hier eine 90 mmol Kaliumchloridlösung verwendet wurde. Dabei wurden 670mg KCl in einem Messkolben in 100ml Tyrodelösung gelöst. Nach der schnell eintretenden Kontraktion musste ein Erreichen der Plateauphase abgewartet werden bis mit der Zugabe der Substanz nach dem üblichen Pipetierschema begonnen werden konnte.

3.6.1.5 Arteria pulmonalis

Die Vorgangsweise entspricht dem Ablauf bei der Aorta (3.6.1.4), mit der Ausnahme, dass über die gesamte Versuchsdauer hinweg eine Vorspannung von 5mV angelegt wurde. Das entspricht einer Kraft von 9,81mN. Auch hier wurde, ähnlich wie bei der Aorta eine eventuelle vasodilatatorische Wirkung der zu testenden Substanz untersucht.

3.6.2 Untersuchung des Wirkmechanismus von MAH40 HCl an der Aorta

3.6.2.1 Untersuchung mit Glibenclamid

Bei diesen Versuchen wurde die Aorta descendens präpariert (siehe Kapitel 3.4.1.6) und an der Apparatur 2 am Silberdraht befestigt. Bis zum Erreichen der Plateauphase unterschied sich die Vorgehensweise nicht von der bisherigen. (siehe Kapitel 3.6.1.4)

Nach Erreichen der Konstanz wurden 100µl des Antagonisten Glibenclamid zugegeben.

Nach 45 Minuten wurde die einer EC₅₀ entsprechende Menge der Substanz MAH40 HCl zugegeben und erneut 45 Minuten wirken lassen.

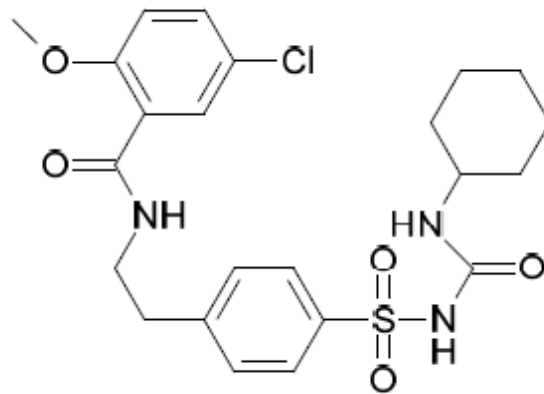
Die EC₅₀ wird als die effektive Konzentration beschrieben, bei der eine halbmaximale Wirkung hervorgerufen wird (Graefe et al, 2011)

Die Auswertung aller Ergebnisse wird im Kapitel 4 beschrieben.

3.7 Verwendete Substanz zur Untersuchung des Wirkmechanismus

3.7.1 Glibenclamid

Abbildung 15: Struktur von Glibenclamid



MG= 494,0g/mol

Orale Antidiabetika, zu denen auch Sulfonylharnstoffe zählen, werden zur Therapie von Diabetes 2 verwendet (Amann-Vesti, 2006).

Neben Glimpirid, Gliquidon und Gliclazid, wird auch Glibenclamid in die Substanzklasse der Sulfonylharnstoffe eingeordnet. Strukturell ist die saure Sulfonamid-Gruppe in Nachbarschaft zum aromatischen Ring für die Wirkung verantwortlich.

Die Sulfonylharnstoffe diffundieren in die B-Zellen und binden an die SUR1-Untereinheit an ATP-abhängigen Kaliumkanälen, die daraufhin geschlossen werden. Im nächsten Schritt folgt eine Depolarisation, spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle werden geöffnet und somit die Insulinfreisetzung in Gang gesetzt (Graefe et al 2011).

Dem Sulfonylharnstoff Glibenclamid wird darüber hinaus eine Wirkung auf den Glucosestoffwechsel in Muskel-, Fett- und Leberzellen zugeschrieben, die jedoch in vitro erst in höheren Dosen auftreten. Bis dato ist nicht geklärt, ob sie zur klinischen Wirkung beitragen. In sehr hohen Konzentrationen verabreicht, bindet Glibenclamid an SUR2 Untereinheiten, die an der glatten Muskulatur und der Herzmuskulatur lokalisiert sind und unerwünschte kardiovaskuläre Nebenwirkungen verursachen können (Gallwitz et al, 2011)

Die wichtigste unerwünschte Wirkung von Sulfonylharnstoffen ist die Hypoglycämie, die besonders unter Glibenclamid schwer verlaufen kann, heikel zu therapieren ist und im schlimmsten Fall zu einem hypoglycämischen Schock führen kann (Thiel et Roewer, 2009).

Weitere mögliche Nebenwirkungen sind Appetitlosigkeit, Laktatacidose, metallischer Geschmack, Diarrhö, Übelkeit und Erbrechen (Greten et al.2010).

Zu den Kontraindikationen zählen Diabetes Typ 1, schwere Nieren- und Leberfunktionsstörungen, Porphyrie und Überempfindlichkeit gegenüber Sulfonamiden (Liebl et Martin, 2005).

3.8 Auswertung der Daten und Statistik

3.8.1 Rechter Vorhof und Papillarmuskel

Die Messungen am Vorhof dienen der Beobachtung der Chronotropie. Als Chronotropie bezeichnet man die Frequenz der Erregungsbildung des Schrittmachers, also die Schlagfrequenz des Herzens (Silbernagl et Lang, 2009).

Während des Versuches, siehe Kapitel 3.5.1.1, konnte nach der Substanzzugabe eine Veränderung der Schlagfrequenz wahrgenommen werden. Die Schläge pro Minute wurden alle fünf Minuten 12 Sekunden lang am Millimeterpapier aufgezeichnet. Zur Auswertung wurden die Schläge gezählt und mit dem Faktor 5 multipliziert um die Anzahl der Schläge pro Minute zu ermitteln. Nach zunehmender Wirkstoffkonzentration im Organbad, konnte bei gleich bleibender Anzahl der Schläge eine neutrale, bei zunehmender eine positiv chronotrope und bei abnehmender Frequenz eine negativ chronotrope Wirkung festgestellt werden.

Bei den Versuchen mit dem Papillarmuskel, wurde eine, durch Zugabe der Substanz, veränderte Kontraktionskraft aufgezeichnet. Um die Ergebnisse anschaulich darstellen zu können, wurde die Kontraktionskraft, welche in mN angegeben wird, prozentuell ausgedrückt.

Die 7-9 Amplituden wurden in fünfminütigem Abstand je 45 Minuten lang bei jeder verwendeten Konzentration protokolliert (siehe Kapitel 3.6.1.2), einzeln vermessen und in Zentimetern angegeben. Der während der Gewöhnungsphase ohne Substanzzugabe ermittelte Wert wurde mit 0% angegeben. So konnte mit den nachfolgenden Ergebnissen die genaue prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft berechnet werden.

3.8.2 Arteria pulmonalis, Aorta und terminales Ileum

Bei den Experimenten am Darm wurde das Augenmerk auf eine spasmolytische Wirkung gelegt, während bei den Blutgefäßen die vasodilatierende Veränderung im Vordergrund stand. Nachdem alle drei Organe mit unterschiedlich molarer Kaliumchloridlösung maximal kontrahiert wurden, konnten nach dem bereits bekannten Pipettierschema die verschiedenen Konzentrationen verabreicht werden. Dabei wurde mit Bleistift am Millimeterpapier jede Zugabe im Abstand von 45 Minuten markiert. Nach Beenden des Versuches wurde die Strecke vom Nullpunkt bis zur Plateauphase in Zentimeter vermessen und als 100% angenommen. Bei allen weiteren Messpunkten konnte nun abhängig von der Konzentration die prozentuelle Veränderung ermittelt werden. Für die Berechnung musste der Eichfaktor miteinbezogen werden. Beim Standard von 5mV wurde pro cm mit 0,98 multipliziert.

3.8.3 Statistik

Für die Auswertung der Ergebnisse zur Kontraktionskraft, Schlagfrequenz, Vasodilatation, Spasmolyse wurde das Programm „Sigma Plot 9.0“ verwendet. Zuerst wurden für jedes Organ die Mittelwerte, sowie die Standardfehler der Mittelwerte berechnet. Ebenso wurde das Programm zur Errechnung der EC_{50} herangezogen. Die EC_{50} ist die effektive Konzentration, bei der es zu einer 50%igen

Veränderung kommt (Larsen, 2011). In den Versuchen stellte der EC_{50} -Wert die Konzentration der Substanz MAH 40 HCl dar, bei der die Hälfte des Kontrollwertes erreicht wurde. Mithilfe des „Student-t-Test“ wurden gepaarte Beobachtungen durchgeführt, um die Irrtumswahrscheinlichkeit zu bestimmen. Dabei galten Werte $<5\%$ ($P<0,05$) und $<1\%$ ($P<0,01$) als signifikant und Werte $<0,1\%$ ($P<0,01$) als hochsignifikant.

4. ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse der Testsubstanz MAH 40 HCl

4.1.1. Atrium cordis dexter

In vier Versuchen wurde die Wirkung der Testsubstanz MAH 40 HCl auf die Schlagfrequenz untersucht. Der spontan aktive Vorhof wurde in die Apparatur eingespannt. Nach 30 Minuten Gewöhnungsphase wurde mit der Zugabe von 3µl in Wasser gelöster Substanz begonnen. Nach je 45 Minuten wurden 7µl, dann 20µl und zum Schluss noch 70µl kumulativ in das Organbad pipettiert.

Aus den gesammelten Werten wurden Mittelwert und Standardfehler mithilfe eines Programms berechnet. Dabei wurde ein Kontrollwert von 223 (±) 11,27 Schlägen pro Minute ermittelt.

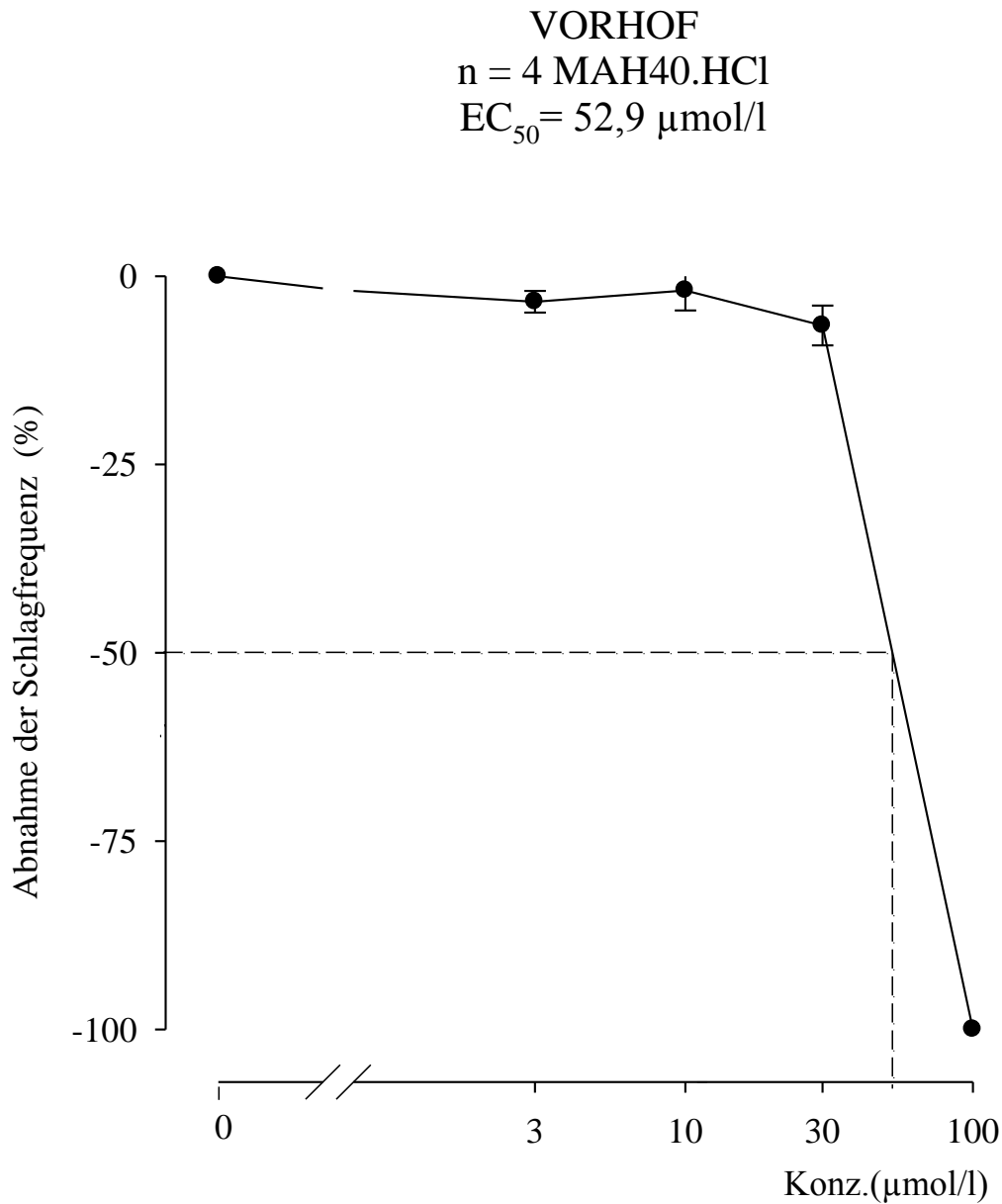
Die Substanz MAH 40 HCl zeigte eine äußerst starke Wirkung auf das Herzgewebe. Bereits bei der ersten zugegebenen Konzentration von 3µl konnte eine negativ chronotrope Wirkung festgestellt werden, die sich bei den höheren Konzentrationen verstärkte. Bei einer Konzentration von 100µl setzte die spontane Aktivität des Schrittmachers relativ bald vollständig aus.

Tabelle 5: Versuchsergebnisse der Substanz MAH40HCl am Atrium dexter

MAH 40 HCl μmol/l	f ± SEM (x/min)	f ± SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	223±11,27	0±0	4	-
3	215 ±11.73	-3,41±1,44	4	n.s.
10	219±14,63	-1,91±2,65	4	n.s.
30	208±9,68	-6,56±2,64	4	n.s.
100	0,00±0,00	0,00±0,00	4	n.s.

In der oben abgebildeten Tabelle 5 wird der Standardfehler als SEM und die Anzahl der Schläge pro Minute als f. n gibt die Anzahl der Experimente wieder.

Diagramm1: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH 40 HCl am Vorhof

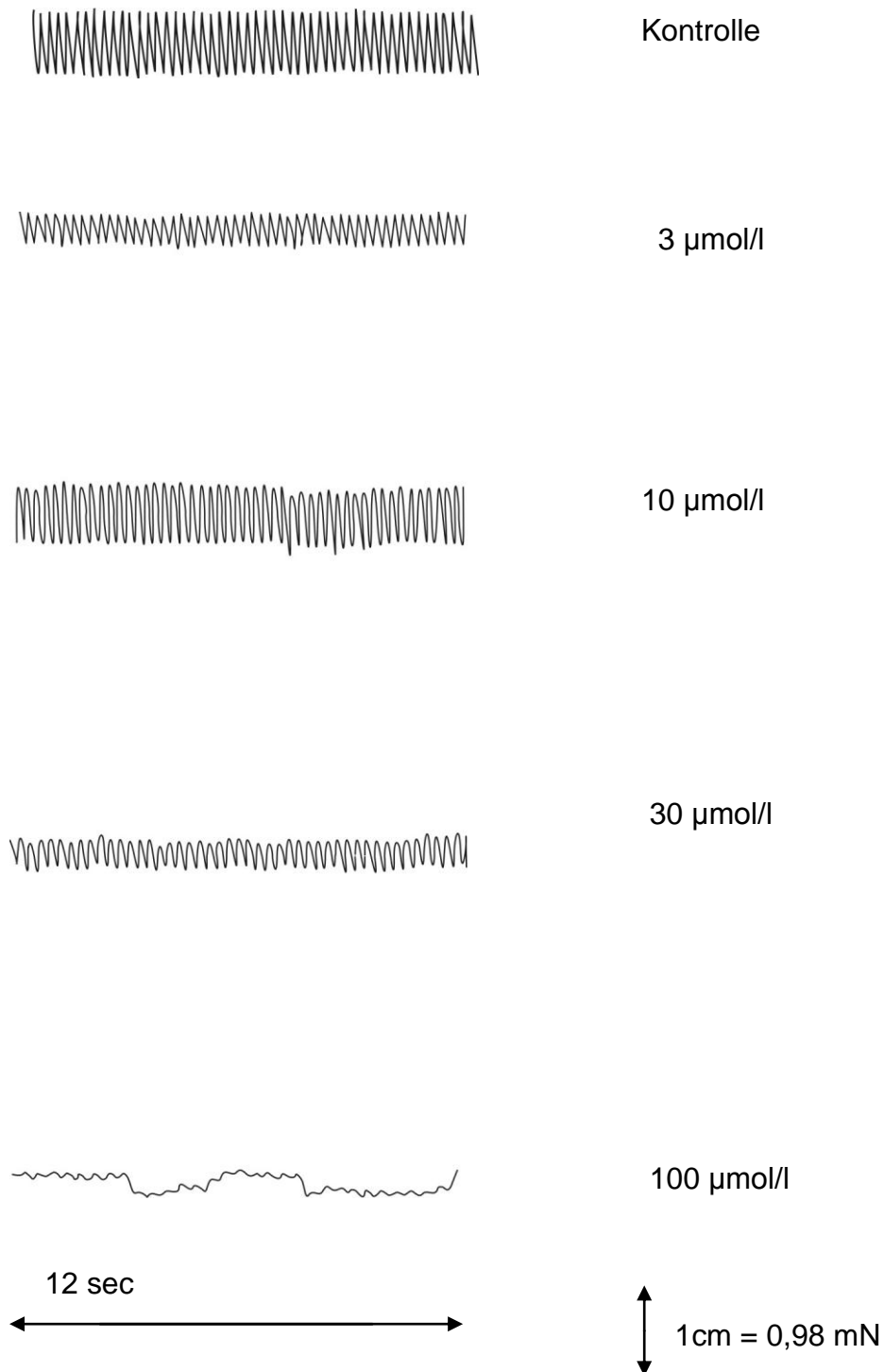


Erläuterung zu Diagramm 1:

Im Diagramm ist der Einfluss der Testsubstanz auf die Chronotropie zu sehen. Die Konzentration (in µmol/l) von MAH40 HCl auf der x-Achse und die prozentuelle Abnahme der Schlagfrequenz auf der y-Achse des Diagramms aufgetragen.

Die schwarzen Punkte symbolisieren die Mittelwerte, während die senkrecht durch die Punkte verlaufenden Linien die Größe des Standardfehlers darstellen.

Abbildung 16: Originalaufzeichnung der chronotropen Wirkung von MAH 40 HCl



Legende zur Abbildung 16:

Durch die abnehmende Anzahl der Amplituden bei steigender Konzentration, kann auf eine negativ chronotrope Wirkung geschlossen werden.

4.1.2 Papillarmuskel

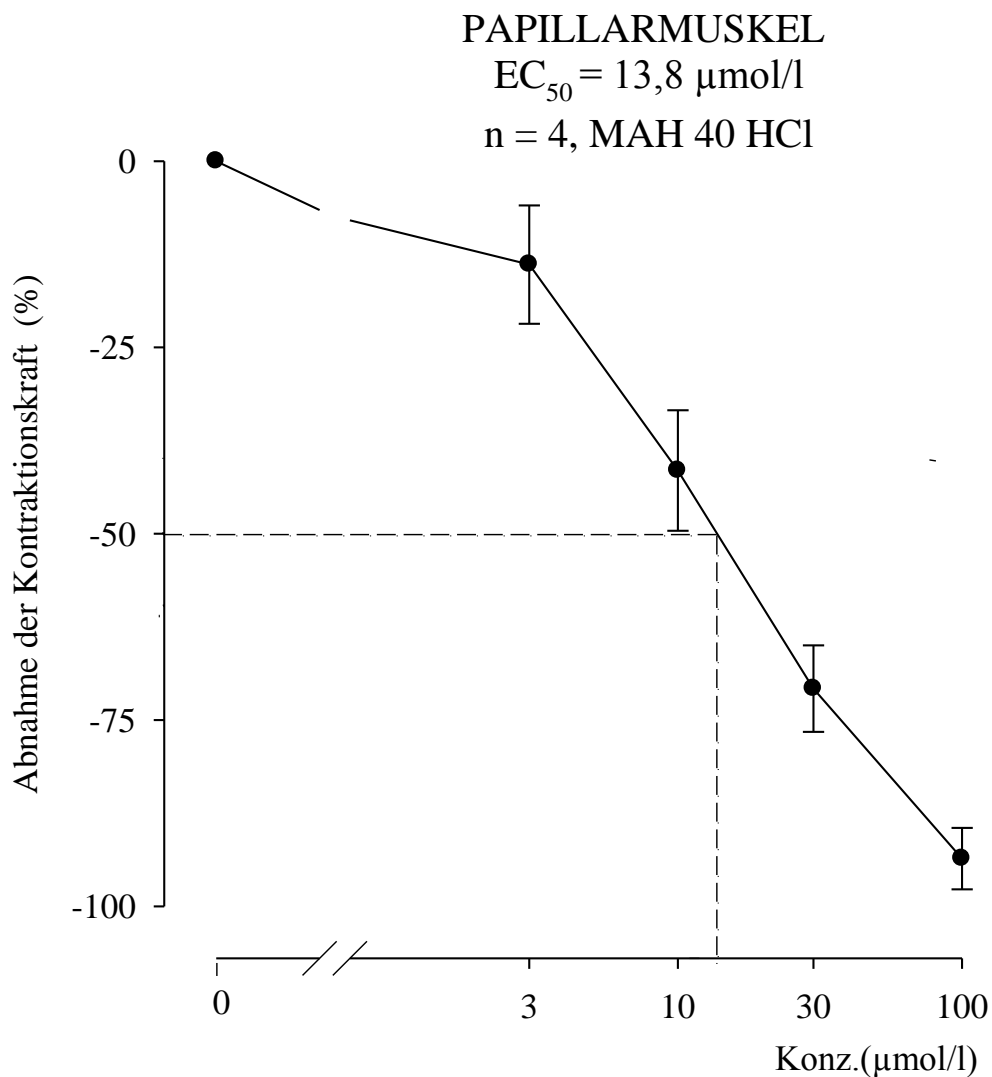
Um ein Einwirken der Testsubstanz auf die Inotropie des Papillarmuskels zu untersuchen wurden vier Versuche durchgeführt. Dabei konnte bereits bei niederen Konzentrationen eine deutlich negativ inotrope Wirkung nachgewiesen werden. Bei maximal zugegebener Konzentration kam es zu einer deutlichen Reduktion der Kontraktionskraft oder es sogar ein Sterben des Papillarmuskels beobachtet.

Tabelle 6: Versuchsergebnisse von MAH 40 HCl am Papillarmuskel

MAH 40 HCl $\mu\text{mol/l}$	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	1,36 \pm 0,33	0 \pm 0	4	-
3	1,22 \pm 0,37	-13,86 \pm 7,94	4	n.s.
10	0,86 \pm 0,32	-41,52 \pm 8,08	4	0,05
30	0,45 \pm 0,20	-70,79 \pm 5,80	4	0,01
100	0,10 \pm 0,06	-93,61 \pm 4,11	4	0,01

Legende zu Tabelle 6: Mittelwerte mit Standardabweichung, prozentuelle Darstellung, Anzahl der Versuche und Irrtumswahrscheinlichkeit

Diagramm 2: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH 40 HCl am Papillarmuskel

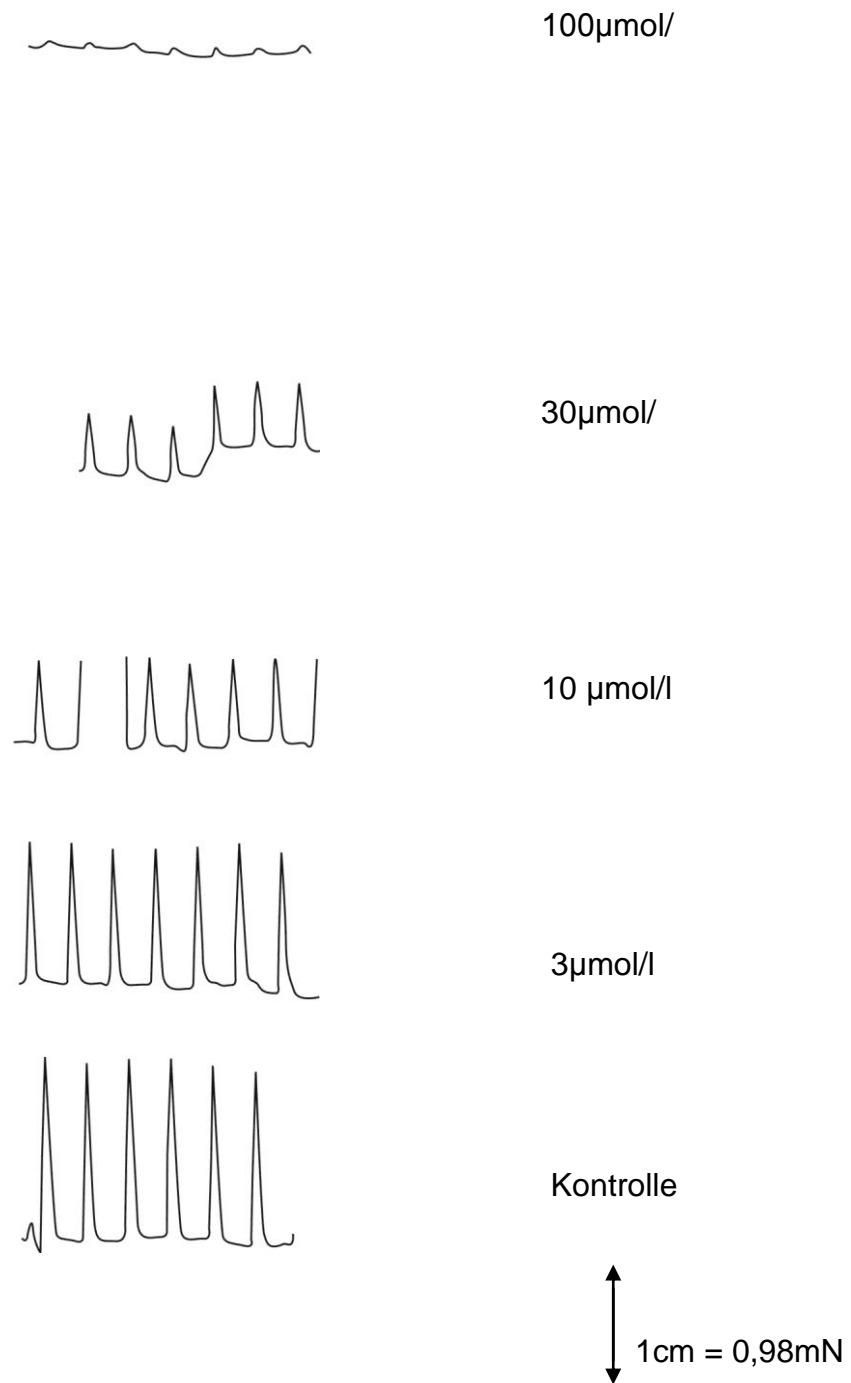


Legende zu Diagramm 2:

Die Abbildung, welche die Wirkung auf das Organ zeigt, beschreibt eine deutliche Abnahme der Inotropie durch die Testsubstanz.

Auf der x-Achse ist die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$, auf der y-Achse die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft angegeben.

Abbildung 17: Originalaufzeichnung der inotropen Wirkung von MAH40



Legende zu Abbildung 17:

Anhand der Größe der Amplituden kann bei steigender Konzentration eine Abnahme der Kontraktionskraft aufgezeigt werden. Bei 100 $\mu\text{mol/l}$ konnte bei diesem Versuch keine Aktivität des Papillarmuskels mehr festgestellt werden.

4.1.3 Aorta descendens

Ziel war es, eine mögliche vasodilatierende Wirkung der Substanz auf die Aortapräparate zu messen. Der genaue Versuchsablauf wurde bereits in Kapitel 3.6.1.4 umfassend beschrieben.

Insgesamt wurden sechs Experimente durchgeführt. Durch Berechnungen konnte ein Kontrollwert von $9,29 \pm 1,87$ ermittelt werden.

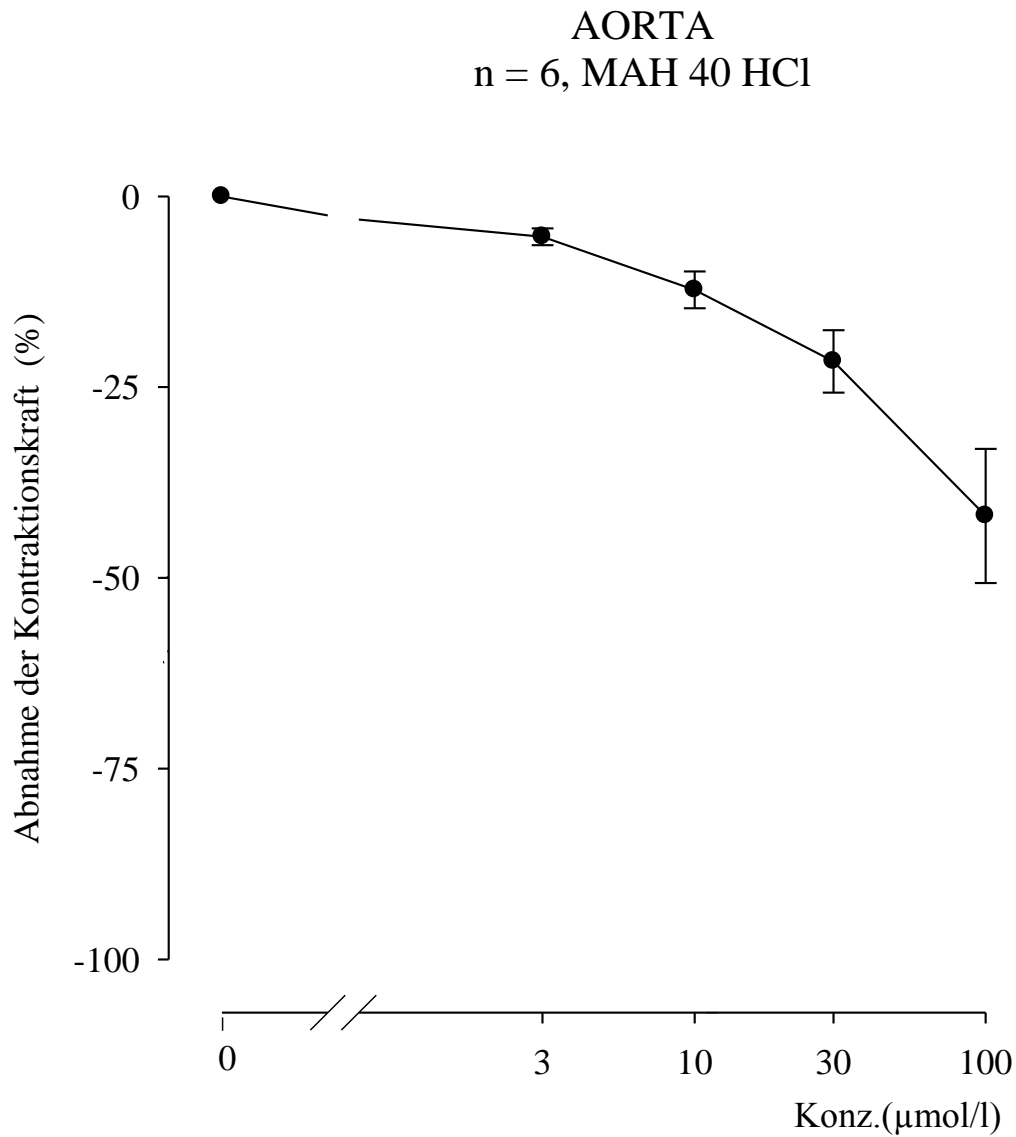
Durch das Zugeben der Testsubstanz konnte eine leichte Dilatation der Aorta beobachtet werden.

Tabelle 7: Versuchsergebnisse von MAH40 HCl

MAH 40 HCl $\mu\text{mol/l}$	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	9,29 \pm 1.87	0 \pm 0	6	-
3	8,88 \pm 1,86	-5,30 \pm 1,10	6	n.s.
10	8,35 \pm 1,84	-12,25 \pm 2,42	6	n.s.
30	7,59 \pm 1,78	-21,63 \pm 4,10	6	0,05
100	5,94 \pm 1,72	-41,88 \pm 8,80	6	0,01

Legende zur Tabelle 7: In der Tabelle werden die angestellten Berechnungen der Mittelwerte samt Standardabweichung, die Darstellung in Prozent, sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit aufgelistet.

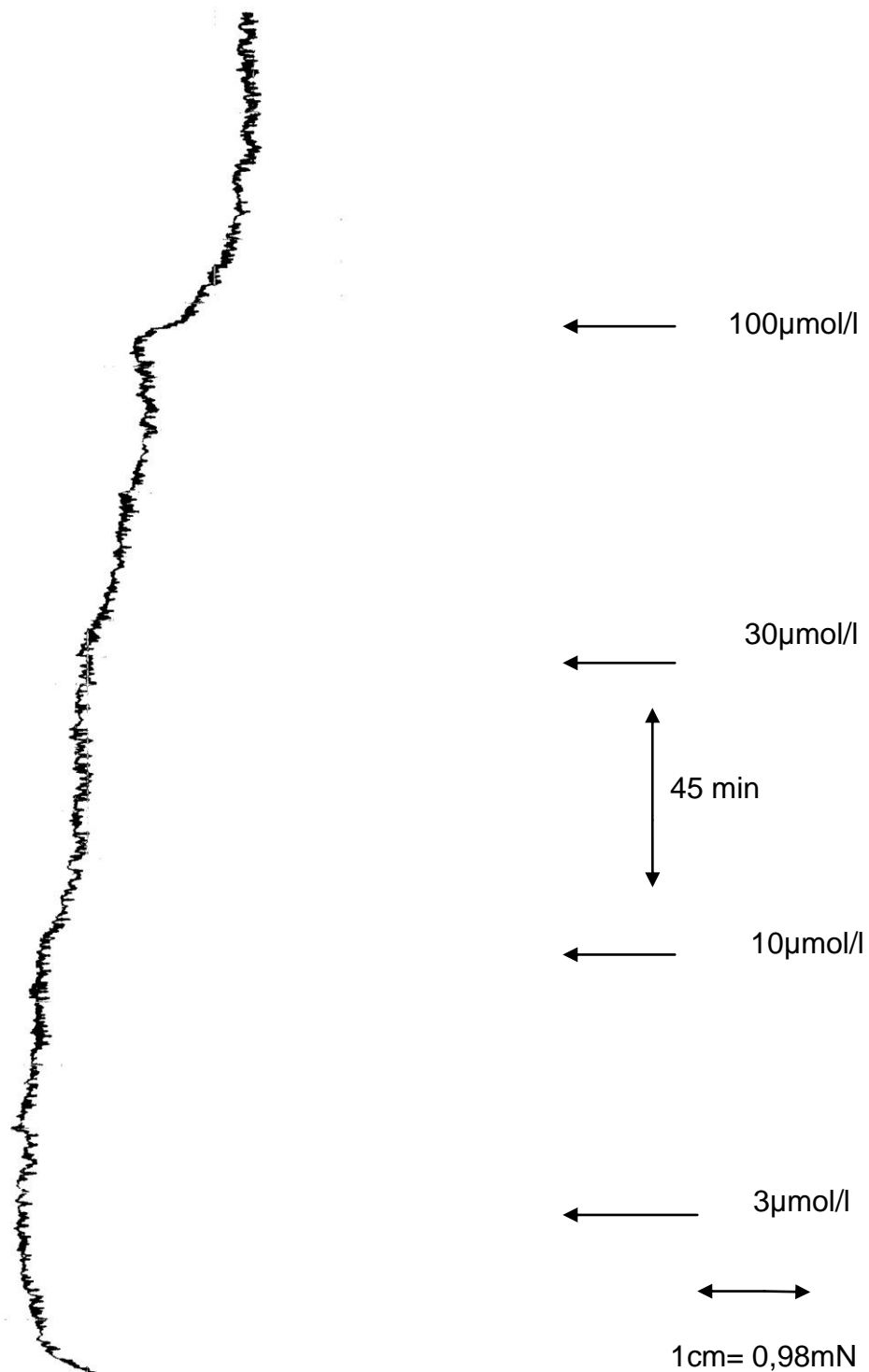
Diagramm 3: Konzentrations- Wirkungskurve von MAH40 HCl an der Aorta.



Legende zu Diagramm 3:

An der x-Achse wird die Konzentration in µmol/l, an der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent aufgetragen.

Abbildung 18: Originalaufzeichnung der vasodilatierenden Wirkung von MAH40 HCl



Legende zu Abbildung 18:

An der abgebildeten Graphik ist die Abnahme der Kontraktionskraft, das heißt, die Gefäßerweiterung sichtbar. Die jeweiligen Zeitpunkte, an denen die unterschiedlichen Konzentrationen an Substanzen eingespritzt wurden, werden mit Pfeilen markiert. Der Abstand zwischen zwei dieser Pfeile entspricht einer Zeitdauer von 45 Minuten.

4.1.4 Arteria pulmonalis

Um die relaxierende Wirkung der Substanz auf die Arteria pulmonalis aufzuzeigen, wurden vier Versuche durchgeführt. Nach Erreichen der Plateauphase wurden zunächst 3µl und in 45minütigen Abständen 7µl, 20µl und 70µl der gelösten Testsubstanz zugegeben.

Nach Erreichen einer Konzentration von 100µmol/l konnte nur eine sehr schwache Dilatation der Lungenarterie beobachtet werden. Es wurde ein Kontrollwert von 12,72 ± 1,67mN errechnet.

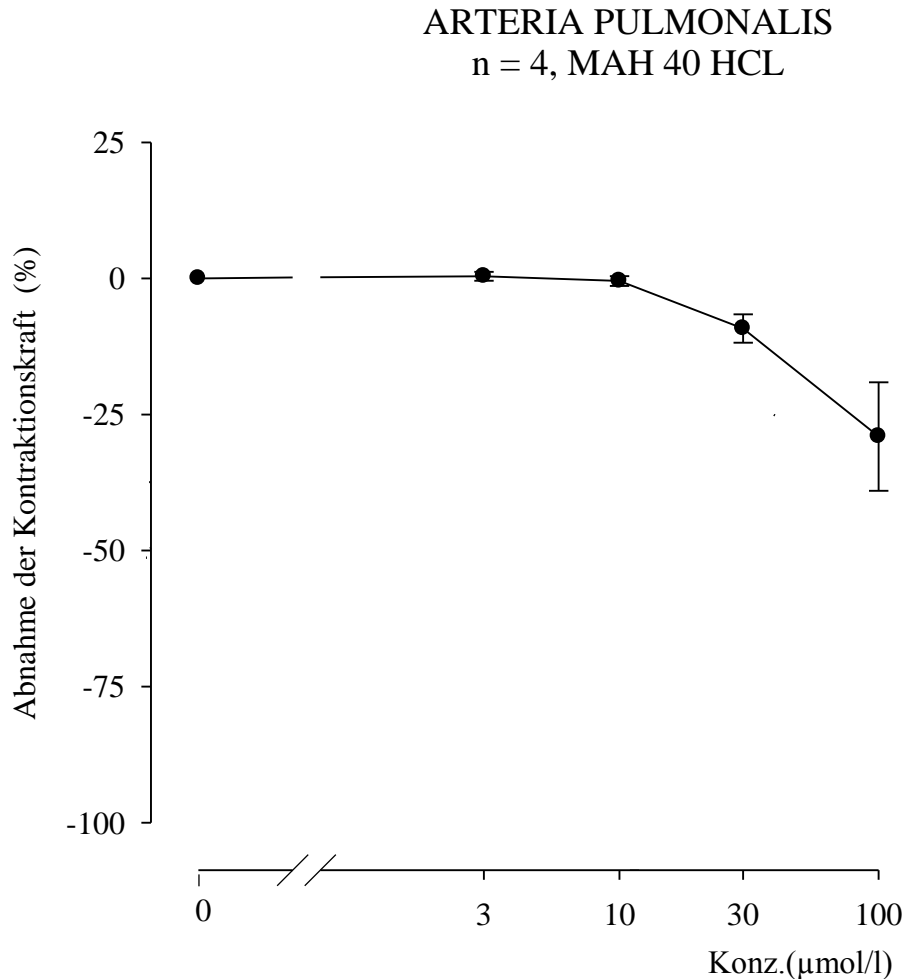
Tabelle 8: Versuchsergebnisse von MAH40 HCl an der Arteria pulmonalis

MAH 40 HCl µmol/l	fc ± SEM (mN)	fc ± SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	12,72±1.67	0±0	4	-
3	12,77 ±1,67	0,39±0,80	4	n.s.
10	12,64±1,62	-0,47±0,91	4	n.s.
30	11,59±1,67	-9,2±2,61	4	n.s.
100	9,12±1,88	-29,05±9,98	4	0,05

Legende zu Tabelle 8:

Es werden die Mittelwerte, Standardabweichung und die Irrtumswahrscheinlichkeit bei den Konzentrationen von 3,10,30 und 100µmol/l berechnet.

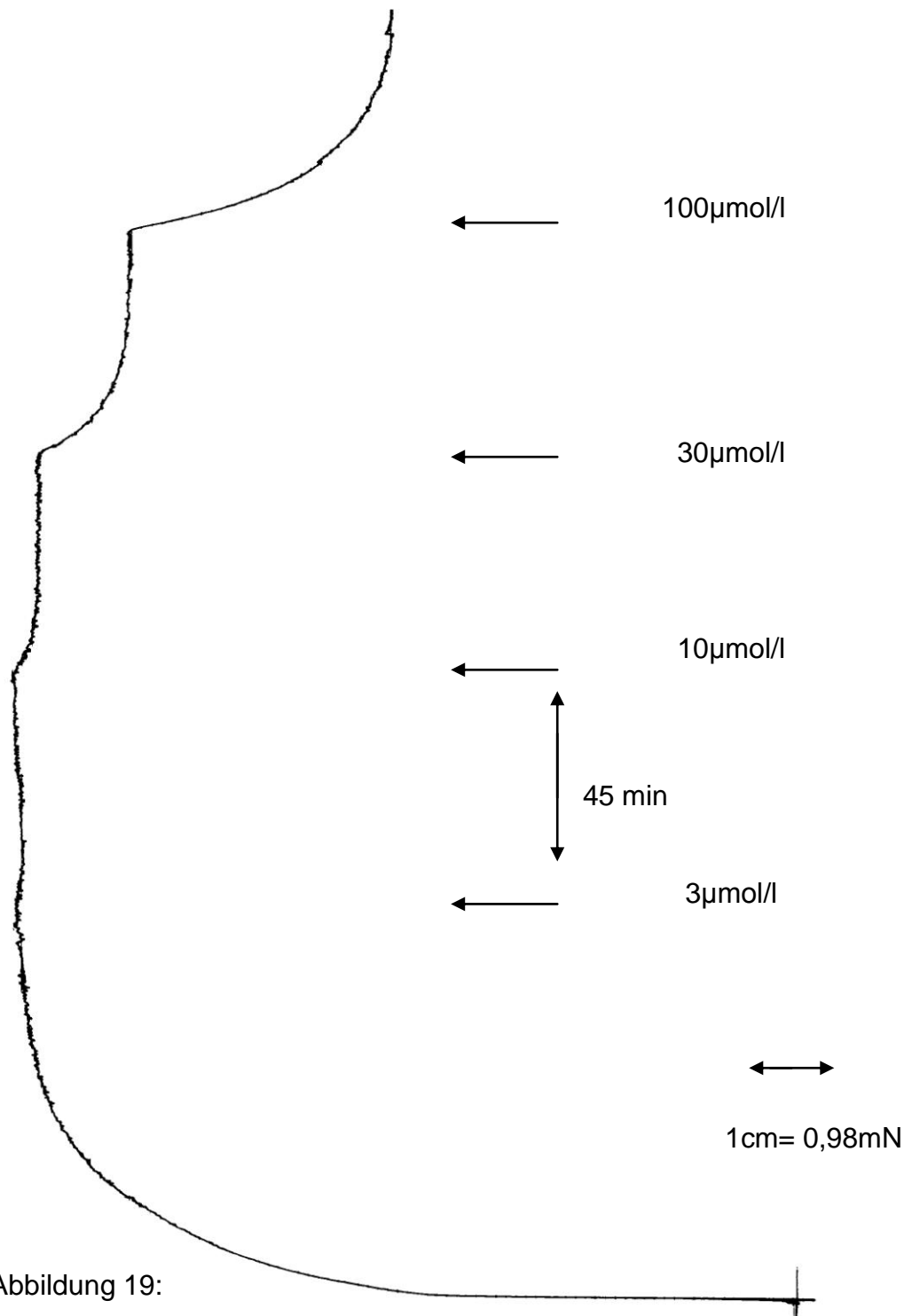
Diagramm 4: Konzentrations- Wirkungskurve von MAH 40 HCl an der Arteria pulmonalis



Legende zu Diagramm 4:

Anhand des dargestellten Graphen kann eine schwache Dilatation gezeigt werden. Auf der x-Achse wird die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen, während die y-Achse die prozentuale Abnahme der Kontraktionskraft beschreibt. Die fett markierten Punkte stellen die errechneten Mittelwerte dar.

Abbildung 19: Originalaufzeichnung der vasodilatierenden Wirkung von MAH40 HCl



Legende zu Abbildung 19:

Es wird die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft über einen bestimmten Zeitraum aufgezeigt. Hierbei ist aufgrund der schwachen Wirkung klar ersichtlich warum kein EC_{50} Wert errechnet werden kann.

4.1.5 Terminales Ileum

Es wurden 4 Versuche an Darmpräparaten benötigt um die Wirkung der Substanz MAH 40 HCl zu testen. Dabei wurde die spasmolytische Wirkung an der glatten Muskulatur beobachtet und mithilfe eines Flachbetschreibers aufgezeichnet.

Die Berechnungen ergaben einen Kontrollwert von $11,54 \pm 1,56$. Die Testsubstanz zeigte nur relativ schwache Wirkung auf das Darmgewebe, weshalb auch kein EC_{50} Wert ermittelt werden konnte.

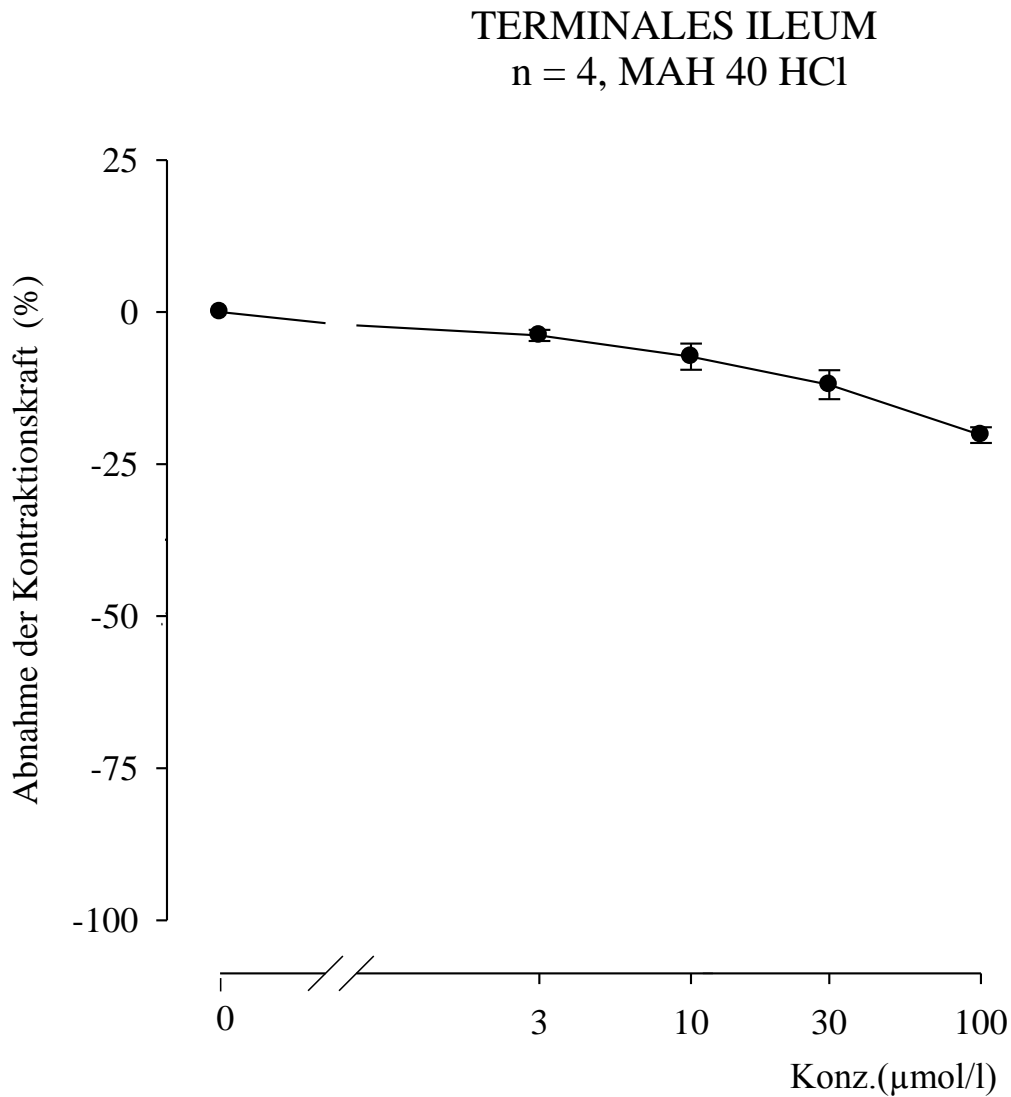
Tabelle 9: Versuchsergebnis von MAH40 HCl am Dünndarm

MAH 40 HCl $\mu\text{mol/l}$	fc \pm SEM (mN)	fc \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$11,54 \pm 1,56$	0 ± 0	4	-
3	$11,14 \pm 1,52$	$-3,84 \pm 0,90$	4	n.s.
10	$10,71 \pm 1,48$	$-7,34 \pm 2,16$	4	n.s.
30	$10,23 \pm 1,55$	$-11,95 \pm 2,39$	4	n.s.
100	$9,23 \pm 1,29$	$-20,23 \pm 1,30$	4	n.s.

Legende zu Tabelle 9:

Die arithmetischen Mittelwerte wurden ermittelt und mit fc bezeichnet. SEM steht für die Standardabweichung, n für die Anzahl der Versuche und P für die Irrtumswahrscheinlichkeit.

Diagramm 5: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH40 HCl am terminalen Ileum

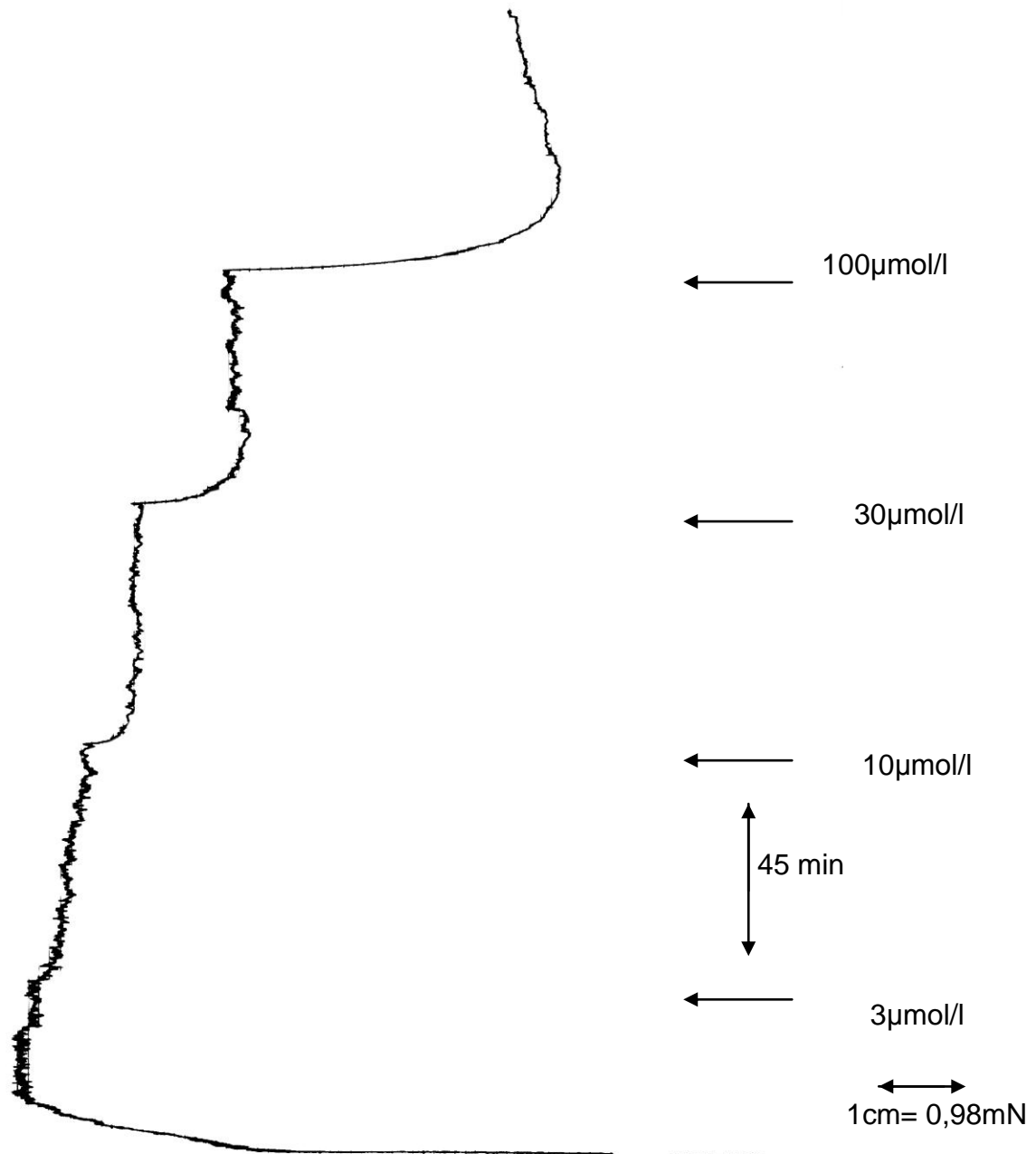


Legende zu Diagramm 5:

Der flache Verlauf der Kurve spiegelt die minimale Wirkung der Testsubstanz auf das Darmpräparat wider. Es konnte deshalb auch kein EC₅₀ ermittelt werden.

Auf der x-Achse wird die Konzentration in µmol/l angegeben, auf der y-Achse die Reduktion der Kontraktionskraft in Prozent.

Abbildung 20: Originalaufzeichnung der spasmolytischen Wirkung von MAH 40 HCl



Legende zu Abbildung 20:

Die Pfeile kennzeichnen die Zugabe der jeweiligen Konzentrationen in einem Zeitabstand von 45 Minuten. Die flach verlaufende Kurve in der Originalabbildung zeigt die schwache Wirkung der Substanz auf den Dünndarm.

4.2 Versuche zur Analyse des Wirkmechanismus von MAH 40 HCl auf die Aorta

Da die Substanz an der isolierten Aorta eine starke Wirkung zeigte, wurde dieses Organ ausgewählt um den Wirkungsmechanismus der Testsubstanz MAH 40 HCl zu testen.

4.3. Effekt von MAH 40 HCl in Kombination mit Glibenclamid auf die isolierte Aorta

Die Testsubstanz MAH 40 HCl stellt ein Prodrug dar, welches im Organismus Carbonylsulfid und Schwefelwasserstoff freisetzt. Schwefelwasserstoff wirkt über eine Aktivierung ATP-abhängiger Kaliumkanäle (Vohr, 2010). Um einen Wirkungsmechanismus zu bestimmen, war es nahe liegend die Kaliumkanäle wieder zu schließen und somit der Wirkung gegenzusteuern. Deshalb wurde der Wirkstoff Glibenclamid ausgewählt.

Glibenclamid weist ein Molekulargewicht von 494,0g/mol auf. Für den Versuch wurden bei einer Organbadgröße von 25ml 1,24mg der Substanz in 100µl Dimethylsulfoxid, kurz DMSO gelöst.

Glibenclamid zählt zur Gruppe der Sulfonylharnstoffe, die über eine Blockade der ATP-abhängigen Kaliumkanäle wirken und bei Diabetes mellitus Typ 2 indiziert sind (Wehling, 2005). Nach erfolgter Kontraktion durch eine Kaliumchloridlösung wurde nach Erreichen der Plateauphase ein Kontrollwert von $7,86 \pm 1.77\text{mN}$ errechnet.

Zuerst folgte die Zugabe von 100µl Glibenclamid. Nach 45 Minuten wurden 100µl von MAH 40 HCl in das Organbad eingebracht und weitere 45 Minuten lang mit dem Schreiber am Millimeterpapier aufgezeichnet.

Nach Zugabe von Glibenclamid wurde eine Abnahme der Kontraktion um 16% registriert. Bei nachfolgender Verabreichung von 100µl MAH40 HCl eine weitere Relaxation des Gefäßes um fast 40%.

Da nach Zugabe eines Kaliumkanalblockers die Wirkung von MAH 40 HCl nicht abgeschwächt werden konnte, ist darauf zu schließen, dass der Wirkmechanismus nicht, oder nur minimal auf eine Öffnung von Kaliumkanälen zurückzuführen ist.

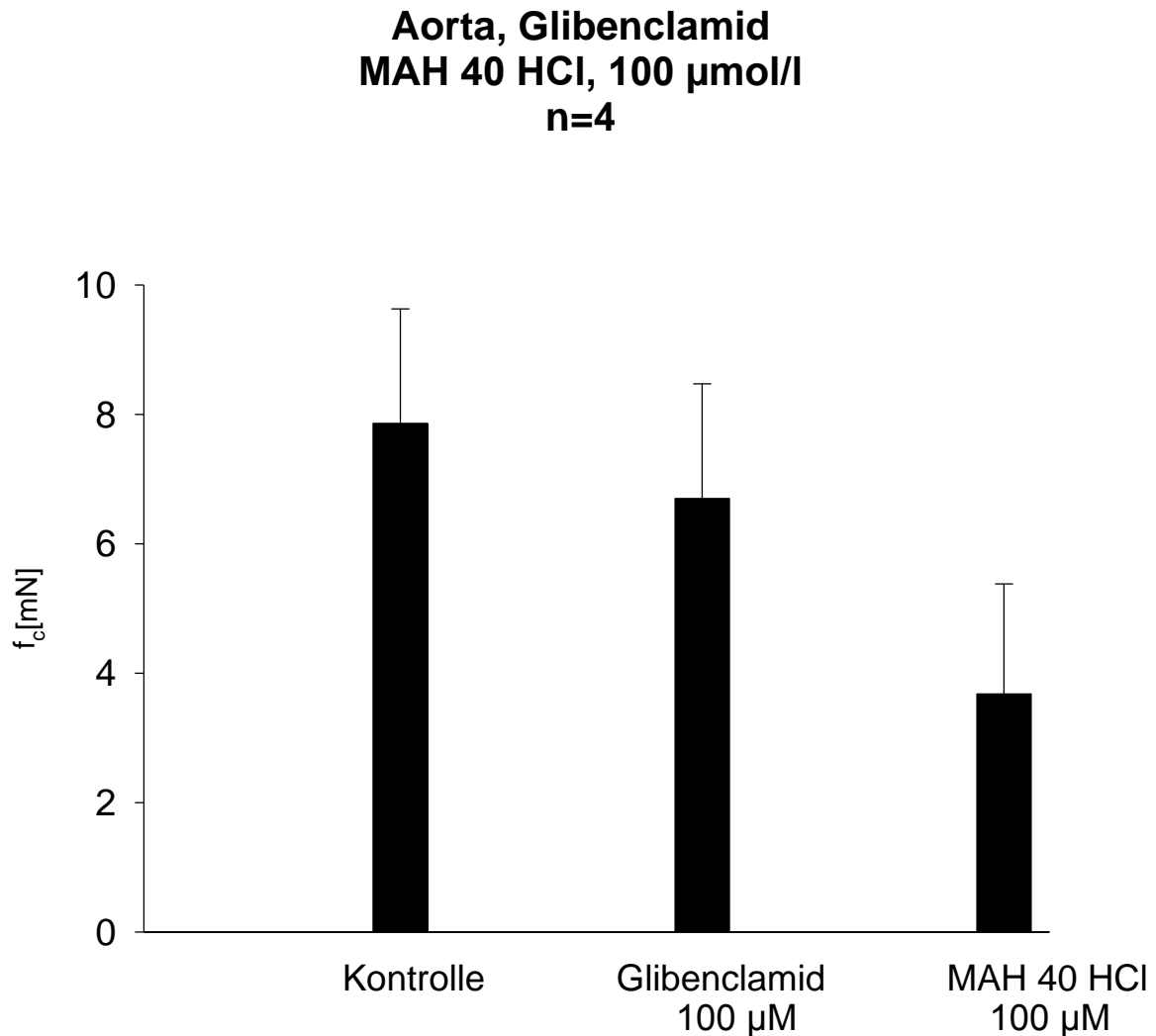
Tabelle 10: Ergebnis des Wirkmechanismus mit MAH 40 HCl

Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit
Kontrolle	9,42 \pm 2,00	4	-
100 μM Glibenclamid	8,32 \pm 2,06	4	-
+ 100 μM MAH40 HCl	4,96 \pm 1,81	4	0,05

Legende zu Tabelle 10:

Die Konzentration wird in $\mu\text{mol/l}$ angegeben, der berechnete Mittelwert wird als f_c , die Standardabweichung als SEM bezeichnet.

Diagramm 6: Graphische Darstellung der Ergebnisse des Versuches anhand eines Balkendiagramms



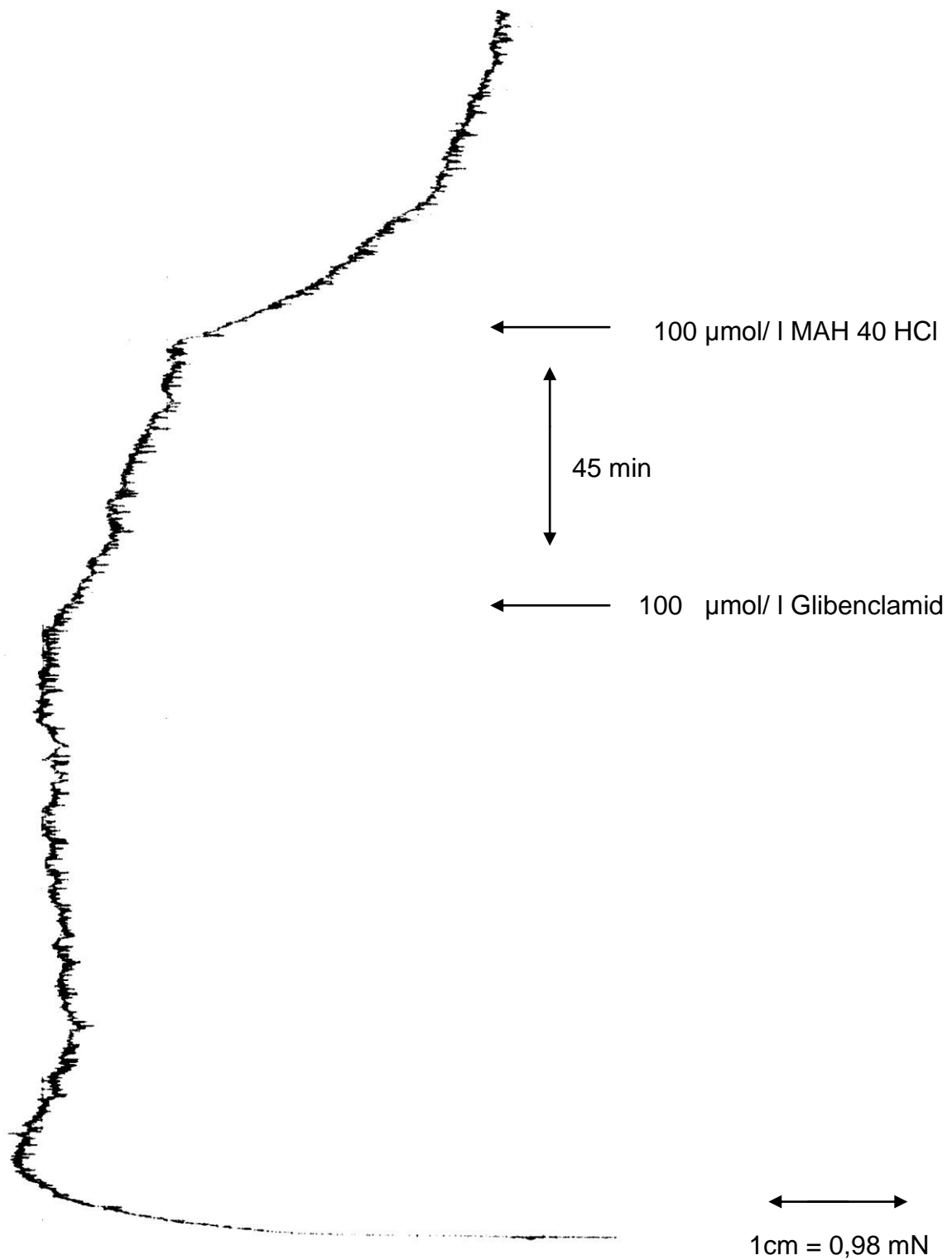
Legende zu Diagramm 6:

Die senkrechten Balken entsprechen der Kontraktionsstärke in mN, während die dünnen Striche den Standardfehler symbolisieren.

Auf der x-Achse werden Kontrollwert und Konzentrationen von Glibenclamid und MAH 40 HCl aufgetragen, auf der y-Achse die Kontraktionskraft in mN.

Da sich die Größen der Standardfehler von Glibenclamid und MAH 40 HCl überschneiden, ist davon auszugehen, dass zumindest ein Teil des Wirkmechanismus auf die Öffnung von Kaliumkanälen zurückzuführen ist.

Abbildung 20: Originalaufzeichnung des Experiments von Glibenclamid an der Aorta



Legende zu Abbildung 20:

Die Pfeile markieren den Zeitpunkt des Einbringens der Substanz in das Organbad.
Zwischen den Zugaben liegt eine Zeitspanne von 45 Minuten.

5. DISKUSSION

Ziel der Diplomarbeit war es, die Wirkung einer Testsubstanz hinsichtlich der Änderung der Kontraktionskraft an Aorta, Arteria pulmonalis, Dünndarm, Papillarmuskel zu testen. Am rechten Vorhof wurde eine mögliche Beeinflussung der Schlagfrequenz beobachtet.

Die Auswertung der Ergebnisse wurde bereits in Kapitel 4 besprochen.

5.1 Einfluss von MAH 40 HCl auf Meerschweinchenorgane

5.1.1 Einfluss von MAH 40 HCl auf glattmuskuläre Organe

Zu den glattmuskulären Organen zählen die Aorta, die Arteria pulmonalis und das terminale Ileum.

Tabelle 8: Wirkung der Testsubstanz auf die glatte Muskulatur

Organpräparat	MAH 40 HCl Kontraktionskraft f_c (%) ± SEM bei 100 $\mu\text{mol/l}$	EC ₅₀ bei ($\mu\text{mol/l}$)
Aorta	-41,88 ± 8,80	-
Arteria pulmonalis	-29,05 ± 9,98	-
Terminales Ileum	-20,23 ± 1,30	-

Betrachtet man die glattmuskulären Organe, konnte an der Aorta die größte Wirkung erzielt werden. Deshalb wurde dieses Organ auch herangezogen um den Wirkungsmechanismus mithilfe von Glibenclamid zu untersuchen. Die Vorgehensweise wurde bereits in Kapitel 4.2.1 eingehend beschrieben.

Ein EC₅₀ Wert konnte weder bei den Blutgefäßen, noch beim Dünndarm berechnet werden, da selbst bei 100µmol/l keine ausreichend starke Wirkung erzielt werden konnte.

5.1.1.1 Einfluss von MAH 40 HCl auf die isolierte Aorta

Die Ergebnisse zeigen eine, nach anfänglicher maximaler Kontraktion eine Vasodilatation der Aorta um $41,88 \pm 8,80\%$. Obwohl die Veränderung deutlich zu erkennen ist, konnte selbst bei einer kumulativen Konzentration von 100 µmol/l kein EC₅₀ Wert ermittelt werden.

5.1.1.2 Einfluss von MAH 40 HCl auf Arteria pulmonalis

Es wurden vier Versuche herangezogen, der arithmetische Mittelwert mitsamt Standardabweichung berechnet. Dabei konnte eine Kontraktionsabnahme von $29,05 \pm 9,98\%$ beobachtet gegenüber dem anfänglichen Kontrollwert ermittelt werden. Auch hier konnte im Graph kein EC₅₀ abgelesen werden.

5.1.1.3 Einfluss von MAH 40 HCl auf das terminale Ileum

Wie auch bei den beschriebenen Versuchen mit Aorta und Pulmonalarterie wurde das Darmstück in die Apparatur 2 eingespannt und chemisch maximal kontrahiert. Die Kontraktionsabnahme nach maximal verabreichter Konzentration an Testsubstanz betrug $20,23 \pm 1,30\%$. Wie auch bei den anderen glattmuskulären Organen konnte kein EC₅₀ bestimmt werden.

5.1.2 Einfluss von MAH 40 HCl auf die Herzmuskulatur

Tabelle 9: Wirkung der Testsubstanz auf die Herzmuskulatur

Organpräparat	MAH 40 HCl Kontraktionskraft f_c (%) ± SEM bei 100 $\mu\text{mol/l}$	EC₅₀ ($\mu\text{mol/l}$)
Rechter Vorhof	0,00 ± 0,00	52,9
Papillarmuskel	-93,61 ± 4,11	13,8

Die Versuche an der Herzmuskulatur zeigen eine signifikante Abnahme der Inotropie am Papillarmuskel und eine stark negativ chronotrope Wirkung am rechten Vorhof. In beiden Fällen konnte ein EC₅₀ errechnet werden.

5.1.2.1 Wirkung von MAH 40 HCl auf den Papillarmuskel

Die errechneten arithmetischen Werte ergeben eine Abnahme der Inotropie um 93,61 ± 4,11%. Durch das Erstellen einer Konzentrations-Wirkungsbeziehung konnte ein EC₅₀ von 13,8 ($\mu\text{mol/l}$) abgelesen werden. Im Vergleich zu den glattemuskulären Organen, reagierte der Musculus papillaris relativ stark auf den Kontakt mit der zu testenden Substanz MAH 40 HCl.

5.1.2.2 Wirkung von MAH 40 HCl auf das Atrium cordis dextrum

Auch am rechten Vorhof konnte durch Substanzzugabe eine deutliche Veränderung erzielt werden. Die Testsubstanz wirkte schon bei geringen Konzentrationen deutlich negativ chronotrop, es wurde in der graphischen Darstellung ein EC₅₀ von 52,9 $\mu\text{mol/l}$ abgelesen.

Bei einer Konzentration von 100µmol/l war die Wirkung so stark, dass sogar die Spontanaktivität des Vorhofs aussetzte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Testsubstanz MAH 40 HCl selektiv und teilweise sehr stark auf die Herzmuskulatur wirkt. Die stärkste Wirkung konnte hier am Musculus papillaris erzielt werden, dessen EC50 im Vergleich zu den anderen Organen mit 13,8µmol/l sehr niedrig lag. Die Experimente an den glattmuskulären Organen zeigen im Vergleich nur mäßig starke Abnahmen der Kontraktionskraft und es konnte weder bei den Blutgefäßen noch beim Darm ein EC50 Wert ermittelt werden.

5.3 Untersuchung des möglichen Wirkmechanismus an der isolierten Aorta

Um den Wirkmechanismus zu untersuchen wurde das glattmuskuläre Organ ausgewählt, an dem die Testsubstanz die stärkste Wirkung hervorgerufen hat. Die Aorta reagierte mit einer Abnahme der Kontraktionskraft um $41,88 \pm 8,80\%$ bei einer maximalen Konzentration von 100 µmol/l am effektivsten.

Die nähere Untersuchung erfolgte mit Glibenclamid, einem Wirkstoff aus der Gruppe der Sulfonylharnstoffe, der an regulatorische SHR-Untereinheiten binden und ATP-abhängige Kaliumkanäle schließen (Graefe et al. 2011). Im Vergleich dazu sind die biologischen Effekte von Schwefelwasserstoff auf die Aktivierung von KATP-Kanäle, Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, Aktivierung der Adenylatcyclase und die Modulation diverser Signalwege zurückzuführen (Vohr, 2010).

Die Versuche sollten klären, ob die Wirkung von MAH 40 HCl auf eine Öffnung von Kaliumkanälen zurückzuführen ist und somit ein Antagonismus gegenüber Glibenclamid besteht.

Die Ergebnisse (siehe Diagramm 6) zeigen deutlich, dass die Wirkung MAH 40 HCl auf anderen Wirkmechanismen beruhen. Eventuell basiert ein minimaler Teil der Wirkung auf der Aktivierung von Kaliumkanälen, da sich die Mittelwerte mitsamt Standardabweichung von MAH 40 HCl und Glibenclamid geringfügig überschneiden.

Abschließend kann festgestellt werden, dass MAH 40 HCl über keine oder nur geringfügige H₂S Freisetzung verfügt und die Wirkung der Substanz auf anderen Mechanismen beruht.

Es könnten andere Wirkmechanismen wie z.B. eine Aktivierung der NO-Synthase, Calcium-Antagonismus, eine sympatholytische, eine anticholinerge oder antihistaminerge Wirkung beteiligt sein.

Zur Aufklärung dieser Mechanismen sind allerdings noch weitere Versuche notwendig.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Diplomarbeit behandelt die Untersuchung der Testsubstanz MAH 40 HCl an isolierten Organen vom Meerschweinchen.

Die Versuche wurden an Organen mit glatter Muskulatur zu denen die Aorta, die Arteria pulmonalis und das terminale Ileum zählen, durchgeführt. Dabei wurde das Augenmerk auf eine eventuelle vasodilatierende oder spasmolytische Wirkung gelegt.

Außerdem wurden Organe mit quergestreifter Muskulatur für die Experimente herangezogen. Am rechten Vorhof wurde die Auswirkung auf die Chronotropie und am Papillarmuskel eine inotrope Wirkung untersucht.

Rechnerisch wurde aus den Versuchsreihen je ein EC_{50} Wert ermittelt. Dieser Wert entspricht der effektiven Konzentration, bei der es zu einer halbmaximalen Wirkung kommt.

Für die Versuchsreihen wurden die Organe jeden Tag frisch entnommen, präpariert und in die entsprechenden Apparaturen eingespannt. Daraufhin wird die Halterung in ein begastes mit Tyrodelösung befülltes Organbad gesenkt.

Die Testsubstanz MAH 40 HCl wird in destilliertem Wasser gelöst und in 4 unterschiedlichen Konzentrationen kumulativ ins Organbad eingebracht. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde eine Vorspannung angelegt. Das mechanische Signal wurde über einen Kraftwandler in ein elektrisches umgewandelt, verstärkt und letztendlich mithilfe eines Flachbettschreibers auf Millimeterpapier registriert.

Der Wirkstoff MAH 40 HCl konnte vor allem an der Herzmuskulatur effektive Resultate erzielen. Am stärksten war der Effekt auf die Inotropie am Papillarmuskel mit einem EC_{50} von $13,8\mu\text{mol/l}$. Auch am rechten Vorhof konnte eine starke Abnahme der Schlagfrequenz beobachtet werden. Bei maximaler Konzentration von $100\mu\text{mol/l}$ setzte die spontane Schrittmacheraktivität vollständig aus.

An den glattmuskulären Organen konnten keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden, sodass auch keine EC_{50} Werte für Aorta, Arteria pulmonalis und den Dünndarm berechnet werden konnte.

Für die Untersuchung des möglichen Wirkungsmechanismus wurden Präparate der Aorta herangezogen.

Eine Beteiligung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle konnte nicht nachgewiesen werden, was bedeutet, dass der Substanz andere Wirkungsmechanismen zugrunde liegen müssen.

7. Literaturverzeichnis

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

Amann-Vesti Beatrice R. (2006) Klinische Pathophysiologie, Georg Thieme Verlag. 93

Enfield Roscoe Henry, Carl Schorlemmer (1871) Kurzes Lehrbuch der Chemie: nach den neuesten Ansichten der Wissenschaft. New York Public Library. 275

Estler Claus-Jürgen, Harald Schmidt (2007) Pharmakologie und Toxikologie: Für Studium und Praxis. Schattauer Verlag 996

Freissmuth Michael, Stefan Bohm (2012) Pharmakologie Und Toxikologie: Von Den Molekularen Grundlagen Zur Pharmakotherapie. Springer 793-794

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

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

Graefe Karl Heinz, Heinz Bönisch, Werner K. Lutz (2011) Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie. Georg Thieme Verlag. 14

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

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

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

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

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

Krautzig Steffen (2008) Basislehrbuch Innere Medizin. Elsevier, Urban&FischerVerlag. 87

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

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

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

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

Mutschler Ernst, Gerd Geisslinger, Heyo K. Kroemer, Peter Ruth, Monika Schäfer-Korting (2008) Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 9.Auflage. 574-585)

Reichl Franz-Xaver, Jochen Benecke (2002) TaschenAtlas der Toxikologie. Georg Thieme Verlag 136

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

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

Silbernagl Stefan, Florian Lang (2009) Taschenatlas Pathophysiologie. Georg Thieme Verlag. 196

Thiel Holger, Norbert Roewer (2009) Anästhesiologische Pharmakotherapie: Von den Grundlagen der Pharmakologie zur Medikamentenpraxis, Georg Thieme Verlag. 356

Hans-Werner(2010) Toxikologie: Band 2: Toxikologie der Stoffe. Wiley-VCH. 43

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

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

Wehling Martin (2005) Klinische Pharmakologie, Georg Thieme Verlag. 267-268

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

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

8. Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 14. November 1986
Geburtsort: Gmünd
Familienstand: ledig
Staatsbürgerschaft: Österreich
Religionsbekenntnis: Römisch-katholisch
Eltern: Gertraud Kitzler, geb. am 29.05.1961
Franz Kitzler, geb. am 05.04.1961

Schulbildung:

1993- 1997 Volksschule in Groß Gerungs
1997- 2001 Hauptschule in Groß Gerungs mit
Englisch als Arbeitssprache
2001- 2005 Bundesrealgymnasium Zwettl mit
naturwissenschaftlichem Schwerpunkt
Matura im Juni 2005
2005- 2006 Studium der Humanmedizin an der
Medizinischen Universität Wien
Ab Oktober 2006 Studium der Pharmazie in Wien

Bisherige Arbeitsstellen:

Ferialpraktikum, Apotheke zu hl. Margaretha in
3920 Groß Gerungs, Juli 2004
Ferialpraktikum, Apotheke zur Mutter Gottes in
1100 Wien,
Juli 2007- Juli 2010