



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Pharmakologisches Screening einer neu synthetisierten  
Schwefelwasserstoffverbindung (SWS 92.HCl) an  
isolierten Meerschweinchenorganen

Verfasserin

**TIJANA STJEPANOVIC**

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreuer: Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik

## **Danksagung**

*Es ist noch kein Meister vom Himmel gefallen, hinter meinem Erfolg stehen viele Menschen, die mich die ganze Zeit unterstützt und mir geholfen haben.*

*Zuerst will ich mich herzlich bei Herrn Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik für seine unermüdliche, freundliche Unterstützung und für die fachliche und engagierte Betreuung während meiner Arbeit im Labor als auch bei Erstellung dieser Diplomarbeit, bedanken.*

*Mein Dank gilt auch für Herrn Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker, für die Synthese und Bereitstellung der Substanz.*

*Ein ganz besonderer Dank geht an meine lieben Eltern und meinen Bruder, die mich die ganze Zeit geliebt, unterstützt und motiviert haben.*

**Mama,**

*„Kleines Seelchen in der Nacht,  
hast mir so viel Glück gebracht,  
musstest gehen, bist nun fort,  
weit an einem schönen Ort.  
Regenbogen, Wasserfall,  
grüne Wiesen überall,  
spielen, toben, frohes Treiben  
hier willst Du ganz sicher bleiben.  
Kleines Seelchen warte dort,  
wart auf mich an diesem Ort,  
eines Tages, Du wirst sehen,  
werden wir uns wieder sehen.“*

*Hvala ti mama za svu ljubav i podrsku i zauvijek ces ostati sa nama...*

*Ich möchte auch meinem Ehemann und Sohn für die Liebe, ihr Verständnis und die Unterstützung danken. Danke, dass ich euch habe!!! Abschließend bedanke ich mich bei allen meinen Freunden, die mich in den Höhen und Tiefen unterstützen aber besonderes an meine liebe Freundin Danijela Jerkovic, die wirklich etwas Besonderes ist.*

---

## Inhaltsverzeichnis

---

1. Einleitung .....	1
2. Zielsetzung.....	5
3. Material und Methodik.....	6
3.1 Testsubstanz: SWS92. HCL .....	6
3.1.1 Versuchsanordnung .....	6
3.2 Versuchstiere.....	8
3.2.1 Physiologische Elektrolytlösung (Tyrode).....	9
3.3 Isolierung und Präparation der Organe.....	10
3.4 Präparate .....	11
3.4.1 Verwendete Organe.....	11
3.4.2 Rechter Vorhof (Atrium dexter) .....	11
3.4.3 Absteigender Teil der Aorta( Aorta descendens).....	13
3.4.5 Lungenarterie (A. pulmonalis).....	14
3.4.6 Papillarmuskel (Muskulus papillaris) .....	14
3.4.7 Darm (Terminales Ileum) .....	14
3.5 Versuchsordnung und Apparaturen.....	16
3.5.1 Apparatur I.....	17
3.5.2 Versuchsapparatur II.....	19
3.5.3 Gaszufuhr .....	21
3.5.4 Wasserbad.....	22
3.5.5 Kraftwandler, Verstärker und Schreiber .....	23
3.6 Versuchsdurchführung .....	25
3.6.1 Versuchsablauf bei Atrium dexter .....	25
3.6.2 Versuchsablauf bei Aorta descendens .....	26
3.6.3 Versuchsablauf bei Arteria pulmonalis .....	27
3.6.4 Versuchsablauf bei Ileum terminalis .....	27
3.6.5 Versuchsablauf bei Musculus papillaris.....	28
3.7 Auswertung und Statistik.....	30

3.7.1 Atrium cordis dexter.....	30
3.7.2 Aorta descendens, Arteria pulmonalis, terminales Ileum.....	30
3.7.3 Musculus papillaris.....	31
3.7.4 Statistik.....	32
4. Ergebnisse.....	33
4.1 Ergebnisse der Testsubstanz SWS 92 HCL.....	33
4.1.1 Wirkung von SWS 92 HCl auf den Atrium cordis dexter.....	33
4.1.2 Wirkung von SWS 92. HCl auf die Aorta descendens .....	36
4.1.3 Wirkung von SWS 92.HCl auf den Musculus papillaris .....	39
4.2.4 Wirkung von SWS92.HCl auf die Arteria pulmonalis .....	42
4.2.5 Wirkung von SWS92.HCl auf das terminale Ileum.....	45
4.2 Resultate der Untersuchung mit Glibenclamid (Wirkmechanismus).....	48
4.2.1 Ergebnisse der Versuche mit 30 µmol/l Glibenclamid.....	48
4.2.2 Ergebnisse der Versuche mit 100 µmol/l Glibenclamid.....	52
5. Diskussion.....	55
5.1 Versuchsreihen an glattmuskulären Organen .....	55
5.2 Versuchsreihen am quergestreiften Herzmuskel.....	57
5.3 Versuchsreihen mit SWS92.HCl in Kombination mit Glibenclamid .....	58
5.4 Versuche mit SWS92.HCl in Kombination mit 30 µmol/l Glibenclamid...	59
5.5 Versuche mit SWS92.HCl in Kombination mit 100 µmol/l Glibenclamid.	59
6. Zusammenfassung.....	60
7. Literaturverzeichnis .....	61
8. Curriculum Vitae.....	63

## 1. Einleitung

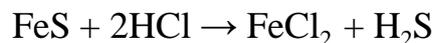
---

Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) kennt man als ein farbloses, brennbares Gas mit charakteristischem Geruch. Der Geruch erinnert an faule Eier. H<sub>2</sub>S ist schwerer als Luft und relativ gut wasserlöslich. Der MAK-Wert beträgt 15mg/m<sup>3</sup>. Aufgrund dessen wurden der H<sub>2</sub>S als sehr giftiges Gas eingestuft. Eine höchstzulässige Konzentration eines giftigen Stoffes am Arbeitsplatz, bei welchen keine gesundheitliche Beeinträchtigung kommt, wurde als einen MAK-Wert bezeichnet (Jander Blasius 1983).

Der genaue Wirkmechanismus einer H<sub>2</sub>S-Vergiftung ist noch nicht genau geklärt. In niedrigen Konzentrationen ist H<sub>2</sub>S durch seinen charakteristischen Geruch erkennbar, durch höheren Konzentrationen wurde Schwefelwasserstoff bzw. das aus diesem im Organismus gebildete Hydrogensulfid-Ion wie Blausäure eisenhaltige Atemenzyme blockiert (Mutschler et al. 2008).

Im Labor kann Schwefelwasserstoff dadurch gewonnen werden, indem Salzsäure auf Fe (II)Sulfid getropft wird.

*Reaktionsgleichung:*



Im Körper kann H<sub>2</sub>S auch entstehen. Dies erfolgt über einen endogenen Weg, durch eine Reaktion zwischen Cystathionin -β- Synthase (CBS) und Cystathionin -γ-Lyase (CSE) (Stipanuk und Beck, 1982 Hosoki et al. 1997).

In einer Studie wurde die Auswirkung eines CSE-Inhibitors auf die Entstehung von H<sub>2</sub>S untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass DL- Propargylglycin (CSE-Hemmer) eine vollständige Inhibition der H<sub>2</sub>S Produktion an den getesteten Arterien auswirkte (Hosoki et al. 1997). Für Cystathionin-β-Synthase oder CBS wurde bekannt, dass es vor allem im Hippokampus produziert wurde (Abe und Kimura 1996).

Während CSE größtenteils in der Leber aber auch in Niere und in kleiner Konzentration in dem Gehirn zu finden ist.

Es konnte auch eine vasodilatierende Wirkung von H<sub>2</sub>S nachgewiesen werden. Die Wirkung basiert auf der Öffnung von ATP-abhängigen K-Kanälen. Aufgrund des starken Einstroms von K<sup>+</sup>- Ionen in die Zelle kommt es zu einer Hyperpolarisation, was eine Erschlaffung der glatten Muskulatur verursacht (Hosoki et al. 1997).

H<sub>2</sub>S wirkt ausschließlich über eine Öffnung von K-Kanälen, wodurch es sich von anderen gasförmigen Faktoren wie NO und CO unterscheidet. Die wirken auch durch Aktivierung von cGMP (Guanosinmonophosphat) und führen zur Gefäßrelaxation (Zhao et al. 2001).

Im Herz wurde zum ersten Mal dem K<sub>ATP</sub>-Kanal entdeckt. Er stellt einen Heterooctamer dar. Dieser Heterooctamer gliedert sich in vier homologen Unterheiten. Die eine Gruppe ist SUR (Sulfonylharnstoff Rezeptor) und die andere KIR (Killer Cell immunoglobulin like Rezeptor) (Seino and Miki 2003, Holtzwarth 2004).

Anhand der Studie (Hosoki et al. 1997) wurde festgestellt das H<sub>2</sub>S eine protektive Funktion im kardiovaskulären System hat. Das Resultat war eine Relaxation von glatter Gefäßmuskulatur, Aorta und Pfortader. H<sub>2</sub>S hat eine

wichtige Rolle bei der Blutdrucksenkung und bei der Regulation des Tonus der glatten Muskulatur.

H<sub>2</sub>S wurde neuerlich zur Therapie bei essentieller Hypertonie eingesetzt.

Die WHO hatte eine Definition erstellt, wo ein systolischer Blutdruck bis 130 mm Hg und diastolische Blutdruck bis 85 mmHg als normales gilt. Bei einem Blutdruck ab 140/90 wird es als Hypertonie bezeichnet. Hier wird noch keine Therapie benötigt aber mit Änderung des Lebensstil kann man schon einen guten Erfolg erzielen.

Unter Lebensstilveränderung versteht man:

- Gewichtsreduktion
- Sport
- Vermeidung von Rauchen und Alkohol
- Stressabbau

Bei einer diagnostizierten Hypertonie sollte diese medikamentös behandelt werden.

Medikamente:

ACE-Hemmer (bei ACE-Hemmer Unverträglichkeit -Hemmer Unverträglichkeit werden Sartane eingesetzt),  $\beta$ -Blocker, Diuretika, Ca-Antagonisten

Die Auswahl der Antihypertensiva hängt von Gesamtzustand der Patienten ab.

Außer bei der Hypertonie wird H<sub>2</sub>S auch bei akutem Pankreasentzündungen (Bhatia et al. 2005), bei septischen Schockzuständen (Li et al. 2005a) aber auch beim Down Syndrom (Kamoun 2001) therapeutisch angewendet.

Zu erwähnen ist jedoch, dass geringe Mengen zu Übelkeit, Schwäche, Erbrechen und Atemwegreizungen führen, während höhere Konzentration zur akuten Vergiftungen führen, was in einer rasch eintretenden Atemlähmung resultieren kann (Mutschler et al.2005).

Die meisten Intoxikationen treten bei den Arbeiten in Abwasserkanälen und chemischen Laboratorien auf. Es kommt im Organismus zu einer Oxidation von Schwefelwasserstoff zu Sulfat, das als solches ausgeschieden wird (Mutschler et al. 2008).

Zahlreiche Studien zeigen, dass Schwefelwasserstoff im vasodilatierenden, kardioprotektiven und neuroprotektiven Bereich eingesetzt werden kann.

## ***2. Zielsetzung***

---

In der vorliegenden Diplomarbeit wird die Wirkung von einem neu synthetisierten Wirkstoff untersucht. Ziel war den Effekt dieser Substanz an verschiedenen Organpräparaten zu erforschen. Die Substanz wurde am Department für Medizinische Chemie/Pharmazeutische Chemie neu synthetisiert und trug die Bezeichnung SWS 92.HCL

Im praktischen Teil dieser Arbeit wurden Versuchsreihen an fünf verschiedene Organe durchgeführt. Bei der Arteria pulmonalis und der Aorta descendens bestimmt man eine vasodilatierende Wirkung und beim terminalen Ileum bestimmt man eine spasmolytische Wirkung. Für die Untersuchung der positiven oder negativen Inotropie und Chronotropie wurden Herzmuskelpräparate verwendet.

Es wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt um einen  $EC_{50}$ -Wert zu ermitteln. Einen  $EC_{50}$ -Wert wurde erreicht, wenn die Substanz einen halbmaximalen Effekt auf das Organ erreichen konnte.

Um einen möglichen Wirkmechanismus zu erforschen, verwendete man den Antagonisten Glibenclamid.

### ***3. Material und Methodik***

---

#### ***3.1 Testsubstanz: SWS92. HCL***

Substanzeigenschaften:

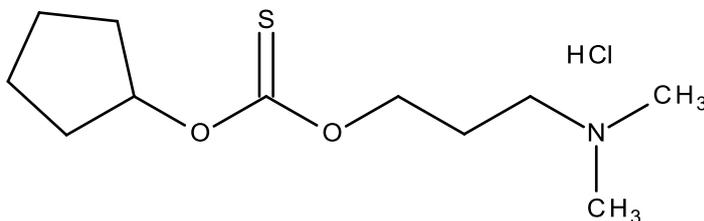
Molekular Gewicht: 267,82g/mol

Farbe: Weiß

Löslichkeit: H<sub>2</sub>O-löslich

Lagerung: Kühl (in den Kühlschrank)

**Abbildung 1:** Struktur der Testsubstanz SWS92. HCL



**Cyclopentyl [2-(Dimethylamino)propoxy]methanthioat-Hydrochlorid**

#### ***3.1.1 Versuchsanordnung***

Um die bestimmte Versuche durchzuführen zu können, musste die Substanz in ein geeignetes Lösungsmittel gelöst werden. Da es sich bei SWS92. HCL um eine hydrophile Substanz handelte, wurde 100 µl Aqua bidestillata zum Lösen verwendet.

Aufgrund einiger Organbäder, die unterschiedliche Volumina, entweder 8ml oder 25 ml, aufweisen, musste die Einwaage der Substanz angepasst werden.

Die Konzentration der Substanz musste so berechnet werden, dass nach kumulativer Zugabe eine Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  erreicht wurde.

**Tabelle 1: Stammlösung**

<i>Substanz</i>	<i>Molare Masse</i>	<i>Volumen Organbad in ml</i>	<i>Einwaage der Testsubstanz (100 <math>\mu\text{mol/l}</math>)/Organbad</i>
<i>SWS92. HCl</i>	267,82 g/l	8	0,207
		25	0,658

Die Testsubstanz konnte erst dann appliziert, werden das wenn jeweilige Organ eine konstante Kontrollphase aufwies, die normalerweise mindestens 45min dauerte.

War die Plateauphase erreicht, konnte man die erste Substanzmenge, nämlich 1  $\mu\text{l}$ , der Stammlösung einspritzen. Hier verwendete man eine Finnpipette.

Einspritzungen erfolgten in 45 Minuten Intervallen bis eine Endkonzentration von 100  $\mu\text{l}$  erreicht wurde. Weitere Einspritzungen hatten ein Volumen von 2 $\mu\text{l}$ , 7  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$  und zuletzt 70 $\mu\text{l}$ .

**Tabelle 2: Pipettierschema**

<i>Zugefügte Menge</i>	<i>Endkonzentration</i>
<i>1 <math>\mu\text{l}</math></i>	<i>1 <math>\mu\text{mol/l}</math></i>
<i>2 <math>\mu\text{l}</math></i>	<i>3 <math>\mu\text{mol/l}</math></i>
<i>7 <math>\mu\text{l}</math></i>	<i>10 <math>\mu\text{mol/l}</math></i>
<i>20 <math>\mu\text{l}</math></i>	<i>30 <math>\mu\text{mol/l}</math></i>
<i>70 <math>\mu\text{l}</math></i>	<i>100 <math>\mu\text{mol/l}</math></i>

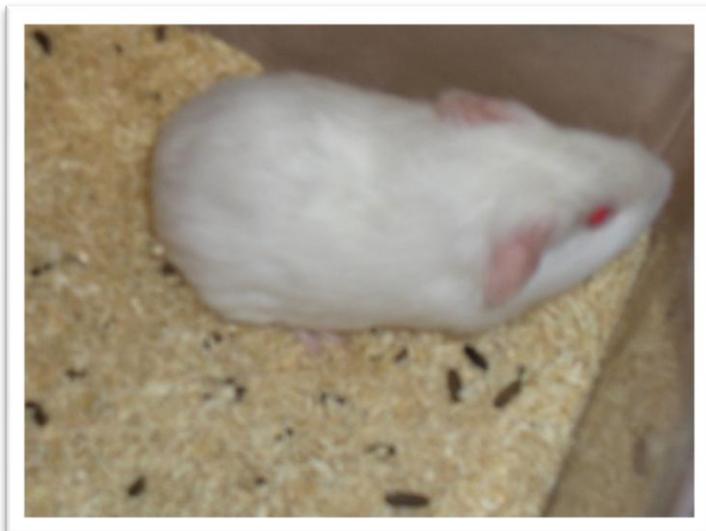
### **3.2 Versuchstiere**

Für die entsprechenden Experimente wurde jeden Tag ein Meerschweinchen benötigt. Meist werden weibliche Tiere mit einem Gewicht zwischen 250-500g verwendet. Das Meeresschweinchen wurde durch einen gezielten Genickschlag getötet. Auf dieser Weise wurde einer schneller und schmerzfreier Tod gewährleistet.

Durch Öffnung von Thorax und Abdomen, unter Benützung von der Schere, wurde noch zu schlagende Herz entnommen und dann ca. 20 cm langes Stück des Dünndarm und zuletzt die Aorta.

Um die Organe am Leben zu erhalten, verwendete man eine physiologische Elektrolytlösung oder Tyrode.

**Abbildung 2:** *Meeresschweinchen*



### 3.2.1 Physiologische Elektrolytlösung (Tyrode)

Jeden Versuchstag wurde eine frische Elektrolytlösung hergestellt. Durch Oxymix bzw. Carbogen, einen Gemisch von 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>, war es möglich durch ständige Begasung isolierte Organe am Leben zu erhalten.

Die Herstellung der Tyrode erfolgte nach Vorschriften von Reiter (1967).

**Tabelle 3:** Bestandteile der Tyrode

<i>Substanz</i>	<i>Molare Masse</i>	<i>Stocklösung</i>	<i>ml Stocklösung/ l Tyrode</i>	<i>mmol/l</i>
NaCl	58,442 g/mol	1000,25 g/5l	33,60	115,01
KCl	74,55 g/mol	50,33 g/5l	35,00	4,73
NaHCO <sub>3</sub>	84,01 g/mol	125,00 g/5l	83,70	24,91
MgSO <sub>4</sub>	120,37 g/mol	147,02 g/5l	1,18	0,29
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09 g/mol	62,00 g/250ml	1,18	2,15
CaCl	110,98 g/mol	34 g/250ml	3,20	3,92
Glucose	180,16 g/mol	Reinsubstanz	1,98	

Die in der Tabelle angeführte Menge von NaCl, KCl, NaHCO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub> und KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> wurden in 2l Messkolben vermischt. Anschließend gab man die Glucose hinzu und wurde der Kolben mit destilliertem Wasser ca.  $\frac{3}{4}$  vollgefüllt. Der Kolben wird mehrmals geschüttelt bis Glucose aufgelöst wurde und dann folgten eine 20 minutige Begasung mit Oxymix. Zuletzt wurde CaCl<sub>2</sub> zugegeben und hier musste man beachten, dass kein Niederschlag bzw. keine Ausfällung von schwerlöslichen Calciumsalzen entstand. Was letztendlich zur einen Trübung der Lösung führt. Deswegen wurde CaCl<sub>2</sub> tropfenweise pipettiert.

Anschließend wurde 2l Kolben bis zur Markierung mit Aqua bidestillata aufgefüllt.

### ***3.3 Isolierung und Präparation der Organe***

Die Untersuchungen wurden am Herz, einem Teil des Dünndarms, Aorta und Arteria pulmonalis durchgeführt.

**Abbildung 3:** *Sezierungbesteck*



### **3.4 Präparate**

#### **3.4.1 Verwendete Organe**

**Abbildung 4:** *Stereomikroskop und Präparierbesteck*



Nach der Organentnahme wurden die Organe auf eine Korkscheibe gelegt, die in einer Petrischale mit einem Schlauch fixiert und mit den Nadeln befestigt wurde. Die Präzision und die Genauigkeit ist hier sehr wichtig und sehr oft wurde ein Stereomikroskop verwendet. Weiters wurden Pinzette, Spitzscheren und Federscheren verwendet.

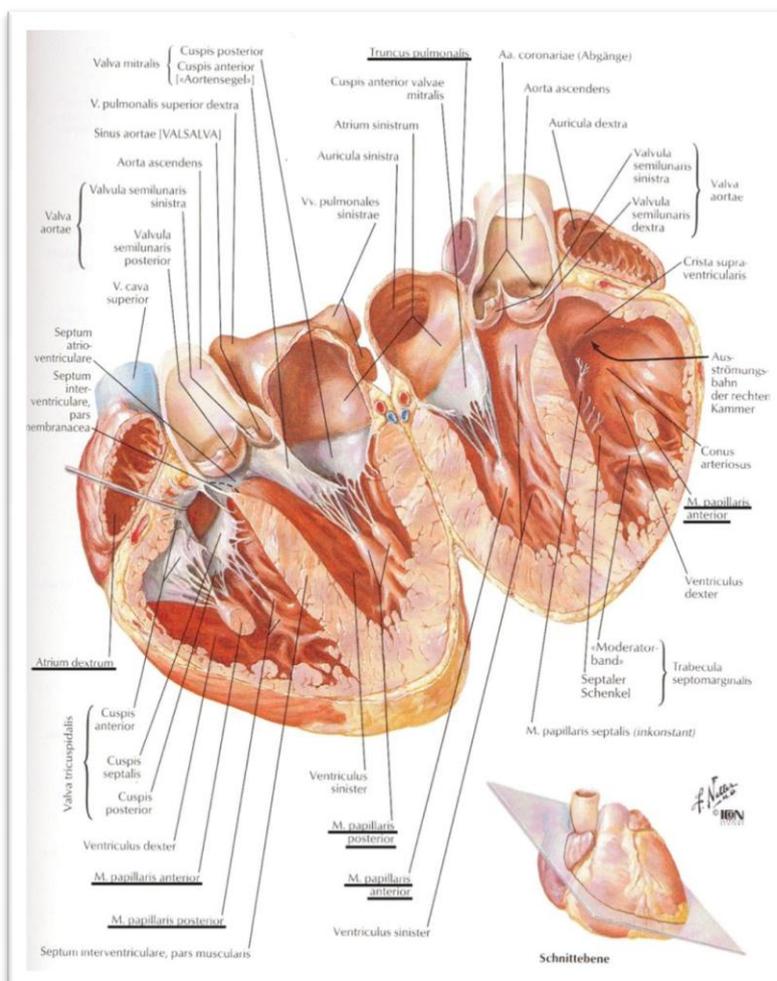
#### **3.4.2 Rechter Vorhof (Atrium dexter)**

Nach der Entnahme vom Herz, wurden umgebendes Fettgewebe und anhaftende Lungenfragmente entfernt. Dann wurde das Herz auf der Korkscheibe mit zwei Präpariernadeln befestigt. Dann wurde der Vorhof zusammen mit dem Sinusknoten, primärer Impulsgeber des Herzens, isoliert. Während der Isolierung muss man sehr sorgfältig sein, besonders beim Abbinden, weil die Überdehnung oder Gewebeverletzung die Folge sein kann. Hier wurden

zweifarbige Bindfäden verwendet, die Spitze vom Ende des Organs unterscheiden zu können. Unter die Spitze des Vorhofes machte man einen Knoten, fädelt ein Silberdrahthäkchen ein, und zur Sicherheit machte man noch einen zusätzlichen Knoten. Am Ende des Vorhofes wurde das gleiche Prinzip angewendet, dabei aber ein andersfarbiger Bindfaden verwendet.

Letztendlich wurde der Vorhof in einem begastem und mit Tyrodelösung befüllten Becherglas aufbewahrt. Zur Versuchsdurchführung wurde Apparatur II verwenden.

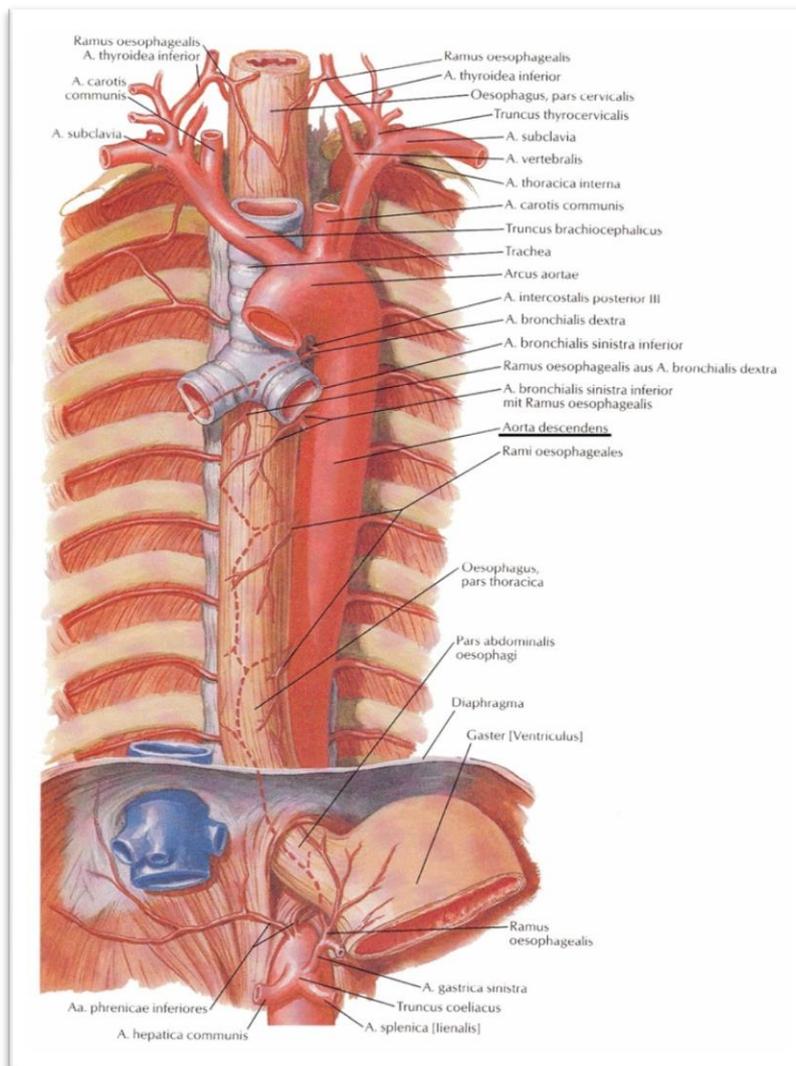
**Abbildung 5:** Ein Querschnitt durch das Herz( Netter FH 2003)



### 3.4.3 Absteigender Teil der Aorta (Aorta descendens)

Entlang des Rückgrates befindet sich der absteigende Teil der Aorta. Mit einer Pinzette wurde die Aorta vorsichtig weggezogen und mit einer Schere herausgeschnitten. Dann erfolgte die Präparation in einer Petrischale, die mit Nährlösung gefüllt und mit Oxymix versorgt wurde.

**Abbildung 6:** Aorta descendens-Verlauf (netter FH2003)



In einer Petrischale wurde die Aorta mit zwei Präpariernadeln befestigt und mit Hilfe einer Federschere wurden restliches Fettgewebe entfernt. Zuletzt wurden 2-3 cm lange Ringe geschnitten und in einer Apparatur eingespannt.

**Abbildung 7: Originalbild einer Aorta**



**3.4.5 Lungenarterie (*A. pulmonalis*)**

Die Arteria pulmonalis wurde aus der rechten Herzkammer isoliert. Man erhielt 2-3 Ringe, die in Apparatur I eingespannt wurden.

**3.4.6 Papillarmuskel (*Muskulus papillaris*)**

Aus dem Herzen wurde noch Papillarmuskel isoliert. Diese befinden sich in beiden Herzkammern. Die rechte Kammer wurde aufklappt und mit zwei Präpariernadeln befestigt. Die Befestigung von Silberdrahthäkchen ist ähnlich wie beim Vorhof. Zuletzt wurde das Organ unter ständiger Begasung in Elektrolytlösung aufbewahrt.

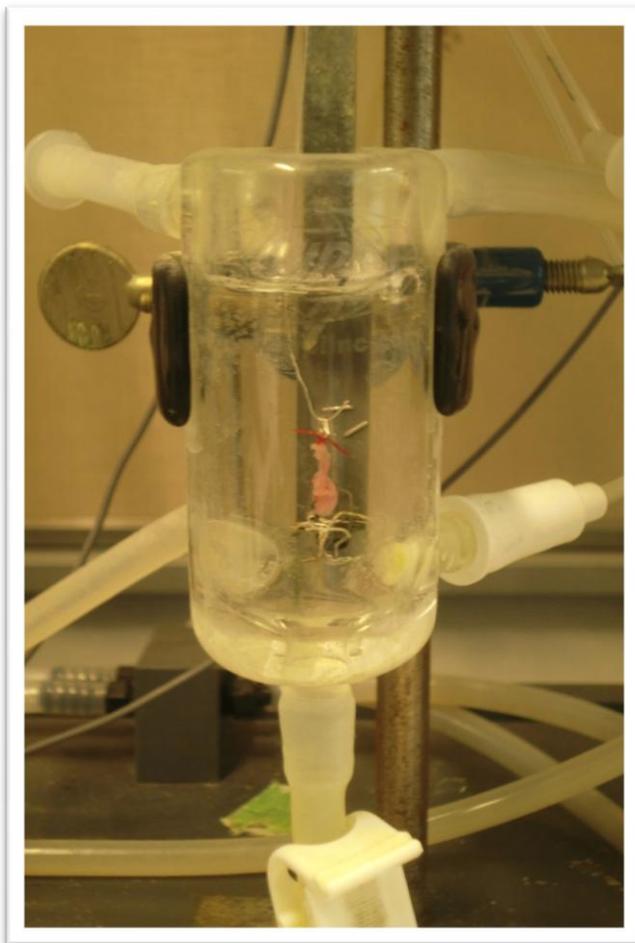
**3.4.7 Darm (*Terminales Ileum*)**

Als letztes wurde der Darm isoliert. Zuerst wurde einen Übergang zwischen Dickdarm und Dünndarm gesucht, um das terminale Ileum zu finden. Mit der Hand wurde der Dünndarm herausgezogen und in der Nähe des Caecums trennte man ein Ende des Darms ab. Die andere jejunale Seite wurde mit Bindfaden

markiert. Das isolierte Organ wurde in der Nährlösung unter Begasung aufbewahrt.

Dann erfolgte die Präparierung eines ca. 1cm langen schräg aufgeschnittenen Stücks des Darms in einer Präparierschale. Wieder wurden zwei Präpariernadeln zum Befestigung verwendet und an beiden Enden mit Bindfäden und Silberdrahthäkchen fixiert.

**Abbildung 8:** *Präpariertes Darmstück*



Damit die Substanz einwirken konnte, musste Darmlumen offen bleiben.

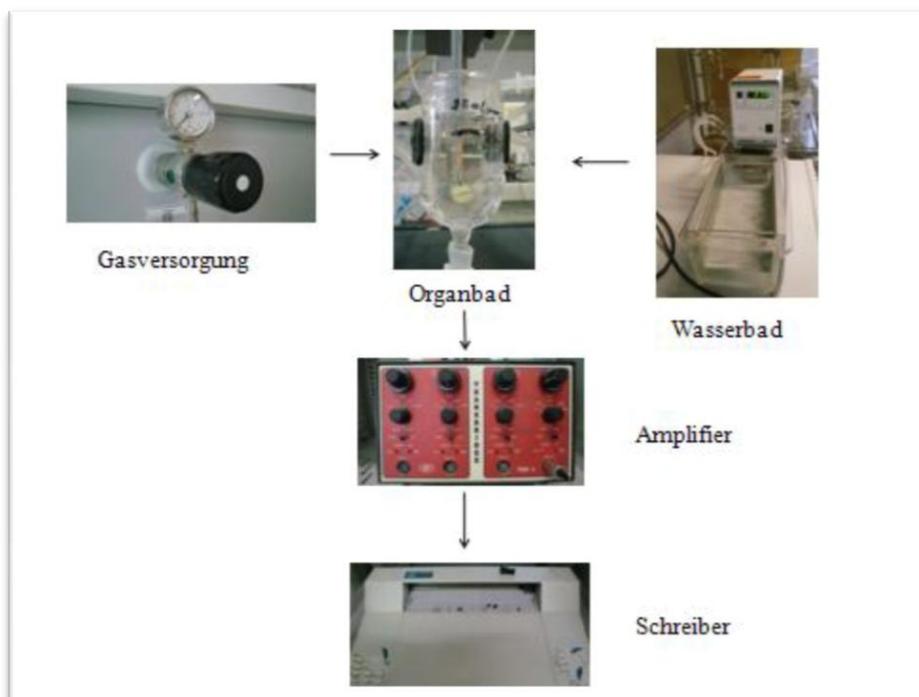
### 3.5 Versuchsordnung und Apparaturen

Die isolierten und präparierten Organe wurden mittels zwei verschiedenen Apparaturen untersucht. Sehr wichtig war es physiologische Bedingungen zu schaffen (entsprechender pH-Wert, O<sub>2</sub>-Versorgung und Temperatur).

Im Labor standen Apparatur I, die wegen spezifischen Fixierungsschemas, nur für Papillarmuskel und Apparatur II, die für Vorhof, Arteria pulmonalis, terminales Ileum und die Aorta verwendet wurden.

In beide Apparaturen wurden die Organpräparate mit einem Silberdraht eingespannt. Das Signal wurde durch einen Amplifier verstärkt und schlussendlich mit einem Schreiber auf einem Millimeterpapier registriert.

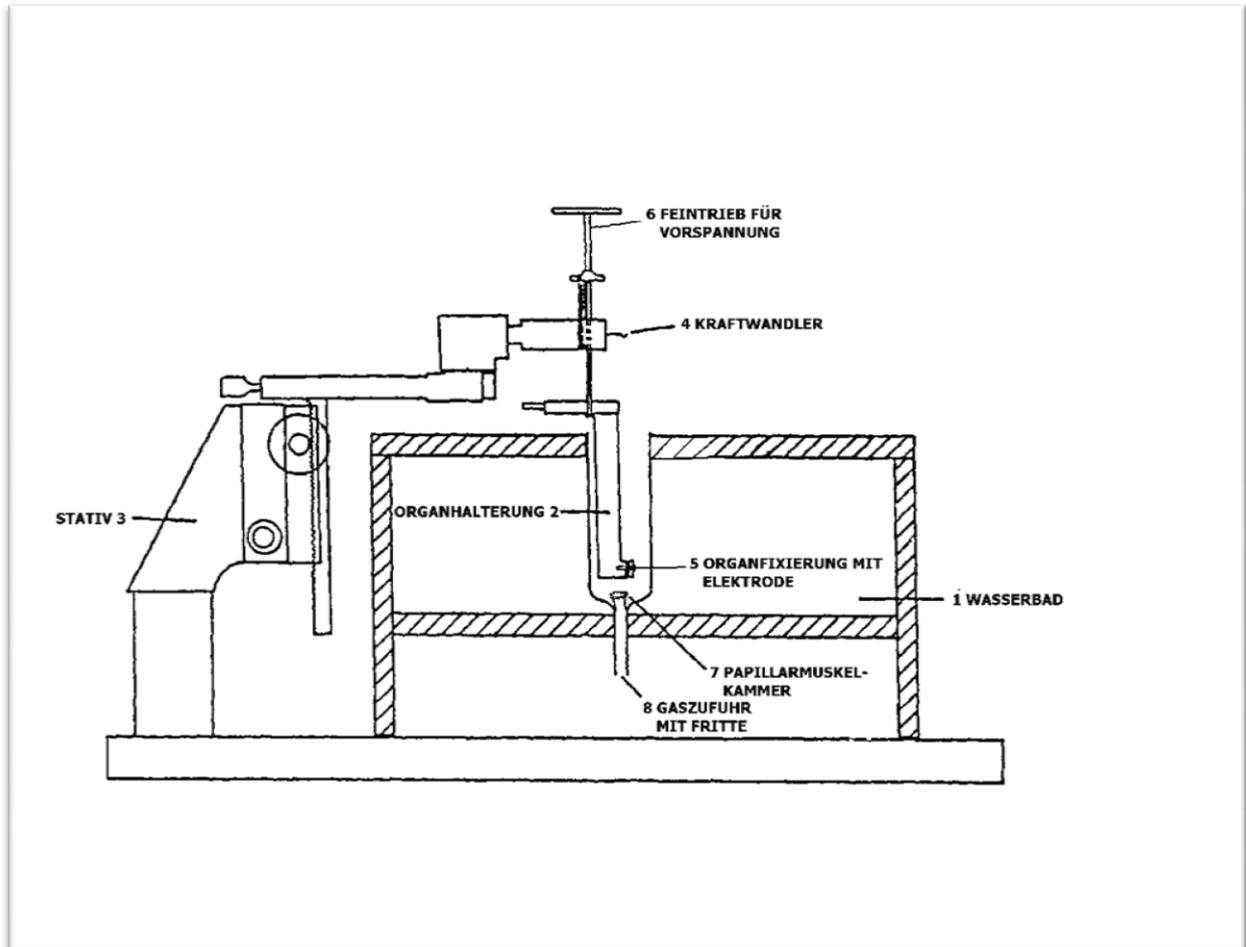
**Abbildung 9:** *Versuchsordnung*



### 3.5.1 Apparatur I

In dieser Apparatur wurde die Kontraktionskraft getestet.

**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der Versuchsapparatur I:

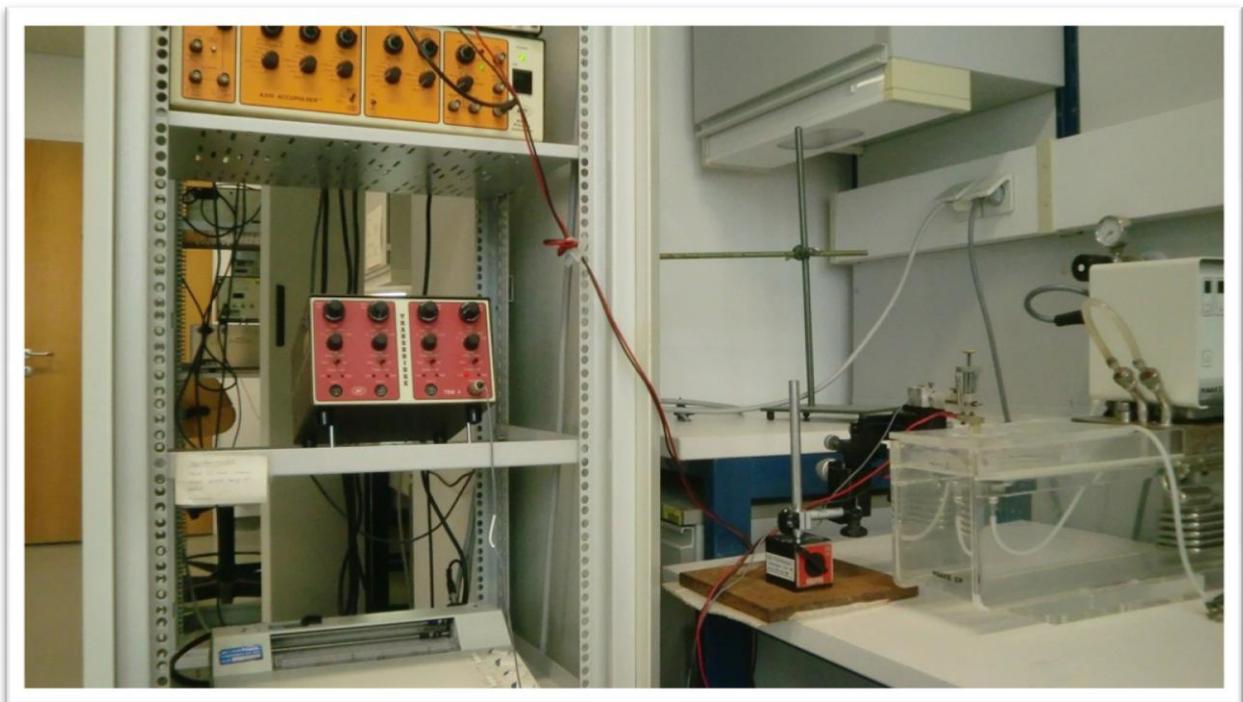


Diese Apparatur bestand aus einem Wasserbad, welches bis zur Markierung mit Wasser gefüllt wurde. Das Wasserbad muss auf  $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  beheizt werden. Der Deckel des Wasserbades bestand aus einer Muskelkammer, an deren Ende eine Glasfritte fixiert wurde. Die Aufgabe der Fritten war es, die Kammer ständig mit dem Gas zu versorgen. Das Volumen des Organbades beträgt 25ml. Es wurde mit 25ml Tyrodelösung gefüllt und man wartete ca. 10 min bis die Temperatur konstant wurde. Weiters bestand die Apparatur aus einem Stativ, an

welchen eine Organhalterung angehackt wurde. Ein Teil der Organhalterung war ein Silberdraht, an dem ein Häkchen mit dem präpariertem Papillarmuskels befestigt wurde. Der freie Teil des Papillarmuskels wurde zwischen Elektrode und eine Plastikplättchen mit einem Schraubenzieher fixiert und vorsichtig eingequetscht.

Über den Silberdraht wurde Papillarmuskel mit einem Kraftwandler verbunden. Mit Hilfe eines Stativs war es möglich, die Organhalterung in die Papillarmuskelkammer eintauchen. Wichtig war, dass das Organ vollständig mit der Nährlösung bedeckt wurde. Der Papillarmuskel wurde zusätzlich mit einem externen Stimulator ( Model Isostim 301T, WPI, Hamden, CT, USA) gereizt.

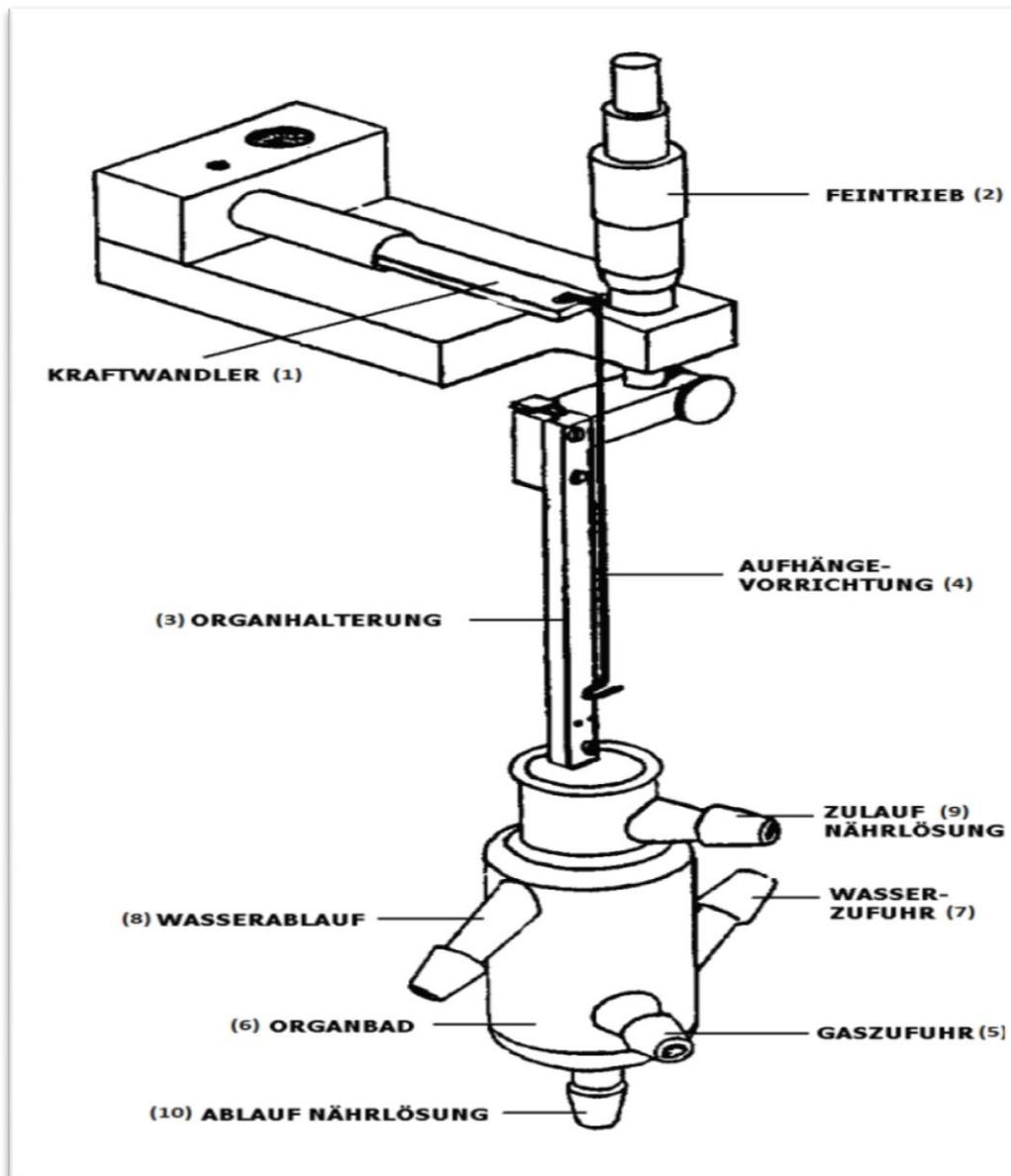
**Abbildung 11:** *Originalabbildung der Apparatur I*



### 3.5.2 Versuchsanordnung II

Diese Apparatur wurde zur Messung der Kontraktionskraft von Aorta descendens, Arteria pulmonalis, Atrium cordis dexter sowie terminales Ileum verwendet.

**Abbildung 12:** Schematische Darstellung der Apparatur I



Zur Organbefestigung wurden hier zwei Silberdrähte verwendet. Aorta descendens und Arteria pulmonalis wurden ohne Häkchen zwischen zwei Drähten eingespannt.

Das terminale Ileum und das Atrium dexter wurden mit Hilfe von Silberdrahthäkchen (Siehe Kapitel 3.4.2 und 3.4.7) fixiert. Dann wurde die Organhalterung in das Organbad gesenkt. Das Organbad wurde zuerst mit Tyrodelösung befüllt und ständig mit Carbogen begast. Man unterscheidet zwischen zwei Fassungsvermögen, eines für 8 ml und eines für 25 ml Nährlösung. Die Wasserbadtemperatur betrug  $37 \pm 1$  °C. Weiter hatte man einen unterscheidet man Feinbetrieb, der eine Vorspannung ermöglichte, die auf das jeweilige Organ abgestimmt war.

**Abbildung 13:** *Originalabbildung der Apparatur II*



### 3.5.3 Gaszufuhr

Die Präparate mussten ständig begast werden. Zuerst wurde Tyrode 20 min lang mit Gas (Oxymix) begast, um die Organe gleich nach der Isolierung ausreichend mit Sauerstoff zu versorgt werden. Mit einem physiologischen pH-Wert von 7,2 aufrecht zu erhalten.

Die Intensität der Gaszufuhr wurde mit Schraubklemmen reguliert.

**Abbildung 14:** Originalabbildung der Gaszufuhr



### 3.5.4 Wasserbad

Die Aufgabe des Wasserbades bei beiden Apparaturen war es, eine konstante Temperatur, die durch ein Thermostat reguliert wurde, zu gewährleisten.

Bei Aorta descendens, Arteria pulmonalis, Atrium cordis dextrum und terminales Ileum (siehe Kapitel 3.5.2) wurde eine Temperatur von  $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  konstant gehalten, während bei Musculus papillaris (siehe Kapitel 3.5.1) eine Temperatur  $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  nötig war.

**Abbildung 15:** Wasserbad



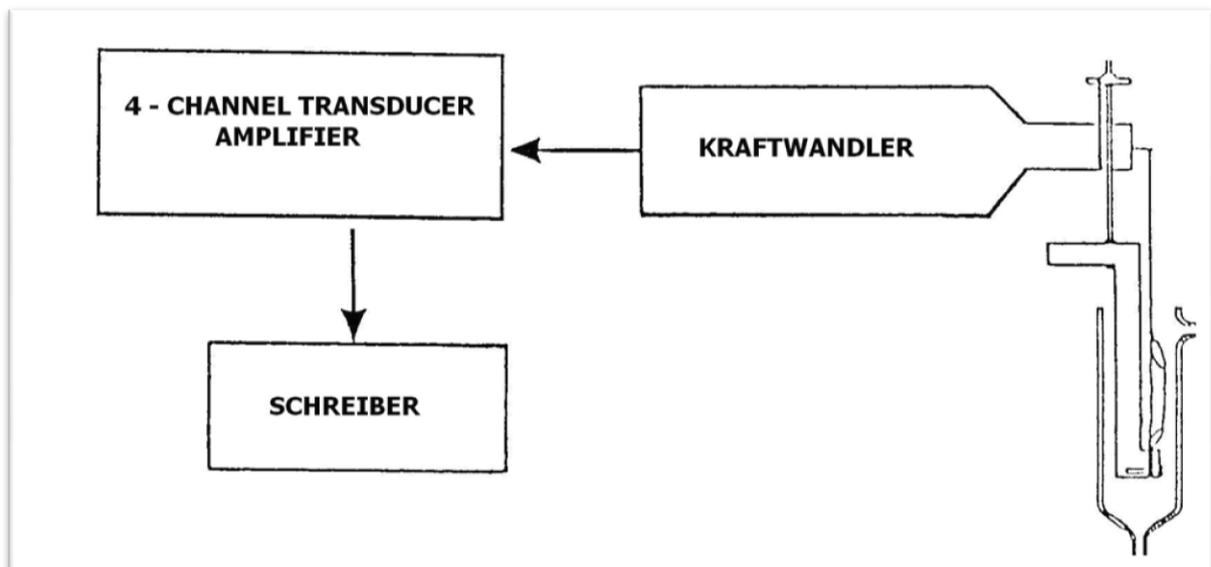
### 3.5.5 Kraftwandler, Verstärker und Schreiber

Der Kraftwandler wurde benötigt um ein messbares Ergebnis zu erzielen. Bei beiden Apparaturen wurde die Organhalterung über Silberdrähte mit dem Kraftwandler verbunden.

Der Kraftwandler oder „Force Transducer“ (Transbridge™, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) ermöglicht eine Umwandlung von mechanischen Kraft in eine elektrische Größe. Es kam zu einer Widerstandsänderung durch Kontraktion oder Spasmolyse am Dehnungsstreifen.

Zur Verstärkung des Stromflusses wurde ein Verstärker (4-Chanel Transducer Amplifier, WPI) verwendet. Und letztendlich wurden Ergebnisse mit einem „Flatbed Recorder“ (BD 112 Dual Channel, Kipp & Zonen, Netherlands) aufgezeichnet.

**Abbildung 16:** Kraftwandler



**Abbildung 17:** Originalabbildung eines „Transbridge™“ 4-Channel Transducer Amplifiers



**Abbildung 18:** Originalabbildung eines Flatbed Recorder BD 112 Dual Channel



### **3.6 Versuchsdurchführung**

Im folgenden Kapitel werden die Details der Versuchsdurchführung an isolierten Organen beschrieben. Jeden Morgen wurde sichergestellt, ob alle Organbäder sauber waren. Die Reinigung erfolgte zuerst gründlich mit 0,1N HCl und dann spülte man 2-3 Mal mit destilliertem Wasser durch und anschließend mit der hergestellten Tyrodelösung. Nach der Reinigung wurden die Bäder mit Nährlösung befüllt.

Um aussagekräftige Ergebnisse zu ermöglichen, wäre es nötig, die Testung mehrmals durchzuführen.

#### **3.6.1 Versuchsablauf bei Atrium cortis dexter**

Um die Wirkung der Testsubstanz SWS 92 HCl auf Schlagfrequenz des Atrium cortis dexter zu untersuchen, wurde Apparatur II verwendet. Gemäß der Beschreibung in Kapitel 3.4.2 wurde der rechte Vorhof aus dem Herz entnommen und präpariert und in die Apparatur II eingespannt. Der Teil des Vorhofes, wo man noch etwas Fettgewebe erkennen konnte, wurde an die obere Halterung gehängt. Man musste aufpassen, dass das Organ nicht zu stark gedehnt wurde, um die Autonomie des Sinusknoten nicht zu gefährden.

Das so befestigte Organ wurde in ein mit 25 ml Tyrodelösung gefülltes und auf  $37 \pm 1$  °C temperiertes, begastes Organbad eingetaucht.

Hier war keine elektrische Reizung nötig, weil der Vorhof die Fähigkeit besitzt, sich selbst zu erregen.

Als nächsten Schritt wurden der Schreiber und der Verstärker eingeschaltet und mit Feinbetrieb eine Vorspannung auf 10,4 mN bei einer Stromstärke von 5 mV und Schreibergeschwindigkeit von 5 mm/sec angelegt. Nach ca. 20 Minuten Gewöhnungsphase, musste man mindestens 45 Minuten eine Kontrolle machen

bis eine konstante Schlagfrequenz vorliegt. Mit Hilfe „Pen down“ und „record on“ Knopf konnte man die Schlagfrequenz auf dem Millimeterpapier registrieren. Die Aufzeichnung wurde alle 5 Minuten durchgeführt und dauerte ungefähr 12 Sekunden, was 6 Kästchen auf dem Millimeterpapier entspricht. Wenn eine konstante Schlagfrequenz, nach 2-3 Messungen, erreicht wurde, konnte man die erste Wirkstoffkonzentration einspritzen. Gemäß eines Pipettierschemas (Tabelle 2) wurde alle 45 Minuten mit Hilfe einer Kolbenhubpipette die nächste Konzentration von der Testsubstanz eingespritzt. Mit Hilfe eines Schreibers werden die Ergebnisse registriert. Dieser Versuch wurde so lange durchgeführt, bis eine Endkonzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  erreicht.

### *3.6.2 Versuchsablauf bei Aorta descendens*

Von einer isolierten Aorta bekam man ungefähr 6-7 kleine Aortenringe. Und diese Aortenringe wurden direkt zwischen oberen und unteren Silberdraht in der Aufhängeanrichtung der Apparatur II eingespannt. Sehr wichtig war es, diese nicht zu überdehnen. In ein mit Elektrolytlösung gefülltem und mit Carbogen begastem Organbad tauchte man mit Hilfe einer Stativschlittens die Organhalterung hinein.

Der Amplifier und der Schreiber wurden in Betrieb genommen und auf Nullpunkt positioniert. Für diesen Versuch war eine Vorspannung von 19,6 mN mit einer Stromstärke von 10 mV notwendig. Nach einer 20 minütigen Anpassungszeit, schaltete man auf 5 mV um und mit dem Feintrieb wurde der Schreiber wieder auf den Nullpunkt zurückgesetzt. Die Nährlösung aus dem Wasserbad wurde ausgelassen und in der Abhängigkeit von der Größe des Organbades durch 8 ml oder 25 ml eine KCl-Lösung ersetzt.

Jedes Mal wurde Kaliumchloridlösung frisch zubereitet. Es wurde 0,67 g KCl in 100ml Nährlösung aufgelöst. Die Konzentration der KCl-Lösung betrug 90mmol/l. Die Zugabe von der Kaliumchloridlösung führte zu einer Kontraktion der Aorta, was war durch ein rasches Ausschlagen des Schreibers nach links erkennbar. Nach ungefähr 45 Minuten stellt sich eine Plateuphase ein und man konnte erste Konzentration von dem Wirkstoff einspritzen. Das wurde als Referenzwert verwendet. Folgende Konzentrationen wurden in Intervallen von 45 Minuten dazu pipettiert mit dem Ziel eine gefäßerweiternde Wirkung von der Substanz festzustellen.

### ***3.6.3 Versuchsablauf bei Arteria pulmonalis***

Die Versuchsanordnung *der* Arteria pulmonalis wurde analog zu jenen der Aorta descendens durchgeführt. Der Einzige Unterschied bestand darin, dass hier die Vorspannung die ganze Zeit nicht auf 10 mV (=19,6 mN) sondern auf 5mV(=9,81mN) eingestellt war.

### ***3.6.4 Versuchsablauf bei Ileum terminalis***

Für das isolierte Ileumstück (siehe Kapitel 3.4.7) wurde die Apparatur II verwendet. Am oberen und unteren Teil des Darmstückes wurden zwei Silberdrahthäkchen eingefädelt. Das Präparat wurde in die Apparatur eingehängt und in ein mit Nährlösung gefülltes und begastes Organbad abgesenkt.

Der Schreiber und der Verstärker wurden eingeschaltet und eine Vorspannung von 4,92 mN bei Stromstärke 5 mV eingestellt. Durch die Vorspannung erreichte man gleiche Bedingungen für alle Versuche, was eine wichtige Rolle bei der Reproduzierbarkeit spielt.

Nach einer 20 minütigen Gewöhnungszeit, ließ man die Nährlösung aus und füllte des Organbad mit 25 ml Kaliumchloridlösung. Die Konzentration betrug 60 mmol/l, was eine Einwaage von 0,45 g KCl in 100 ml Tyrodelösung entsprach.

Die KCl- Lösung Zugabe erzielte eine starke und schnelle Kontraktion, die aber schon nach kurzer Zeit nachließ und wieder langsam anstieg.

Nach ungefähr 45-60 Minuten Wartezeit, stellte sich eine Plateuphase ein. Nun konnte man wie bei anderen Organen mit der kumulativen Zugabe von der Testsubstanz SWS92 HCL begonnen. Das Ziel dieser Versuch war es, eine spasmodische Aktivität des Darmes festzustellen.

### *3.6.5 Versuchsablauf bei Musculus papillaris*

Das isolierte Versuchsorgan konnte ausschließlich in der Apparatur I (siehe 3.5.1) untersucht werden. Hier wurde Auswirkung der Testsubstanz SWS 92 HCL auf Kontraktionskraft getestet. Das Präparat wurde mit Organhalterung in begaste und mit Nährlösung befüllte Muskelkammer eingebracht. Nach dem der Schreiber und der Verstärker aktiviert worden waren, erfolgte eine Vorspannung auf 3,92 mN. Man musste aufpassen, den Pappilarmuskel nicht zu überdehnen. Während des gesamten Versuches wurde eine konstante Spannung gehalten werden, weil ein Spannungsabfall eine Inotropieverringeringung verursacht hätte (Reiter 1967).

Der Papillarmuskel musste durch die elektrische Impulse mittels eines Accupulsers A310 (World Precision Instrument, FL, USA) gereizt werden. Die dadurch bewachte Kontraktion wurde mit dem Schreiber aufgezeichnet.

Die Stimulation der Papillarmuskel erfolgte nach eine 30-minütigen Gewöhnungszeit mit Rechteckimpulsen mit einer Frequenz von 1Hz.

Die Reizstärke wurde über eine Isolation Unit so lange erhöht bis der Muskel zu kontrahieren begann. Danach erhöhte man noch die Reizstärke um 10%. Bei größerer Erhöhung würde aus den Speichergranula Adrenalin und Noradrenalin freigesetzt, was zu einer Abnahme von der Kontraktionsamplitude zur Folge hat und zu den verfälschten Ergebnissen führen könnte (Fuchgott et al. 1959).

Danach erfolgte eine 45-minütige Kontrollphase, indem in einem Intervall von 5 Minuten circa 6-7 Kontraktionsamplituden zu Papier gebracht wurden. Nun maß man mit einem Lineal die Amplitudenlänge. Und sobald eine konstante Amplitudenlänge erreicht wurde, konnte man mit kumulativer Zugabe der Testsubstanz begonnen werden. Weitere Zugaben folgten in 45 Minutenintervallen. Am Ende jedes Konzentrationsintervall stellte man Speed auf 20 mm/s ein, um die Amplituden leichter zu messen.

### ***3.7 Auswertung und Statistik***

#### ***3.7.1 Atrium cordis dexter***

Bei diesem Versuchsorgan wurde die Änderung der Schlagfrequenz oder Chronotropie gemessen. Die Schlagfrequenz wurde mittels eines Schreibers alle 5 Minuten 6 Kästchen am Millimeterpapier aufgezeichnet. Um die Anzahl der Schläge pro Minute zu errechnen, musste man die Schlaganzahl der sechs Kästchen mit fünf multiplizieren.

Letzte Kontrollmessung wurde als Referenzwert verwendet. Mit diesem Wert konnte man folgende Konzentrationen vergleichen. Aufgrund der Erhöhung oder Verringerung dieses Wertes konnte eine positive oder negative Chronotropie festgestellt werden.

#### ***3.7.2 Aorta descendens, Arteria pulmonalis, terminales Ileum***

Bei vorliegenden Versuchen bzw. bei Aorta descendens und Arteria pulmonalis wurde eine dilatierende und bei dem terminalen Ileum eine spasmolytische Wirkung untersucht. Hier wurde zuerst chemisch mit Kaliumchloridlösung eine maximale Kontraktion ausgelöst (siehe Kapitel 3.6) und mit dem Schreiber eine Konzentrationskurve aufgezeichnet. Nach der die Plateuphase erreicht wurde, darf man die erste Konzentration von der Testsubstanz SWS 92 HCl einspritzen. Durch eine Markierung grenzte man den Abstand von Nulllinie zu den Messpunkten bzw. die Plateuphase ab. Die Plateuphase galt als 100 %-Wert und die erste erhaltene Wert als Kontrollwert. Nach einer Pipettierschema (Tabelle 2) wurde zuerst 1 µl ins Organbad pipettiert und nach 45 Minuten folgte die 2 µl Injektion. Die markierten Stellen wurden mittels eines Lineals abgemessen und mit einem Eichfaktor multipliziert. 1 cm entsprach 0,98 mN.

Wurden die Messungen mit einer Spannung von 2 mV oder 10 mV durchgeführt, waren die Werte mit 0,2 multipliziert.

Aus der entstandenen Konzentrations-Wirkungskurve konnte man einen  $EC_{50}$  Wert ermitteln.

### 3.7.3 *Musculus papillaris*

Bei den Versuchen am *Musculus papillaris* wurde eine Inotropie bzw. Änderung der Kontraktionskraft getestet.

Hier wurden alle 5 Minuten Aufzeichnungen gemacht und in einem Abstand von 45 Minuten weitere Konzentrationen eingespritzt. Aus den aufgezeichneten Amplituden wurde die Inotropie dadurch ermittelt, dass man mit einem Lineal die Länge von den Amplituden maß und abhängig von verwendeter Stromstärke mit einem Eichfaktor multipliziert. Die meisten Versuche wurden bei 2 mV durchgeführt und mit einem Eichfaktor 0,2 multipliziert. Aber wenn man eine Spannung von 5 mV verwendete, dann multiplizierte man mit 0,98.

Aus der Durchschnittslänge von der Kontrollwert, stellte man einen Referenzwert dar, der als 100 % angenommen wurde. Die Amplituden von anderen Konzentrationen wurden mit diesem Kontrollwert verglichen und anhand der Längenveränderung der Amplituden konnte man auf eine negative oder positive Inotropie rückschließen.

### 3.7.4 Statistik

Die Testsubstanz SWS 92 HCl wurde in destilliertem Wasser gelöst. Destilliertes Wasser hatte keinen Einfluss auf die Ergebnisse und musste nicht berücksichtigt werden.

Mit dem Computerprogramm „Sigma Plot 9.0“ wurde es möglich die arithmetischen Mittelwert und der Standardfehler der Mittelwerte zu bestimmen. Diese Werte wurden in einer Konzentrationskurve graphisch dargestellt, aus den  $EC_{50}$ -Werte abgelesen wurden hatten.

Den  $EC_{50}$ -Wert stellt jene effektive Konzentration von SWS 92 HCl in  $\mu\text{mol/l}$  dar, bei der die Inotropie (Kontraktionskraft) bzw. Chronotropie (Schlagfrequenz) auf die Hälfte des Kontrollwertes abgefallen war.

Am Ende erfolgte ein Signifikanztest oder Student-t-Test für gepaarte Beobachtungen. Wenn eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % ( $P < 0,05$ ) bzw. 1% ( $P < 0,01$ ) wurden die Messergebnisse als signifikant bezeichnet. Die Messergebnisse die Irrtumswahrscheinlichkeit weniger als 0,1 % ( $P < 0,01$ ) betrug, wurden als hochsignifikant bezeichnet

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der Testsubstanz SWS 92 HCL

#### 4.1.2 Wirkung von SWS 92 HCl auf den Atrium cordis dexter

Bei diesem Versuch wurde die chronotrope Wirkung von Testsubstanz SWS 92.HCl am spontan schlagenden Atrium cordis dexter untersucht.

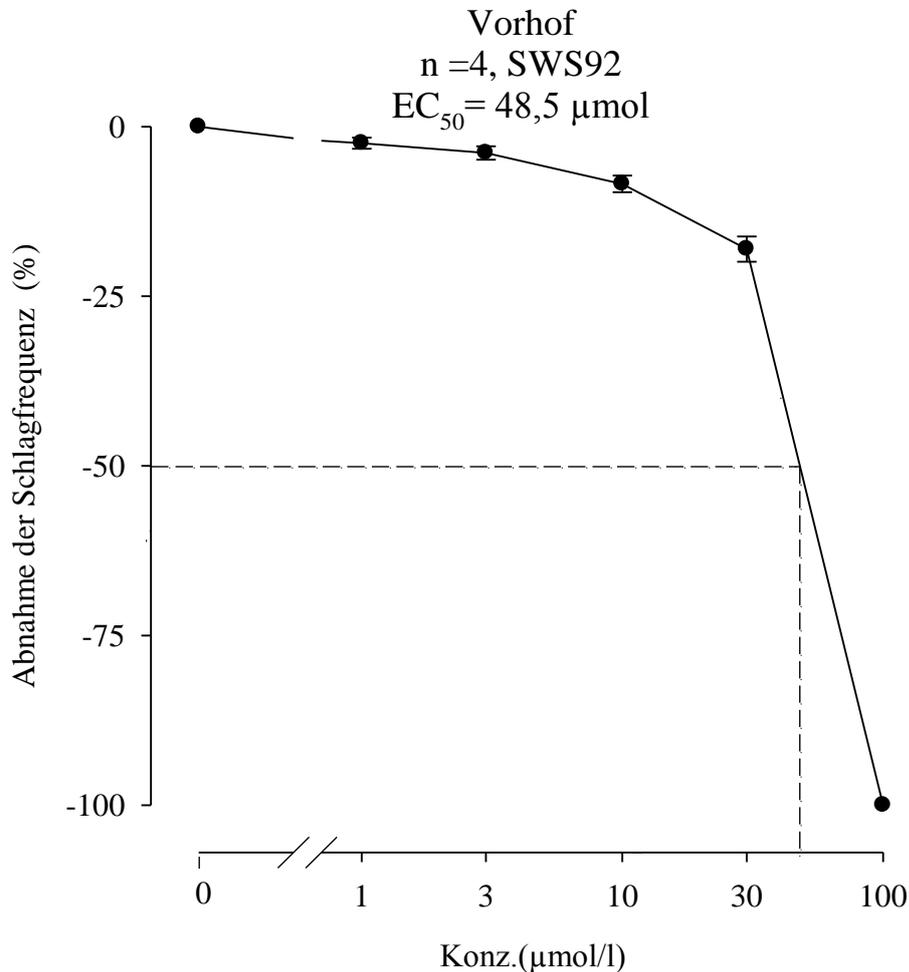
**Tabelle 4:** Die Wirkung von SWS92.HCl auf den rechten Vorhof

<i>SWS 92. HCl (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</i>	<i><math>f \pm \text{SEM}</math> (x/min)</i>	<i><math>f \pm \text{SEM}</math> (%)</i>	<i>Versuchszahl</i>	<i>Irrtums- Wahrscheinlichkei t (P)</i>
Kontrolle	231,25 $\pm$ 21,63	0,00 $\pm$ 0,00	4	-
1	225,00 $\pm$ 19,25	-2,45 $\pm$ 0,82	4	n.s
3	221,25 $\pm$ 19,40	-3,88 $\pm$ 0,98	4	n.s
10	212,50 $\pm$ 19,41	-8,44 $\pm$ 1,24	4	n.s
30	188,75 $\pm$ 15,86	-18,06 $\pm$ 1,86	4	0,05
100	0,00 $\pm$ 0,00	-100 $\pm$ 0,00	4	0,001

Legende zu Tabelle 4:

Auf der Tabelle 4 sind die arithmetischen Mittelwerte (f) des Sinusknotens pro Minute inklusive Standardfehlern (SEM) zu erkennen. Zusätzlich ist die Irrtumswahrscheinlichkeit dargestellt. Insgesamt wurden vier Versuche durchgeführt.

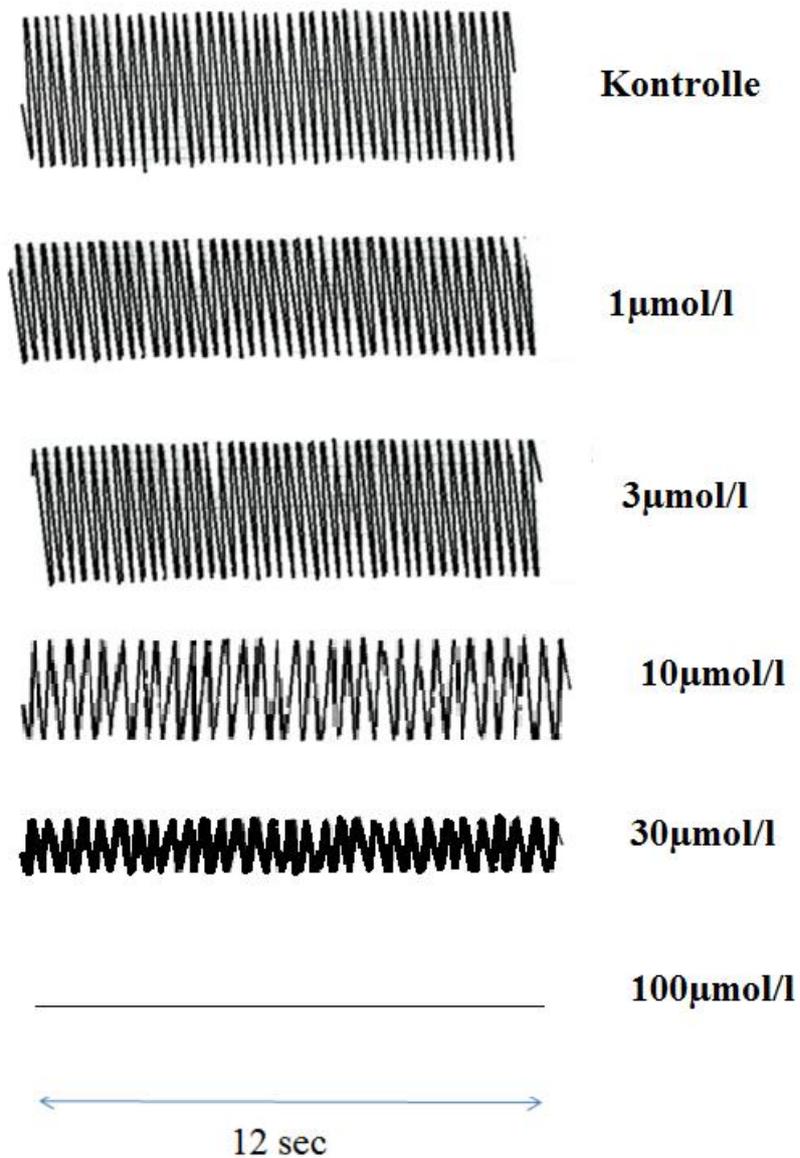
**Abbildung 19:** Konzentrations-Wirkungskurve von SWS92.HCl am Atrium cordis dexter



Legende zur Abbildung 19:

Anhand dieser Konzentrations-Wirkungskurve wurde die negativ chronotrope Wirkung der Testsubstanz SWS 92. HCl am Atrium cordis dexter dargestellt. Auf x-Achse ist die Konzentration in µmol/l zu erkennen und auf y-Achse die Abnahme der Schläge pro Minute. Durch die Punkte wurde der arithmetische Mittelwert und durch die Balken der jeweilige Standardfehler dargestellt. Der EC<sub>50</sub>-Wert beträgt 48,5 µmol/l.

**Abbildung 20:** Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS 92.HCl auf den rechten Vorhof



Legende zu Abbildung 20:

Die vorliegende Abbildung zeigt die Anzahl der Schläge pro 6 Kästchen bei verschiedenen Konzentrationen von der Testsubstanz SWS 92.HCl in Intervallen von 45 Minuten. Nach Zugabe von 100 µmol/l kam es zu einem Stillstand des Vorhofes.

4.1.2 Wirkung von SWS 92. HCl auf die Aorta descendens

Hier wurden auch vier Versuche durchgeführt, um eine dilatierende Wirkung von SWS92 HCl auf die Aorta descendens getestet zu werden.

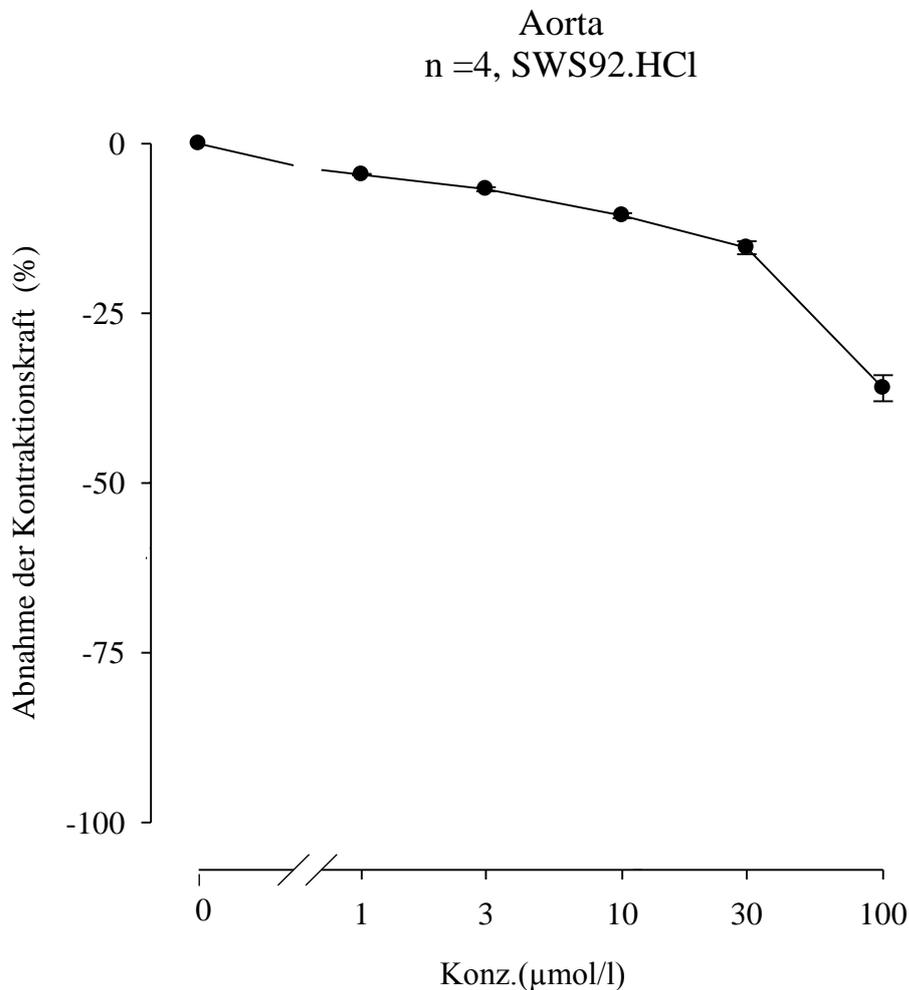
**Tabelle 5:** Wirkung von SWS 92. HCl auf die Aorta descendens

<i>SWS 92.HCl (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</i>	<i><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</i>	<i><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (%)</i>	<i>Versuchsanzahl</i>	<i>Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)</i>
Kontrolle	11,65 $\pm$ 1,43	0,00 $\pm$ 0,00	4	-
1	10,95 $\pm$ 1,50	-4,58 $\pm$ 0,10	4	n.s
3	10,87 $\pm$ 1,36	-6,71 $\pm$ 0,30	4	n.s
10	10,42 $\pm$ 1,31	-10,61 $\pm$ 0,37	4	0.05
30	9,85 $\pm$ 1,20	-15,34 $\pm$ 0,96	4	0,05
100	7,46 $\pm$ 0,61	-36,02 $\pm$ 1,92	4	0,01

Legende zu Tabelle 5:

Bezeichnung  $f_c$  stellt arithmetischen Mittelwert der Kontraktionskraft und Standardfehler (SEM) dar. Es wird sowohl in mN als auch in % berechnet.

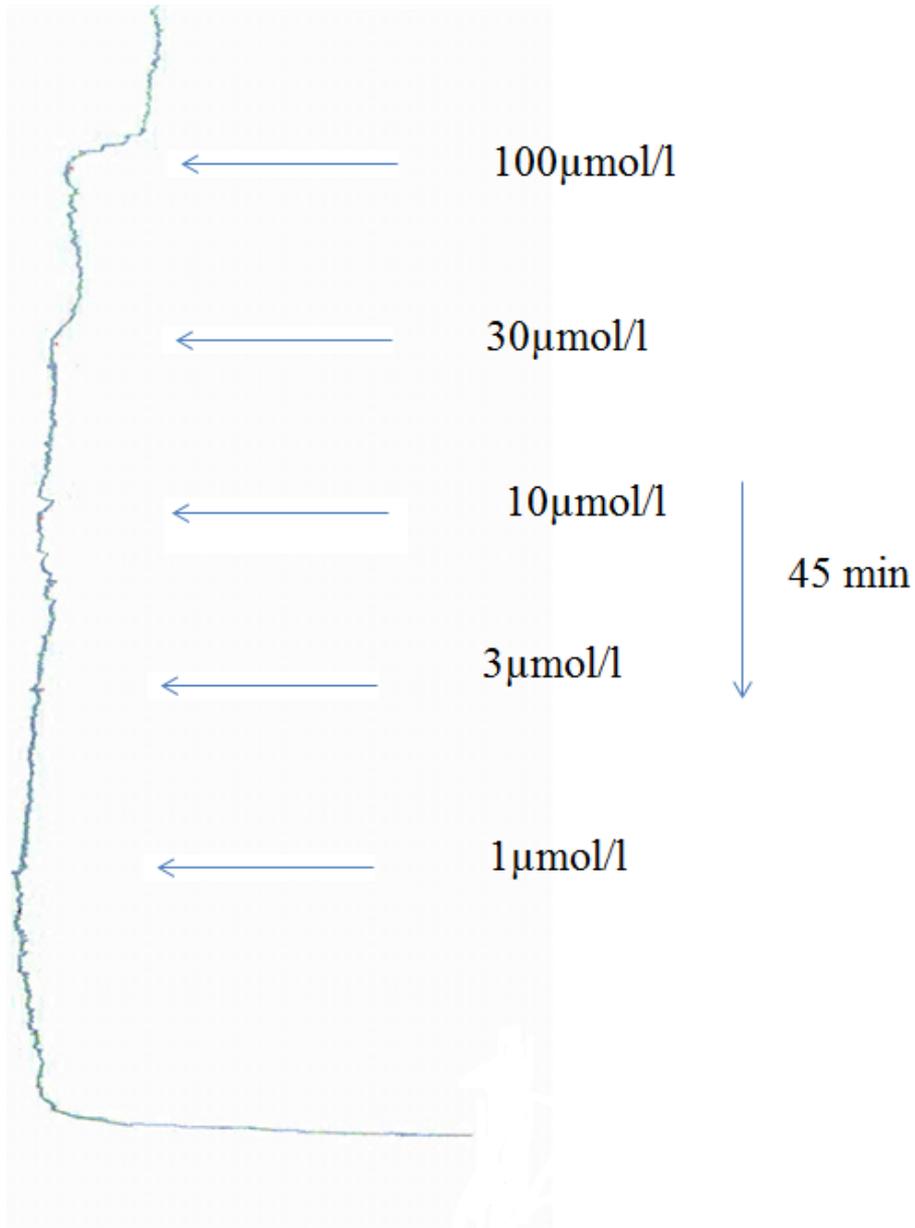
**Abbildung 21:** Konzentrations- Wirkungskurve von SWS 92.HCl an der Aorta descendens



Legende zu Abbildung 21:

Auf dieser Abbildung wurde eine schwache spasmolytische Wirkung festgestellt. Auf x-Achse ist die Konzentration in  $\mu\text{mol/l}$  zu erkennen und auf y-Achse die Abnahme der Schläge pro Minute. Durch die Punkte wurde der arithmetische Mittelwert und durch die Balken der jeweilige Standardfehler dargestellt. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert konnte nicht erreicht werden.

**Abbildung 22:** Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS92.HCl auf die Aorta descendens



Legende zu

Abbildung 22:

An dieser Graphik ist nur sehr schwache dilatierende Wirkung zu erkennen.

Auch durch eine Konzentration von 100 μmol/l, war keine Dilatation erkennbar.

4.1.3 Wirkung von SWS 92.HCl auf den Musculus papillaris

Um eine negativ inotrope Wirkung von der Testsubstanz SWS92.HCl auf den Musculus papillaris feststellen zu können, wurden vier Versuche durchgeführt.

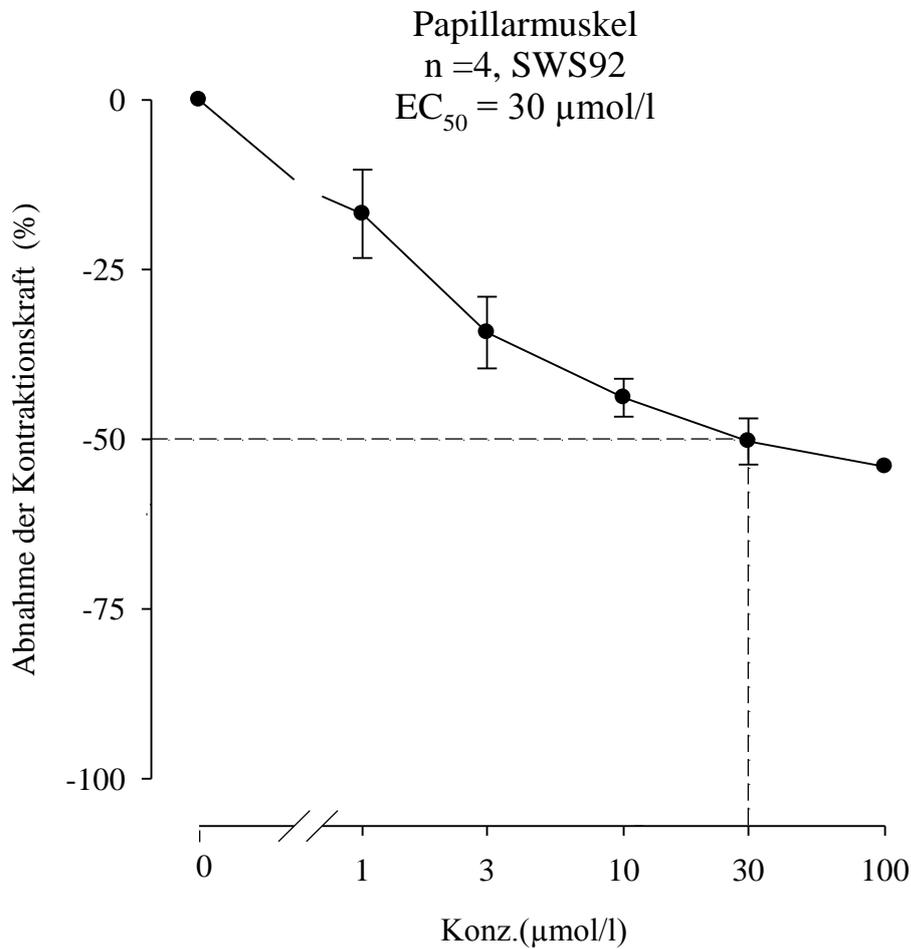
**Tabelle 11:** Wirkung von SWS 92.HCl auf den Muscuus papillaris

<i>SWS92.HCl (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</i>	<i><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</i>	<i><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (%)</i>	<i>Versuchsanzahl</i>	<i>Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)</i>
Kontrolle	1.87 ± 0,11	0,00 ± 0,00	4	-
1	1,59 ± 0,18	-16,8 ± 6,51	4	0,05
3	1,26 ± 0,13	-34,28 ± 5,27	4	0,05
10	1,04 ± 0,11	-43,88 ± 2,79	4	0,01
30	0,93 ± 0,07	-50,32 ± 3,40	4	0,01
100	0,86 ± 0,04	-54,05 ± 0,00	4	0,01

Legende zu Tabelle 11:

In die Tabelle 11 sind die arithmetischen Mittelwerte ( $f_c$ ) und die Standardfehlern (SEM) in mN sowie in % angegeben.

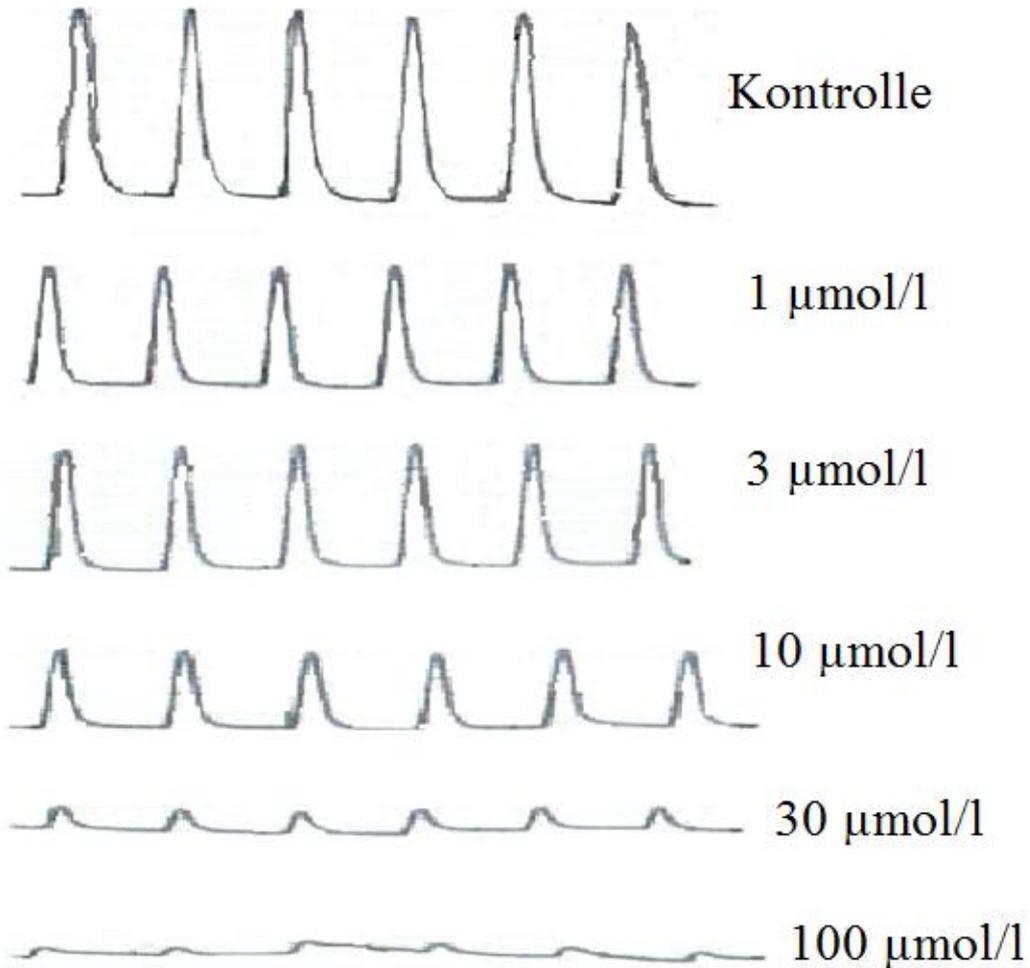
**Abbildung 23:** Konzentrations-Wirkungskurve von SWS 92.HCl auf den Musculus papillaris



Legende zur Abbildung 23:

Anhand dieser Graphik ist eine negativ inotrope Wirkung zu erkennen. Auf x-Achse wurde die Konzentration in µmol/l und auf y-Achse wurde eine Abnahme der Kontraktionskraft im Prozent dargestellt.

**Abbildung 24:** Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS 92.HCl auf dem Musculus papillaris



Legende zu Abbildung 24:

Mit Hilfe eines Schreibers kann man eine negativ inotrope Wirkung der Substanz SWS92.HCl auf Papillarmuskel zu erkennen.

4.2.4 Wirkung von SWS92.HCl auf die Arteria pulmonalis

Auch bei diesem Versuch wurden vier Versuchsreihen durchgeführt, um eine Wirkung von Substanz SWS92.HCl auf die Pulmonalarterie zu testen.

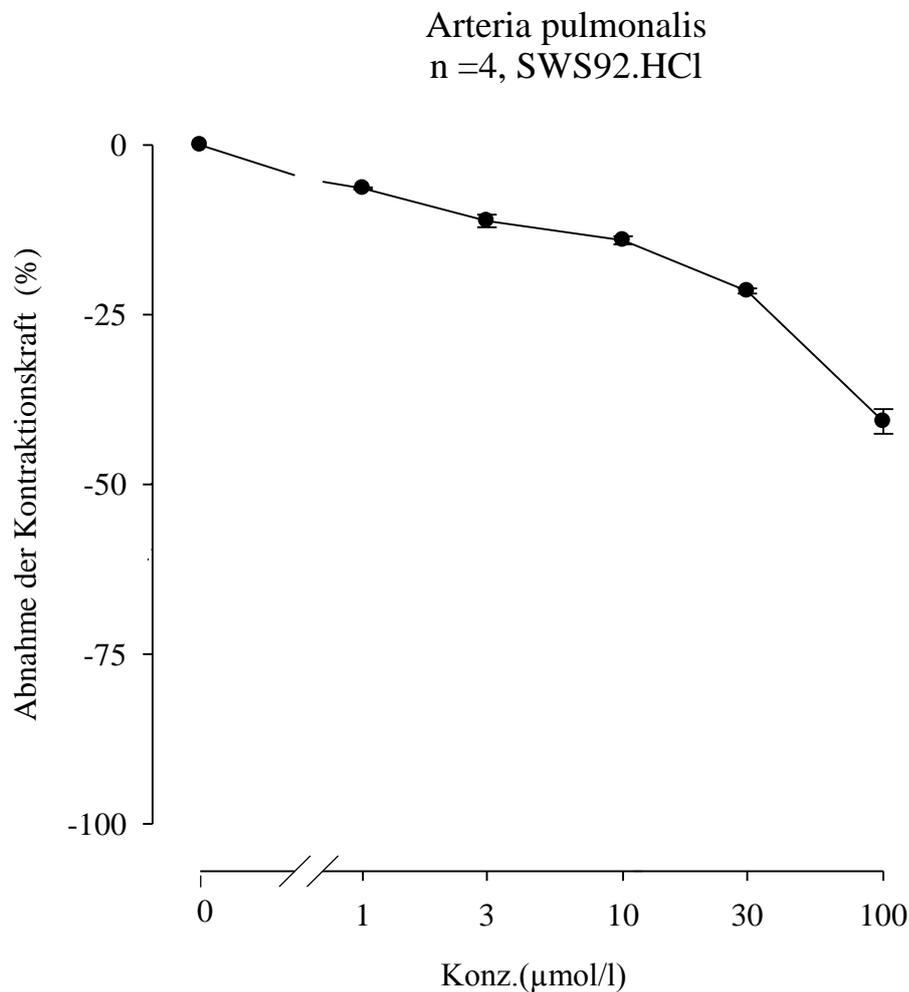
**Tabelle 12:** Wirkung von SWS92.HCl auf die Arteria pulmonalis

<i>SWS92.HCl (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</i>	<i><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (mN)</i>	<i><math>f_c \pm \text{SEM}</math> (%)</i>	<i>Versuchsanzahl</i>	<i>Irrtums- Wahrscheinlichkeit (P)</i>
Kontrolle	12,87 $\pm$ 1,90	0,00 $\pm$ 0,00	4	-
1	12,05 $\pm$ 1,77	-6,39 $\pm$ 0,15	4	n.s
3	11,48 $\pm$ 1,80	-11,19 $\pm$ 0,92	4	0,05
10	11,09 $\pm$ 1,68	-14,05 $\pm$ 0,59	4	0,05
30	10,11 $\pm$ 1,52	-21,51 $\pm$ 0,38	4	0,05
100	5,94 $\pm$ 1,84	-40,73 $\pm$ 1,81	4	0,01

Legende zu Tabelle 12:

In die Tabelle 11 sind die arithmetischen Mittelwerte ( $f_c$ ) und die Standardfehlern (SEM) in mN sowie in % angegeben.

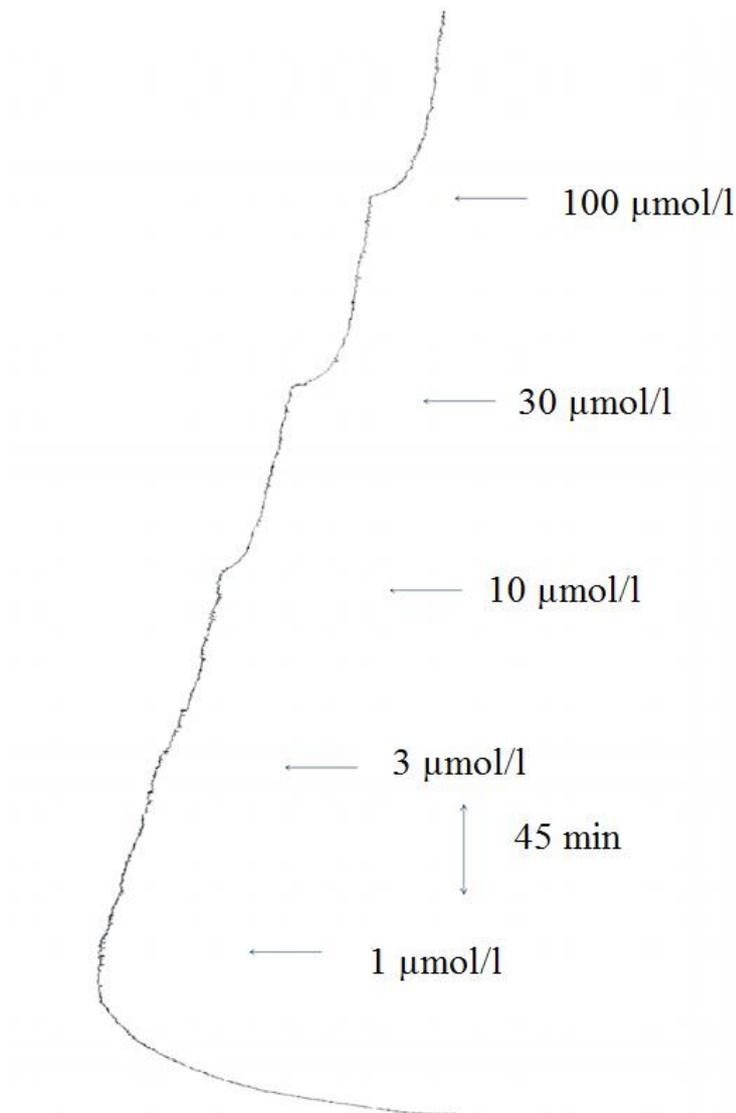
**Abbildung 25:** Konzentrations-Wirkungskurve von SWS92.HCl auf die Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 25:

Hier ist kein  $EC_{50}$ -Wert erreicht. Der Mittelwert ist mit den Punkten dargestellt. Auf x-Achse ist die Konzentration in  $\mu\text{mol/l}$  zu erkennen und auf y-Achse die Abnahme der Schläge pro Minute. Durch die Punkte wurde der arithmetische Mittelwert und durch die Balken der jeweilige Standardfehler dargestellt.

**Abbildung 26:** Originalaufzeichnung der Wirkung von SWS 92.HCl auf die Arteria pulmonalis



Legende zur Abbildung 26:

Die vorliegende Abbildung zeigt eine leichte dilatierende Wirkung von der Substanz SWS92.HCl auf die Pulmonalarterie.

4.2.5 Wirkung von SWS92.HCl auf das terminale Ileum

Um eine inotrope Wirkung von der Testsubstanz SWS92.HCl auf dem terminales Ileum feststellen zu können, wurden vier Versuche durchgeführt.

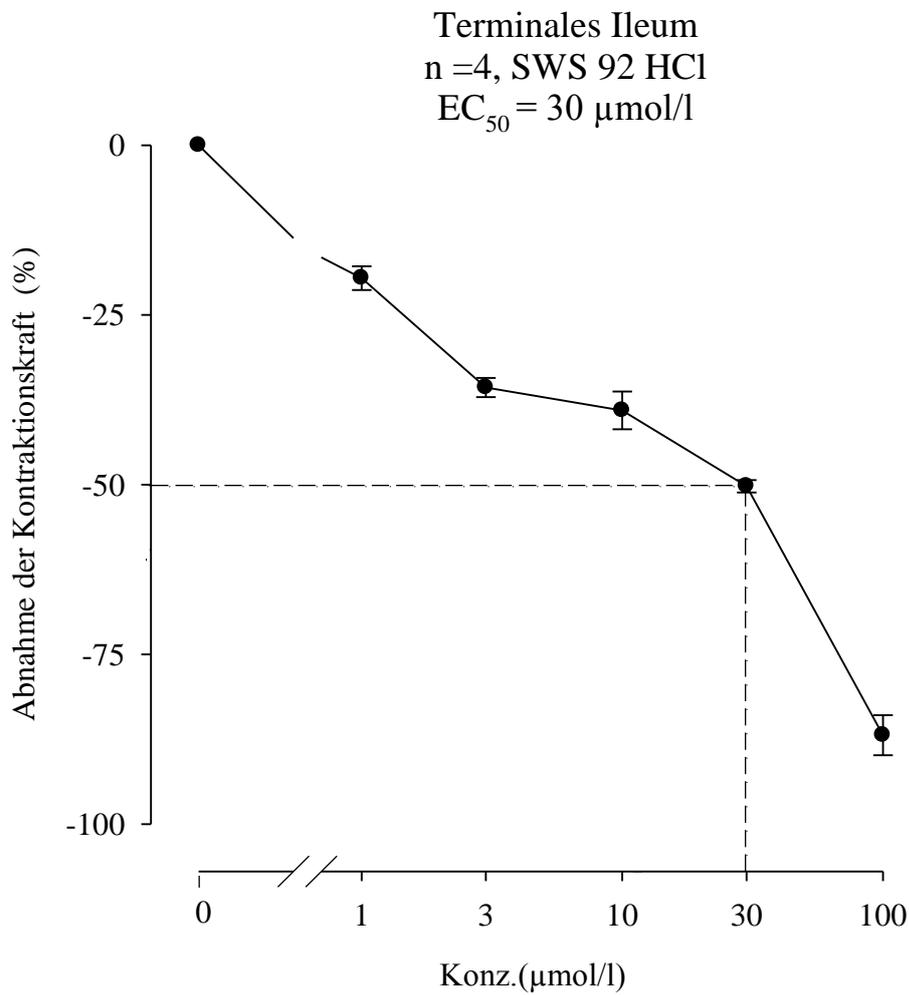
**Tabelle 13:** Wirkung von SWS92.HCL auf das terminale Ileum

<i>SWS92.HCl</i> ( $\mu\text{mol/l}$ )	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	<i>Versuchsanzahl</i>	<i>Irrtums- Wahrscheinlichkeit</i> (P)
Kontrolle	10,50 $\pm$ 1,90	0,00 $\pm$ 0,00	4	-
1	8,35 $\pm$ 1,35	-19,56 $\pm$ 1,75	4	n.s
3	6,68 $\pm$ 1,08	-35,69 $\pm$ 1,41	4	0,01
10	6,30 $\pm$ 1,03	-39,07 $\pm$ 2,78	4	0,01
30	5,21 $\pm$ 0,95	-50,23 $\pm$ 0,92	4	0,01
100	2,58 $\pm$ 0,80	-86,91 $\pm$ 2,95	4	0,001

Legende zu Tabelle 13:

In die Tabelle 11 sind die arithmetischen Mittelwerte ( $f_c$ ) und die Standardfehlern (SEM) in mN sowie in % angegeben.

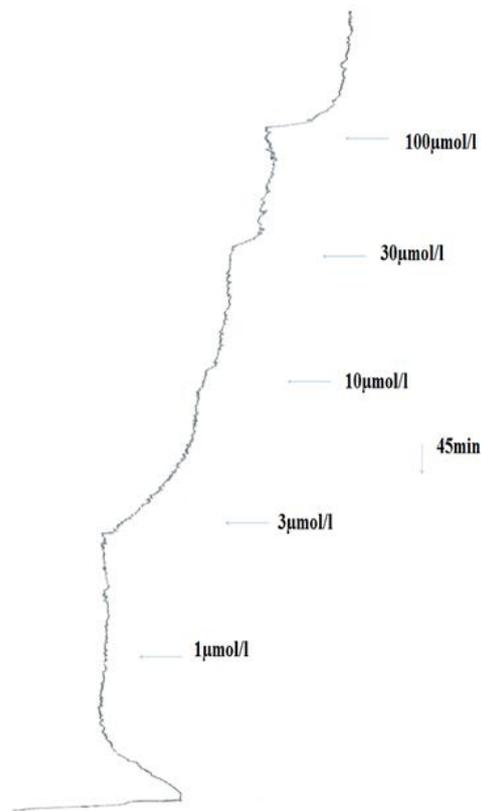
**Abbildung 27:** Konzentrations-Wirkungskurve von SWS92.HCl auf das terminale Ileum



Legende zu Abbildung 27:

Auf dieser Abbildung konnte man eine signifikante Wirkung von der Testsubstanz SWS92.HCl auf terminale Ileum zu erkennen. Ein EC<sub>50</sub>-Wert beträgt 30 µmol/l. Mit zunehmender Substanzzugabe wird die spasmolytische Wirkung stärker.

**Abbildung 28:** Originalabbildung der Wirkung von SWS92.HCl auf das terminale Ileum



Legende zur Abbildung 28:

Die spasmolytische Wirkung ist anhand der Abbildung deutlich zu erkennen.  
Die Substanzzugabe erfolgte in einem 45-minütigen Intervall.

## **4.2 Resultate der Untersuchung mit Glibenclamid (Wirkmechanismus)**

Eine signifikante Wirkung von der Testsubstanz wurde am terminalen Ileum festgestellt. Unter dem Einfluss von einem  $K_{ATP}$ -Kanalblocker, Glibenclamid in zwei verschiedenen Konzentrationen 30  $\mu\text{mol/l}$  und 100  $\mu\text{mol/l}$  wurden weitere Versuche durchgeführt, um einen Wirkmechanismus besser beurteilen zu können.

Es wurden drei Versuche durchgeführt. Zuerst wartete man bis eine konstante Plateuphase erreicht wurde und dann wurden 30  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid ins Organbad pipettiert. Nach 45 Minuten Wartezeit wurde 30  $\mu\text{mol}$  von SWS92.HCl dazugegeben.

### *4.2.1 Ergebnisse der Versuche mit 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid*

Zuerst wurde der Wirkmechanismus von der Testsubstanz SWS92.HCl mit 30  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid getestet. Verwendetes Organ war das terminale Ileum. Davon wurden drei Versuche gemacht.

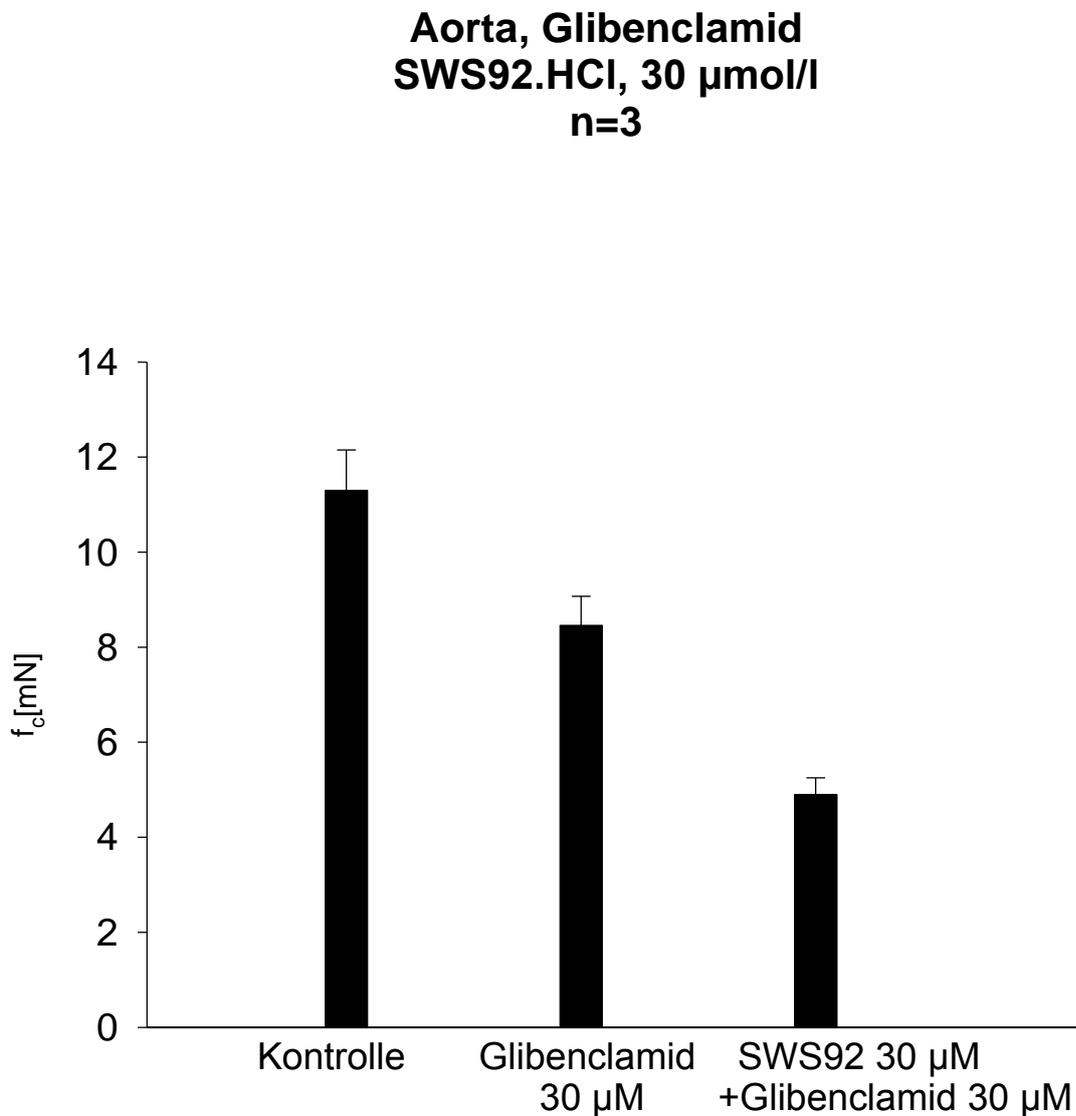
**Tabelle 14:** Wirkung von 30µmol /l Glibenclamid auf das terminale Ileum

<i>Glibenclamid</i>	<i><math>f_c \pm SEM</math></i> <i>(mN)</i>	<i>Versuchszahl</i> <b>n</b>	<i>Irrtums-</i> <i>wahrscheinlichkeit</i> <b>(P)</b>
<i>Kontrolle</i>	11,3 ± 0,85	3	-
<i>30µmol/l</i> <i>Glibenclamid</i>	8,46 ± 0,61	3	-
<i>30µmol/l</i> <i>SWS92.HCl</i>	4,9 ± 0,35	3	0,05

Legende zu Tabelle 14:

In der Tabelle 14 sind die arithmetischen Mittelwerte inklusive die Standardfehlern von drei Versuchen dargestellt. Sie sind in mN sowie im % angeführt.

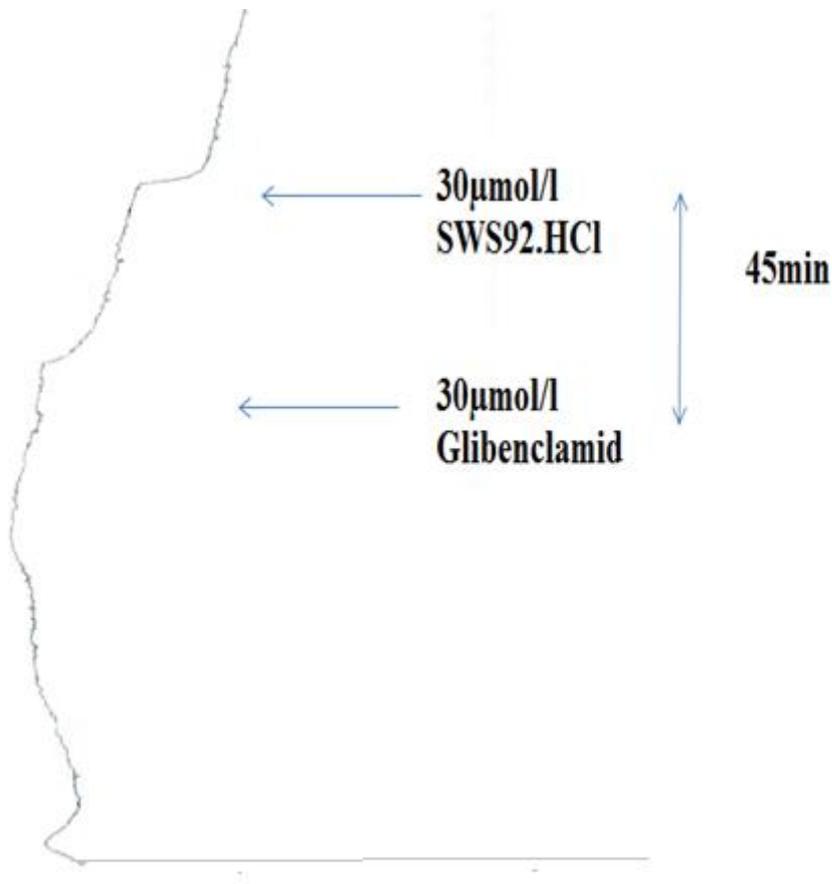
**Abbildung 29:** Graphische Darstellung der Wirkung von 30  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid unter Zugabe von 30  $\mu\text{mol/l}$  SWS92.HCl



Legende zu Abbildung 29:

Die schwarzen Balken aus drei durchgeführten Versuchen stellen den Mittelwert dar. Diese Werte findet man auf der Abszisse. Erste Balken stellt den Mittelwert für die Kontrolle, zweiter für Zugabe der 30  $\mu\text{mol}$  Glibenclamid und der dritte für SWS92.HCl dar. Auf die Ordinate ist Kontraktionskraft in mN zu erkennen.

**Abbildung 30:** Originalaufzeichnung der Wirkung von 30  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamid unter Zugabe von 30  $\mu\text{mol/l}$  SWS92.HCl auf das terminale Ileum



Legende zu Abbildung 30:

Diese Abbildung veranschaulicht eine Abnahme der Kontraktionskraft durch die Zugabe des 30  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamids. Die Zufuhr der Testsubstanz SWS 92.HCl äußert eine Dilatation des Dünndarmes.

4.2.2 Ergebnisse der Versuche mit 100 µmol/l Glibenclamid

Bei folgenden drei Versuchen wurde die Wirkung der Testsubstanz mit 100 µmol/l Glibenclamid getestet.

Nach erreichter Plateuphase wurden 100 µmol/l Glibenclamid in das Organbad pipettiert und nach 45 Minuten Wartezeit wurde eine Konzentration von 30 µmol/l der Testsubstanz SWS92.HCl dazugegeben.

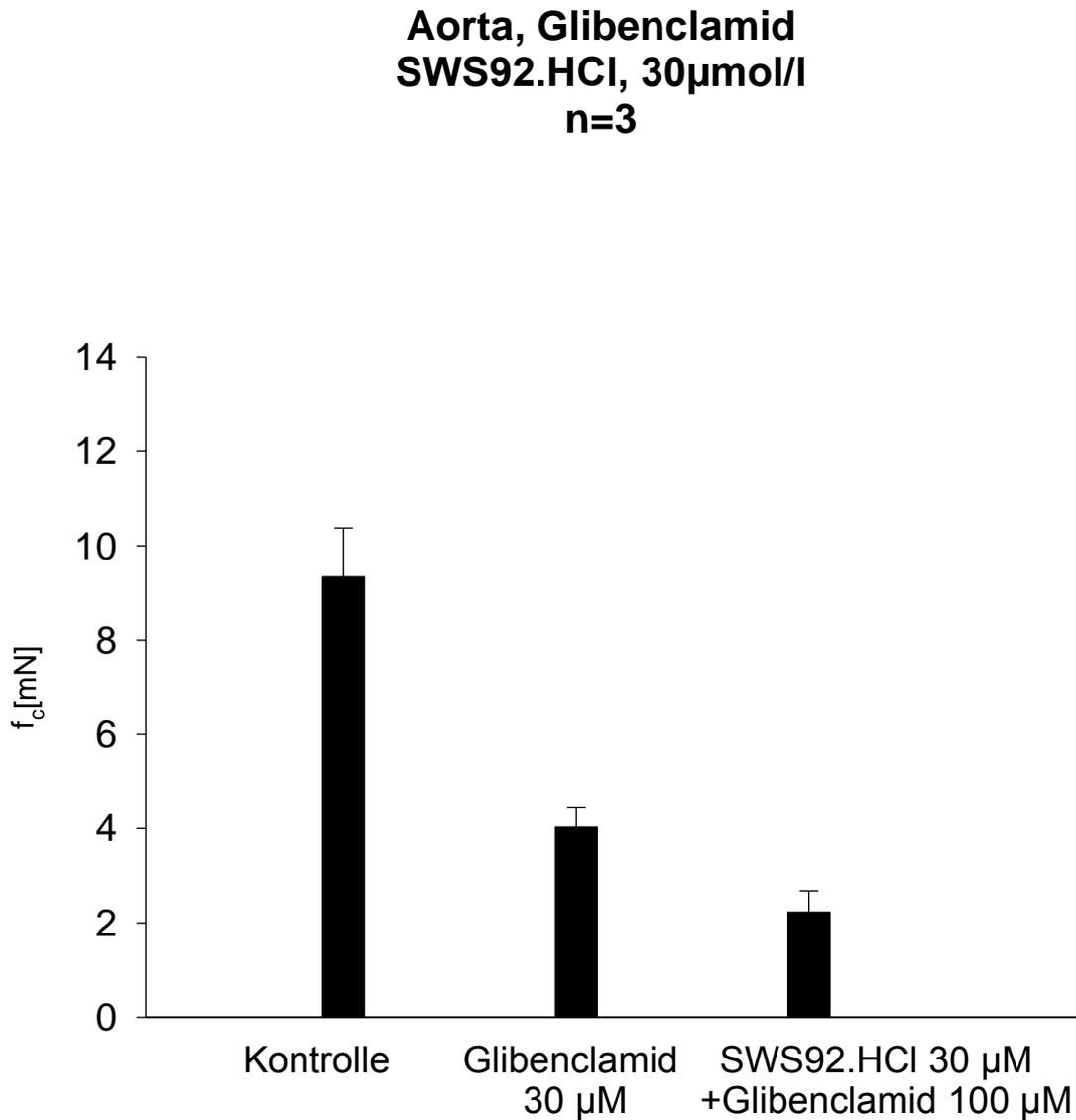
**Tabelle 15:** Wirkung von 100µmol/l Glibenclamid auf das terminale Ileum

<i>Glibenclamid</i>	$f_c \pm SEM$ (mN)	Versuchsanzahl <b>n</b>	<i>Irrtumswahrscheinlichkeit</i> (P)
<i>Kontrolle</i>	9,34 ± 1,04	3	-
<i>100µmol/l</i> <i>Glibenclamid</i>	4,03±0,43	3	-
<i>30µmol/l</i> <i>SWS92.HCl</i>	2,23±0,32	3	0,05

Legende zu Tabelle 15:

In der Tabelle 15 sind die arithmetischen Mittelwerte inklusive die Standardfehlern von drei Versuchen dargestellt. Sie sind in mN sowie im % angeführt.

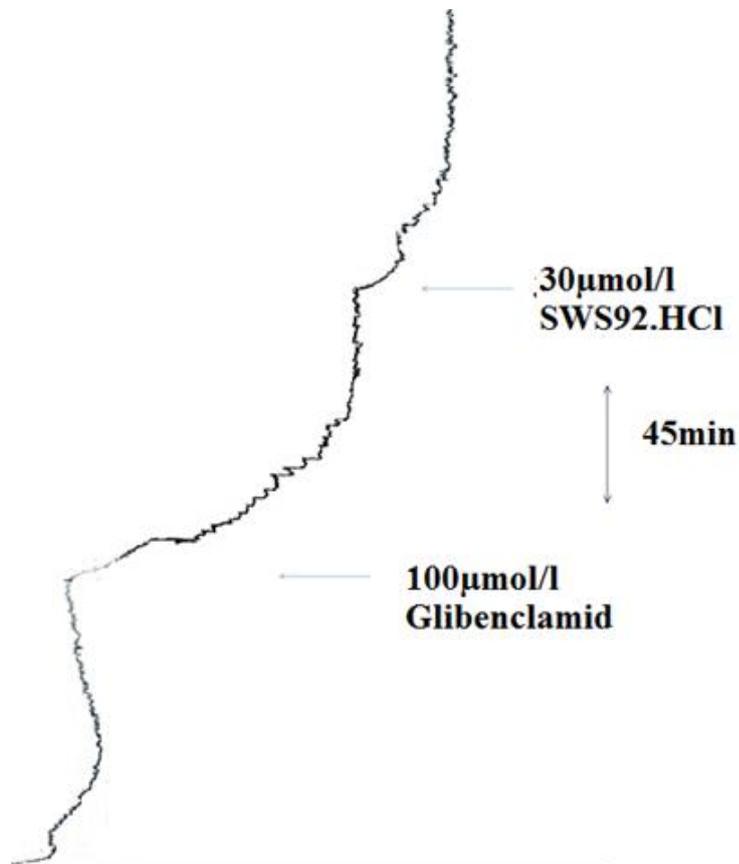
**Abbildung 31:** Graphische Darstellung der Wirkung von 100 $\mu$ mol/l Glibenclamid unter der Zugabe von 30 $\mu$ mol/l SWS92.HCl



Legende zu Abbildung 31:

Die schwarzen Balken aus drei durchgeführten Versuchen stellen den Mittelwert dar. Diese Werte findet man auf der Abszisse. Erste Balken stellt den Mittelwert für die Kontrolle, zweiter für Zugabe der 100  $\mu$ mol Glibenclamid und der dritte für SWS92.HCl dar. Auf die Ordinate ist Kontraktionskraft in mN zu erkennen.

**Abbildung 32:** Originalaufzeichnung der Wirkung von 100  $\mu\text{mol}$  Glibenclamid unter der Zugabe von 30  $\mu\text{mol/l}$  SWS92.HCl



Legende zu Abbildung 32:

Diese Abbildung veranschaulicht eine Abnahme der Kontraktionskraft durch die Zugabe des 100  $\mu\text{mol/l}$  Glibenclamids. Die Zufuhr der Testsubstanz SWS 92.HCl bewirkt eine Dilatation des terminalen Ileums.

## ***5. Diskussion***

---

In den letzten vier Kapiteln wurde über die Resultate der Untersuchung von der Testsubstanz SWS92.HCl gesprochen und deren Wirkung auf fünf verschiedene Organe getestet. In diesem Kapitel wird über die Bewertung diskutiert.

### ***5.1 Versuchsreihen an glattmuskulären Organen***

Alle Präparate mit glatter Muskulatur wie Aorta descendens, Arteria pulmonalis und terminales Ileum wurden zuerst chemisch mit einer KCl-Lösung vorkontrahiert. Die Konzentration für die Vorkontraktion bei Arteria pulmonalis und Aorta descendens betrug 90 mM KCl-Lösung und für das terminale Ileum 60 mM KCl-Lösung.

Man wartete bis eine konstante Plateuphase erreicht wurde und dann in Intervallen von 45 Minuten wurden die verschiedenen Konzentrationen von der Testsubstanz SWS92.HCl ins Organbad pipettiert. Aufgrund der Kontraktionsänderung wurde eine Kurve aufgezeichnet und dadurch konnte man eine vasodilatatorische bzw. spasmolytische Wirkung getestet werden

**Tabelle 16:** Wirkung von SWS92.HCl auf glatte Muskulatur

<i>Organpräparat</i>	<i>SWS92.HCl f<sub>c</sub> ± SEM (%) bei Endkonzentration</i>	<i>EC<sub>50</sub> (μmol/l)</i>
<i>Arteria pulmonalis</i>	-40,73 ± 1,81	> 100
<i>Aorta descendens</i>	-36,02 ± 1,92	>100
<i>Terminales Ileum</i>	-86,91 ± 2,95	30

Anhand der Tabelle 16 ist gut zu erkennen, dass die Wirkung von der Testsubstanz SWS92.HCl beim terminalen Ileum stark ausgeprägt war und bei der Aorta und Arteria pulmonalis viel schwächer war.

Vor der Substanzzugabe wurde bei dem terminalen Ileum ein Kontrollwert von  $10,50 \pm 1,90$  (=100%) festgestellt. Dann wurde die erste Konzentration von der Testsubstanz ins Organbad gegeben und es kann zu einer Kontraktionsabnahme feststellen. Bei jeder weiterer Konzentration nahm die Kontraktionskraft am terminalen Ileum stetig ab. Nach einer Konzentration von  $100\mu\text{mol/l}$  wurde ein Endwert von  $2,58 \pm 0,80$  mN bzw.  $-86,91 \pm 2,95$  % erreicht. EC<sub>50</sub>-Wert betrug  $30\mu\text{mol/l}$ .

In der Kontrollen betragen die Mittelwerte bei der Arteria pulmonalis mit  $12,87 \pm 1,90$  mN (entspricht 100%) und bei der Aorta mit  $11,65 \pm 1,43$  mN (=100%).

Da eine schwache Kontraktionsabnahme durch die Substanz SWS92.HCl ausgeübt wurde mit einem Endwert bei der Arterie pulmonalis von  $5,94 \pm$

1,84mN bzw.  $-40 \pm 1,81$  % und bei der Aorta von  $7,46 \pm 0,61$  mN bzw.  $-36,02 \pm 1,92$  %, konnte das  $EC_{50}$ - Wert bei beiden Präparaten nicht erreicht werden.

## 5.2 Versuchsreihen am Herzmuskel

Für diese Versuche wurden Muskulus papillaris und Atrium cordis dexter, welche eine quergestreifte Muskulatur aufweisen, untersucht.

Der Vorhof (Atrium cordis dexter) besitzt ein spontanes Erregungsbildungssystem am Sinusknoten und wurde auf positive/negative Chronotropie getestet. Der Papillarmuskel elektrisch wurde gereizt und auf eine positive oder negative Inotropie untersucht.

**Tabelle 17:** Wirkung von SWS92.HCl auf quergestreifte Herzmuskulatur

<i>Organpräparat</i>	<i>SWS92.HCl</i> <i><math>f_c \pm SEM</math> (%)</i> <i>bei</i> <i>Endkonzentration</i>	<i>EC<sub>50</sub></i> <i>(<math>\mu\text{mol/l}</math>)</i>
<i>Atrium cordis dexter</i>	$-54,05 \pm 0,00$	48,5
<i>Muskulus papillaris</i>	$-100 \pm 0,00$	30

Anhand des  $EC_{50}$ -Werts von  $48,5 \mu\text{mol/l}$  konnte man eine signifikante Wirkung der Testsubstanz SWS92.HCl auf den Vorhof, feststellen.

Nachdem die Plateuphase erreicht wurde, spritzte man um Intervall von 45 Minuten die Testsubstanz ins Organbad rein. Der Kontrollwert betrug  $231,25 \pm 21,63$  mN (=100%). Nach weiterer Substanzzugabe er folgte eine kontinuierliche Abnahme der Schlagfrequenz und bei Erreichen der Endkonzentration von  $100\mu\text{mol/l}$  kam es zu einer völligen Erlöschen.

Auch bei Muskulus papillaris wurde ein  $EC_{50}$  Wert erreicht. Dieser Wert lag bei  $30\mu\text{mol/l}$ . Der Mittelwert vor der Substanzzugabe betrug  $1,87 \pm 0,11$  mN (=100%) und diente als Kontrollwert. Durch die Substanzzugabe erfolgte eine kontinuierliche Abnahme der Kontraktionskraft und erreichte bei der Endkonzentration einen Wert von  $0,86 \pm 0,04$  mN bzw.  $-54,05 \pm 0,00$  %.

### ***5.3 Versuchsreihen mit SWS92.HCl in Kombination mit Glibenclamid***

Die Wirkung der Testsubstanz SWS92.HCl, wie schon in vorliegenden Kapiteln erwähnt wurde, in Kombination mit Glibenclamid am terminalen Ileum getestet. Hier wurden zwei verschiedene Konzentrationen von Glibenclamid, sowie  $30\mu\text{mol/l}$  als auch  $100\mu\text{mol/l}$ , verwendet. Insgesamt wurden sechs Versuche durchgeführt. Es sollte festgestellt werden, ob die Testsubstanz SWS92.HCl blockierte ATP-abhängige K-Kanäle öffnet und dadurch eine spasmolytische Wirkung am terminalen Ileum verursacht.

#### ***5.4 Versuche mit SWS92.HCl in Kombination mit 30 µmol/l Glibenclamid***

Hier wurde zuerst eine maximale Vorkontraktion des terminalen Ileums mit 60 mM KCl-Lösung ausgelöst. Dann kam 30 µmol/l Glibenclamid dazu und wurde 45 Minuten gewartet. Schließlich pipettierte man 30 µmol/l der Testsubstanz dazu und beobachtete ob eine Änderung der Kontraktionskraft vorliegt.

Durch die Konzentration von 30 µmol/l Glibenclamid kam es zu einer leichten Abnahme der Kontraktionskraft und nach der Zugabe von 30 µmol/l der Testsubstanz nahm die Kontraktionskraft stark ab.

#### ***5.5 Versuche mit SWS92.HCl in Kombination mit 100 µmol/l Glibenclamid***

Die Durchführung des Versuches erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie schon in Kapitel 5.4 beschrieben wurde. Statt der Konzentration von 30 µmol/l Glibenclamid, verwendete man 100 µmol/l. Nach dem Erreichen der Plateuphase pipettierte man 100 µmol/l Glibenclamid ins Organbad. Nach 45 Minuten wurden 30 µmol/l von der Testsubstanz dazugegeben und auf eine Änderung der Kontraktionskraft gewartet.

Bei einer Konzentration von 100 µmol/l Glibenclamids war eine starke Kontraktionsabnahme zu erkennen und nach der Zugabe von 30 µmol/l der Testsubstanz nahm die Kontraktion weiter ab.

## ***6. Zusammenfassung***

---

In dieser Diplomarbeit wurde die Testsubstanz SWS92.HCl, welche vom Department Medizinische/Pharmazeutische Chemie der Universität Wien synthetisiert wurde, an isolierten Organen von Meeresschweinchen getestet.

Die verwendeten Organe waren Atrium cordis dexter, die Aorta descendens, der Musculus papillaris, die Arteria pulmonalis und das terminale Ileum. Der Testsubstanz wurde in folgenden Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{mol/l}$  untersucht, auf einem Millimeterpapier Auswirkungen aufgezeichnet und ausgewertet.

An die Präparaten mit glatten Muskulatur (die Aorta descendens, die Arteria pulmonalis und das terminale Ileum) wurde die Änderung der Kontraktionskraft untersucht. An quergestreiften Muskulatur z.B bei dem Vorhof wurde positive oder negative chonotrope Wirkung von SWS92.HCl untersucht, während beim Papillarmuskel auf positive oder negative Inotrope getestet wurde.

Bei den glattmuskulären Präparaten eine signifikante Wirkung konnte nur bei terminalem Ileum ausgeübt werden. Hier wurde ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert von 30  $\mu\text{mol/l}$  erreicht. Bei dem Organ wurde auch Wirkmechanismus in Kombination mit Glibenclamid durchgeführt. Bei Arteria pulmonalis und Aorta descendens konnte kein  $\text{EC}_{50}$ -Wert erreicht zu werden.

Während am quergestreifte Herzmuskulatur eine deutliche Wirkung von SWS92.HCl bei Papillarmuskel gezeigt wurde.  $\text{EC}_{50}$ -Wert betrug 30  $\mu\text{mol/l}$ . Am Atrium cordis dexter war der Wert mit 48,5  $\mu\text{mol/l}$  um etwas höher und eine signifikante Wirkung wurde erst ab der Endkonzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  mit einer vollständigen Inhibition der Schlagkraft geäußert.

## ***7. Literaturverzeichnis***

---

Abe K und Kimura H (1996) The possible Role of Hydrogen Sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci* 16(3): 1066-1071

Bahtia M, Sidhapuriwala J, Moochala SM, Moore PK (2005a) Hydrogen sulphide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in the rat. *Br J Pharmacology* 145: 141-144

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

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

Holzwarth MG (2004) E23K- Polymorphismus im Gen der KIR 6.2-Untereinheit des ATP-sensitiven Kaliumkanals- Auswirkungen auf Glukosetoleranz, Insulin- und Glukagonsekretion. Dissertation Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

Jander G, Blasius E (1983) Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie. 12. Auflage, S. Hirzel Verlag Stuttgart

Kamoun P (2001) Mental retardation in Down syndrome: a hydrogen sulphide hypothesis. *Medical Hypothesis* 57: 389-392

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Korting M (2005) *Arzneimittelwirkungen kompakt*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

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

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

Stipanuk MH and Beck PW (1982) Characterization of the enzymic capacity  
for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J* 206:267-  
277

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

Zhao W, Zhang J, Lu Y and Wang R (2001) The vasorelaxant effect of  $H_2S$  as a  
novel endogenous gaseous  $K_{ATP}$  channel opener. *The EMBO Journal* 20: 6008-  
6016

## **8. Curriculum Vitae**

---

**Name:** Tijana Stjepanovic

***Persönliche Daten:***

Geburtsdatum: 23.09.1984

Geburtsort: Gracanica, BiH

Staatsangehörigkeit: Bosnisch-herzegowinisch

Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Adresse: Markomannenstraße 13/2/13 1220 Wien

***Ausbildung:***

2004-2012 Studium Pharmazie in Wien (Österreich)

2003-2004 Vorstudienlehrgang, Deutschkurs

1999-2003 Mittelschule für Krankenpfleger, Ausbildungsprofil:  
Pharmazeutische Technikerin

1991-1999 Grundschule Sockovac in Bosnien und Herzegowina