



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Wirkung einer neu synthetisierten, potentiell
schwefelwasserstofffreisetzenden Verbindung
(MAH10.HCl) an isolierten Meerschweinchenorganen“

verfasst von

Katharina Reichinger

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt.

Studienblatt:

A449

Studienrichtung lt.

Studienblatt:

Pharmazie

Betreut von:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

Danksagung

Ein besonderer Dank gebührt in erster Linie meinem Diplomarbeitsbetreuer Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik, der es mir ermöglicht hat an diesem interessanten Thema zu forschen. Er stand mir stets mit großer fachlicher Kompetenz zur Seite und verstand es mich mit freundlichen Worten zu motivieren.

Ich bedanke mich auch bei Mag. Michael Hintersteiner für die Synthese und bei Ao. Univ. Prof. Dr. Mag. Thomas Erker für die Bereitstellung der Testsubstanz.

Ich möchte meiner Familie, besonders meinen Eltern, danken. Sie haben mir nicht nur mein Studium ermöglicht, sondern es immer verstanden mich vom stressigen Studienalltag abzulenken.

Während der ganzen Studienzeit wurde ich tatkräftig von meinem Freund Lukas unterstützt. Er gab mir die Kraft und den Optimismus, wenn es im Studium nicht nach Plan lief und ertrug mich auch in den lernintensiven Zeiten.

Zu guter Letzt gilt der Dank meinen Studienkollegen, besonders meinen „Mädl´s“, die mir während der Studienzeit immer unterstützend zur Seite standen. Danke für die vielen gemeinsamen lustigen Stunden.

DANKE

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
2. Zielsetzung	6
3. Material und Methodik	7
3.1. Testsubstanz	7
3.1.1. MAH10.HCl	7
3.1.2. Lösungsmittel.....	7
3.2. Versuchstiere	9
3.3. Physiologische Elektrolytlösung	9
3.4. Kaliumchloridlösung	11
3.5. Verwendete Organe	12
3.5.1. Präparation und verwendete Materialien	12
3.5.1.1. Atrium cordis dextrum (Rechter Vorhof)	13
3.5.1.2. Arteria pulmonalis (Lungenarterie).....	13
3.5.1.3. Musculus papillaris (Papillarmuskel).....	14
3.5.1.4. Terminales Ileum (Dünndarm)	16
3.5.1.5. Aorta descendens (Aorta)	16
3.6. Verwendete Apparaturen	18
3.6.1. Apparatur A.....	19
3.6.2. Apparatur B.....	21
3.6.3. Der Kraftwandler	23
3.6.4. Versorgung mit Oxymix	23
3.7. Durchführung der Versuche	24
3.7.1. Untersuchung der Wirkstärke von MAH10.HCl auf die isolierten Meerschweinchenorgane– Versuchsablauf.....	24
3.7.1.1. Versuchsablauf am Atrium cordis dextrum	24
3.7.1.2. Versuchsablauf am terminalen Ileum.....	26
3.7.1.3. Versuchsablauf am Musculus papillaris.....	27
3.7.1.4. Versuchsablauf an der Aorta descendens.....	28
3.7.1.5. Versuchsablauf an der Arteria pulmonalis	29
3.7.2. Untersuchung des Wirkmechanismus von MAH10.HCl an der Arteria Pulmonalis.....	29
3.7.2.1. Versuchsablauf mit Glibenclamid.....	29
3.8. Verwendeter Antagonist zur Untersuchung des Wirkmechanismus	30
3.8.1. Glibenclamid	30
3.9. Auswertung und Statistik	31
3.9.1. Atrium cordis dextrum	31

3.9.2.	Musculus papillaris	31
3.9.3.	Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum	32
3.9.4.	Statistik	32
4.	Ergebnisse	34
4.1.	Ergebnisse der Testsubstanz MAH10.HCl	34
4.1.1.	Atrium cordis dextrum	34
4.1.2.	Musculus Papillaris.....	38
4.1.3.	Aorta descendens	41
4.1.4.	Arteria pulmonalis.....	44
4.1.5.	Terminales Ileum.....	47
4.2.	Analyse des Wirkmechanismus von MAH10.HCl an der Lungenarterie	50
4.2.1.	Versuchsablauf an der Arteria Pulmonalis mit MAH10.HCl in Kombination mit Glibenclamid.....	50
4.2.2.	Ergebnisse der Versuche von MAH10.HCl in Kombination mit Glibenclamid an der isolierten Arteria pulmonalis.....	51
5.	Diskussion	56
5.1.	Wirkung der Testsubstanz MAH10.HCl auf die glattmuskulären Organe	56
5.1.1.	Wirkung von MAH10.HCl auf das terminale Ileum	57
5.1.2.	Wirkung von MAH10.HCl auf die Arteria pulmonalis.....	57
5.1.3.	Wirkung von MAH10.HCl auf die Aorta descendens.....	57
5.2.	Wirkung der Testsubstanz MAH10.HCl auf die Herzmuskulatur	58
5.2.1.	Wirkung von MAH10.HCl auf den Kontraktionstonus des Musculus papillaris 58	
5.2.2.	Wirkung von MAH10.HCl auf die Schlagfrequenz des Atrium cordis dextrum	59
5.3.	Untersuchung des möglichen Wirkmechanismus anhand der isolierten Arteria pulmonalis	59
6.	Zusammenfassung.....	61
7.	Literaturverzeichnis	63
8.	Curriculum vitae	65

1. Einleitung

Schwefelwasserstoff, mit der chemischen Bezeichnung H_2S , wird im Labor häufig aus Salzsäure und Eisen (II)-sulfid hergestellt (Mortimer und Müller 2010).



Großtechnisch fällt Schwefelwasserstoff bei der Entschwefelung von Erdöl und insbesondere von Erdgas an. Auch im Heizgas und Kokereigas ist Schwefelwasserstoff enthalten (Mortimer und Müller 2010).

Bei Fäulnis schwefelhaltiger organischer Stoffe (Eiweiß) bildet sich dieses Gas ebenfalls und ist für den üblen Geruch nach verdorbenen Eiern verantwortlich.

Neben dem charakteristischen Geruch zählen zu den physikalischen Eigenschaften die starke Toxizität und die Farblosigkeit des Gases. H_2S ist um ein vielfaches schwerer als Luft und reichert sich daher in Gruben und Kanälen an (Holleman und Wiberg 2007).

Eine Besonderheit dieses Gases ist die Eigenschaft die Geruchsrezeptoren zu desensitivieren. Schon ab einer Konzentration von 200 ppm kann Schwefelwasserstoff nicht mehr über die Nase wahrgenommen werden (Thieme Chemistry 2009).

Ab einer Konzentration von 20 ppm kommt es bei längerer Einwirkung des Gases zu ersten Reaktionserscheinungen, die mit Reizungen der Schleimhäute an Augen und Atemwegen, mit Hustenreiz, Pneumonie, Übelkeit und Erbrechen einhergehen. Häufig verschwinden diese Vergiftungserscheinungen innerhalb weniger Wochen. Als Spätfolge kann eine Myokarddegeneration bleiben.

Ab 500 ppm kommt es binnen 30 Minuten zum Tod durch Lähmung der Atemmuskulatur (Reichl et al. 2002).

Bis dato konnte der Wirkmechanismus der Giftwirkung noch nicht endgültig geklärt werden. Fakt ist, dass H_2S als Reduktionsmittel in hohen Konzentrationen

eisenhaltige Enzyme blockiert. Die Hemmung der 3-wertigen Eisen der Cytochromoxidase durch Sulfid- oder Disulfidbildung führt in den Mitochondrien zur Stilllegung der Atmungskette. Schlussendlich tritt eine Lähmung des Atemzentrums ein.

Kommt es zu einer Schwefelwasserstoffvergiftung stellt die Beatmung die wichtigste medizinische Maßnahme dar. Weitere Behandlungsschritte folgen symptomatisch (Estler und Schmidt 2007). Neuerdings wird 4-Dimethylaminophenol-HCl, kurz 4-DMAP, als Antidot verwendet, das im Vergleich zu Schwefelwasserstoff eine höhere Affinität zur Cytochromoxidase besitzt (Mutschler et al. 2008, Aktories et al. 2009).

Schwefelwasserstoff wurde über Jahrzehnte als giftiges umweltschädigendes Gas verteufelt. Jedoch erlangte es in den letzten Jahren aufgrund seiner vasodilatierenden Eigenschaft immer mehr an Bedeutung.

Zahlreiche Studien haben den erweiterten Effekt von Schwefelwasserstoff auf die Blutgefäße belegt. Schon vor 15 Jahren zeigte Hosoki durch die intravenöse Gabe von Schwefelwasserstoff eine Senkung des Blutdrucks bei Ratten um 15-30 mmHg (Hosoki 1997).

H₂S wird endogen durch die Enzyme Cystathionin-β-synthase (CBS) und Cystathionin-γ-Lyase (CSE) in Säugetieren synthetisiert. Sie besitzen ein organspezifisches-Expressionsmuster und finden sich daher in bestimmten Gewebsregionen vermehrt wieder. CBS wird vor allem im Gehirn und im Nervensystem stark exprimiert, wohingegen CSE vermehrt in vaskulären und nicht-vaskulären glatten Muskelzellen zu finden ist (Fiorucci et al. 2006).

In Versuchen an Mäusen wurde das Gen, das CSE codiert, ausgeschaltet. Die Ausschaltung führte sogleich zu einer Erniedrigung der Konzentration des Gasmoleküls in Herz, Blutgefäßen und Blutserum der Mäuse um bis zu 80%. Zusätzlich kam es schon bei jungen Tieren zu einem Anstieg des Blutdrucks und einer Erhöhung des Gefäßtonus. Die Hypertonie konnte durch eine Injektion einer schwefelwasserstofffreisetzenden Substanz wieder normalisiert werden (Wang et al. 2008).

Schon in mikromolaren Konzentrationen (10-100 µmol) übt H₂S eine protektive Wirkung auf das kardiovaskuläre System aus (Lefer 2007). Es führt zur

Vasodilatation und entspannt Blutgefäße, wodurch der Blutdruck gesenkt wird (Pryor et al. 2006). Weitere interessante Aspekte hinsichtlich der Wirkung von H₂S im Körper bilden die antiinflammatorischen, antioxidativen, diabetiogenen und apoptotischen Wirkungen (Kimura und Kimura 2004). Laut Wang könnte Schwefelwasserstoff auch bei Erkrankungen wie Diabetes und Demenz von großer Bedeutung sein.

H₂S wird aufgrund der vorhin genannten Eigenschaften neben Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenstoffdioxid (CO₂) als wichtiges Signalmolekül angesehen (Wang et al. 2008).

Ein großer Vorteil gegenüber NO ist, dass H₂S im Körper keine toxischen Metaboliten bildet (Lefer 2007).

Der kardioprotektive Wirkmechanismus von Schwefelwasserstoff beruht vorwiegend auf der Blockade von ATP-sensitiven Kaliumkanälen (Zhao et al. 2001).

K_{ATP}-Kanäle haben einen homologen Aufbau und stellen strukturell einen hetero-octameren Komplex da. Dieser Komplex besteht aus einem äußeren Ring, der sich in vier identischen, regulatorischen Untereinheiten gliedert und wird als SURx bezeichnet. Der innere Ring, der sich wiederum aus vier identischen Untersegmenten zusammensetzt, ist für die Exprimierung der Kanalporen verantwortlich und wird als Kir6.x bezeichnet. Großteils wird das porenbildende Kir6.2. im Gewebe exprimiert. Die regulierenden SUR-Untereinheiten treten hingegen in mehreren Isoformen auf.

- SUR1 in β-Zellen der Bauchspeicheldrüse
- SUR2A in Skelett- und Herzmuskelzellen
- SUR2B in der glatten Muskulatur der Blutgefäße

(Seino und Miki 2003)

Das Nukleotid Adenosintriphosphat (ATP) ist endogener Ligand an diesem Rezeptor. Durch dessen intrazellulären Konzentrationsanstieg werden ATP-sensitive-Kaliumkanäle verschlossen und Kalium kann nicht mehr aus der Zelle ausströmen. Als Folge kommt es zur Depolarisation der Plasmamembran und zur Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle (Nelson et al. 1995). Dieser Vorgang ist sowohl an der Insulinsekretion als auch an der ischämischen Prävention des Herzens und des Gehirns beteiligt und reguliert den glattmuskulären Gefäßtonus (Kane et al. 2005).

Es gibt jedoch weitere Studien, die darauf hindeuten, dass der Wirkmechanismus von Schwefelwasserstoff nicht nur auf Blockade ATP-abhängiger-Kaliumkanäle beruht. Bei der Relaxation von pulmonalen Rattenaorten wird ein Zusammenhang zwischen NO und H₂S beobachtet und auch Ali et al berichten in einer Studie, dass das Gasmolekül über das NO-System einen vasodilatierenden Effekt auf die Gefäße ausübt (Ali et al. 2006 und Wang et al. 2008).

Durch die Gabe von Natriumhydrogensulfid (NaHS), ein Schwefelwasserstoffdonator, kam es bei einer künstlich hervorgerufenen pulmonalen Hypertonie zu einer Linderung der Symptome (Huang et al. 2008).

Die pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) gehört laut WHO zur den Orphan Diseases.

Per Definition ist diese Krankheit durch einen erhöhten Widerstand im kleinen Kreislauf bedingt. Man spricht von einer pulmonalen Hypertonie, wenn der mittlere Blutdruck in der Lungenschlagader in Ruhe über 25 mmHg und bei körperlicher Anstrengung auf über 30 mmHg ansteigt. Die Herzauswurfleistung nimmt im Bereich von 50-70 mmHg kontinuierlich ab. Dies führt zu einer starken Einschränkung der Leistungsfähigkeit, Kreislaufstörungen, Müdigkeit, Ödeme und im Akutfall zu Angina pectoris (Actories et al. 2009). PAH geht in den meisten Fällen mit einer Rechts-Herzinsuffizienz oder Cor pulmonale (Lungenherz) einher (Konietzko et al. 1994).

Pathophysiologisch kommt es bei einer chronischen PAH zu einer Zunahme der Gefäßmuskulatur, gefolgt von einer Umwandlung zum Bindegewebe. Das Gefäßlumen verkleinert sich zunehmend und resultiert schließlich in eine Druckerhöhung im kleinen Kreislauf (Mutschler et al. 2008).

Oft erkranken Personen an pulmonaler Hypertonie als Folge von COPD, Lungenembolie, Asthma oder Lungenfibrose.

Die Ursache der primären pulmonalen Hypertonie ist noch nicht gänzlich geklärt (Mutschler et al. 2008).

Patienten mit PAH haben eine schlechte Überlebenschance. Nur 30-50% der Erkrankten überleben die ersten 5 Jahre. Um die Lebenserwartung zu erhöhen muss eine Transplantation durchgeführt werden (Mutschler et al. 2008).

Bei der Therapie von PAH ist grundsätzlich wichtig, dass eine zu pulmonalen Hypertonie führende Grunderkrankung rechtzeitig therapiert wird. Dabei ist es wichtig die pulmonalen Gefäße zu dilatieren um somit eine ausreichende Blutzirkulation bzw. Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Eine Therapie mit einem Schwefelwasserstoffdonator wäre demzufolge eine neue Option der Behandlungsmöglichkeit.

Bis dato stehen nur eine begrenzte Anzahl an Präparaten zur Verfügung, deren Wirksamkeit auch nur bedingt belegt ist (Mutschler et al. 2008).

- Iloprost (Prostacyclinderivat)
- Bosentan (Endothelinantagonist)
- PDE-5-Hemmer wie Sildenafil

Setzt die Medikation jedoch zu spät ein, kann der Patient nicht mehr geheilt werden. Es ist nur mehr eine palliative Behandlung oder eine Lungen- oder Herz-Lungen-Transplantation möglich.

2. Zielsetzung

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde die Testsubstanz MAH10.HCl hinsichtlich ihrer pharmakologischen Aktivität geprüft.

Aufgrund der Ähnlichkeit des menschlichen Organismus mit dem der Meerschweinchen, wurde die Substanz an isolierten Meerschweinchenorganen getestet. Für die erfolgreiche Durchführung der Versuche musste die Reproduzierbarkeit gewährleistet sein. Diese basierte auf exakter Präpariertechnik und korrekter Handhabung der Geräte.

Die Auswirkung der Testsubstanz auf die Chronotropie bzw. Inotropie wurde anhand der Herzmuskelpräparate getestet. Zu diesen zählten der rechte Vorhof und der Papillarmuskel.

Ob die Substanz eine spasmolytische Wirkung auf den menschlichen Organismus ausübt, wurde am terminalen Dünndarm geprüft.

Der vasodilatierende Effekt der Testsubstanz wurde an der Aorta und der Lungenarterie erforscht.

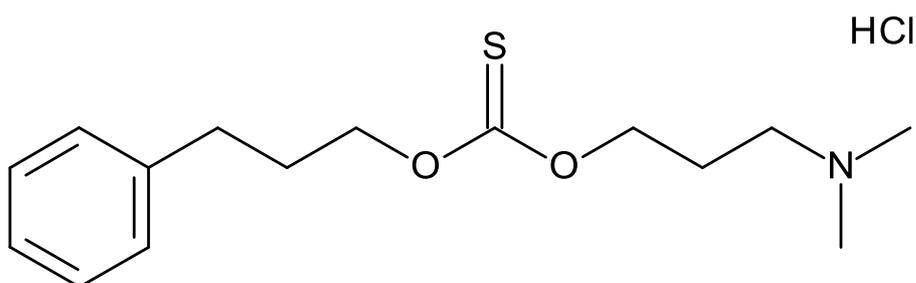
Da die Substanz hydrolytisch Schwefelwasserstoff freisetzen könnte, muss bzw. kann man annehmen, dass der Wirkmechanismus auf der Blockade von ATP-sensitiven-Kaliumkanälen beruht. Diese Annahme wurde mit Hilfe des Kanalkanalblockers Glibenclamid überprüft.

3. Material und Methodik

3.1. Testsubstanz

Die Arbeitsgruppe am Department für Medizinische und Pharmazeutische Chemie unter der Leitung von Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker stellte die zu testende Substanz zur Verfügung.

3.1.1. MAH10.HCl



3-(Dimethylamino)propoxy-3-phenylpropoxy-methanthioat Hydrochlorid

Abbildung 1: Chemische Struktur und Nomenklatur von MAH10.HCl

3.1.2. Lösungsmittel

Die benötigten Stammlösungen meiner Testsubstanz MAH10.HCl wurden jeden Tag frisch zubereitet, um ein reproduzierbares Ergebnis zu erhalten. Dazu wurde die Testsubstanz in 100 µl Lösungsmittel gelöst. Für meinen Wirkstoff diente Wasser als Lösungsmittel.

Die Einwaage der Substanz war abhängig vom Volumen der Organbäder. Somit richtete sich die Berechnung nach dem Fassungsvermögen, das 8 ml beziehungsweise 25 ml betrug.

Zusätzlich musste die Substanzmenge so berechnet werden, damit nach kumulativer Zugabe die Konzentration in den Organbädern 100 $\mu\text{mol/l}$ ergab.

Tabelle 1: Stammlösungen

Substanz	Molare Masse	Volumen Organbad (ml)	Einwaage Substanz (100 μmol)
MAH10.HCl	317,12 g/mol	8	0,79 mg
		25	0,25 mg

Nach einer konstanten Kontrollphase wurde in einem zeitlichen Abstand von 45 Minuten 100 μl der Stammlösung kumulativ zugesetzt. Der Reihe nach wurden 3 μl , 7 μl , 20 μl und schließlich 70 μl mit einer Kolbenhubpipette in das Organbad zugespritzt. Man kann davon ausgehen, dass sich innerhalb der 45 Minuten ein Fließgleichgewicht (steady state) eingestellt hat.

Die jeweilig erreichten Konzentrationen, nämlich 3 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$, übten auf die verschiedenen Organe des Meerschweinchen einen Effekt aus, den man mit Hilfe eines Graphen messen konnte. So wurde am Vorhof ein chronotroper und am Papillarmuskel ein inotroper Effekt gemessen. An den Organen mit glatter Muskulatur, nämlich Darm, Aorta und Lungenarterie wurde eine vasodilatierende Wirkung ermittelt.

Tabelle 2: Darstellung des Pipettierschemas

Zugegebene Menge (100 μl der Substanzlösung)	Endkonzentration (100 $\mu\text{mol/l}$)
3 μl	3 $\mu\text{mol/l}$
7 μl	10 $\mu\text{mol/l}$
20 μl	30 $\mu\text{mol/l}$
70 μl	100 $\mu\text{mol/l}$

3.2. Versuchstiere

Um die Versuche im Rahmen der Diplomarbeit durchführen zu können, wurden Meerschweinchen des Stammes TRIK verwendet.

Meerschweinchen sind dem menschlichen Organismus sehr ähnlich. Schaut man sich das Herz genauer an, erkennt man physiologische Gemeinsamkeiten, vor allem was die Ionenkanalverhältnisse am Herzen, insbesondere die Kaliumkanäle, betrifft.

Die Meerschweinchen wurden am jeweiligen Versuchstag durch einen gezielten Genickschlag getötet. Dieser Tötungsvorgang wurde nur durch ein hochqualifiziertes Personal durchgeführt, wodurch ein schneller und schmerzfreier Tod gewährleistet war.

Sofort nach Todeseintritt wurde der Thorax mit einer Schere geöffnet und Lunge und Herz entnommen.

Weiters wurde ein 20 cm langes Stück des Krummdarms entnommen, dessen Ende zur besseren Handhabung mit einer Schnurr versehen wurde.

Zum Schluss wurde die thorokale Aorta herausgeschnitten. Alle Organe wurden sofort in eine begaste Elektrolytlösung (Kapitel 3.3) gelegt und bis zur weiteren Präparation dort belassen.

3.3. Physiologische Elektrolytlösung

Wie bereits in Kapitel 3.2 besprochen wurden die entnommenen Organe sofort in die begaste Nährlösung gegeben. Begast wurde mit einem Gemisch aus 95% Sauerstoff und 5% CO₂.

Diese physiologische Nährlösung ist wichtig um die Organe optimal mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen und den pH-Wert aufrechtzuerhalten. Dieser sollte zwischen 7,2 und 7,4 liegen. Das Überleben der Organe ist somit über einen Zeitraum von ungefähr 6 Stunden gewährleistet. Es ist darauf zu achten, dass die Organe sowohl während der Dauer der Lagerung, der Bearbeitung, sowie auch während der Versuchsreihen mit ausreichend Nährlösung umgeben sind.

Diese Nährlösung ist laut Definition eine abgeänderte Krebs-Henseleit-Lösung und wird auch als Tyrode bezeichnet, die nach Maurice Vejux Tyrode benannt ist.

Tabelle 3: Bestandteile der Nährlösung (Tyrode)

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

Tabelle 4: Zusammensetzung für 2 Liter

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

Am Beginn jeden Arbeitstages wurde die Tyrode, unter Einhaltung einer ganz bestimmten Reihenfolge frisch zubereitet, da ansonsten eine Trübung entstand und somit die Tyrode nicht zu verwenden war.

Zuerst wurden die Stammlösungen des NaHCO₃, KCl und NaCl in einem 2 l-Messkolben gemischt. Anschließend wurde die Glucose, MgSO₄, KH₂SO₄ zugegeben und der Messkolben circa dreiviertel voll mit destilliertem Wasser befüllt. Daraufhin wurde 20 Minuten mit Oxymix (Kapitel 3.6.4) begast um eine gesättigte Lösung zu erhalten. Während der Begasung wurde die vorgeschriebene Menge des

CaCl₂ mittels automatischer Kolbenhubpipette zugegeben. Man musste penibelst darauf achten, dass diese Stammlösung tropfenweise hinzugefügt wurde, damit es zu keiner Bildung von schwerlöslichen Calciumsalzen kam. Diese führten zur Trübung der Tyrode. Schlussendlich wurde der 2 l-Messkolben bis zur Markierung mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

3.4. Kaliumchloridlösung

Um die glatte Muskulatur der Aorta descendens, der Arteria pulmonalis und des terminalen Ileums maximal zu kontrahieren, mussten die Organe mit einer Kaliumchloridlösung chemisch gereizt werden. Diese Lösung war dafür verantwortlich, dass sich eine konstante Kontraktion einstellte, die für die Durchführung der Versuche notwendig war.

Jeden Tag wurden 2 Kaliumchloridlösungen von unterschiedlicher Konzentration hergestellt. Eine 60 mmolare Lösung diente für die Versuche am Darm, eine 90 mmolare für die Aorta- und Pulmonalispräparate. Zur Bereitung der Lösung wurde die entsprechende Menge KCl in einen 100 ml-Messkolben eingewogen und mit der Tyrode aufgefüllt.

Tabelle 5: Bestandteile der Kaliumchloridlösung

Organpräparat	KCl-Einwaage (g)	Volumen der Nährlösung (ml)
terminales Ileum	0,45	100
Aorta descendens	0,67	100
Arteria pulmonalis	0,67	100

3.5. Verwendete Organe

Den Versuchstieren wurden jeden Tag nach Eintritt des Todes Herz, Lunge, Dünndarm und Aorta entnommen und daraus Vorhof, Lungenarterie, Aorta, Dünndarm und Papillarmuskel präpariert. Da die Versuche nicht am lebenden Tier, sondern nur an den entnommen Organen durchgeführt wurden, handelt es sich bei meiner Versuchsreihe um einen „exvivo“ Versuch.

3.5.1. Präparation und verwendete Materialien

Die Organe wurden in der Reihenfolge wie in Kapitel 3.5 bereits beschrieben dem Meerschweinchen entnommen und in die vorbereitete Nährlösung, die mit Oxymix versetzt worden war, gelegt. Danach konnte man zur Präparation übergehen.

Dafür entnahm man das benötigte Organ aus der begasten Tyrode und befestigte es mit zwei Präpariernadeln an einem Kork, mit dem die Petrischale ausgelegt worden war. Dieser Kork wurde mit einem seitlich liegenden Gummischlauch fixiert und somit ein Verrutschen verhindert. Um die Organe während des Präparationsvorganges optimal zu versorgen, wurde die Petrischale mit Tyrode befüllt.

Während der Präparation wurde ein Auflichtmikroskop verwendet um die Arbeit sauber und genau durchführen zu können. Als Präparierbesteck dienten Präpariernadeln, verschiedene Scheren und Pinzetten.



Abbildung 2: Auflichtmikroskop, Petrischale und Präparierbesteck

3.5.1.1. Atrium cordis dextrum (Rechter Vorhof)

Herz und Lunge wurden gemeinsam aus dem Thorax des Versuchstieres entfernt. Mit einer Schere wurde dann überschüssiges Fettgewebe, die Lunge beziehungsweise Lungenfragmente entfernt, sodass das Herz freigelegt wurde. Dieses wurde dann mit zwei Präpariernadeln an der Basis und an der Spitze auf der Korkunterlage fixiert und der Vorhof mit dem darauf befindlichen Sinusknoten isoliert. Dabei war es von besonderer Bedeutsamkeit, dass das Herz nicht gedehnt oder anderweitig verletzt wurde, da sonst die Spontanaktivität des Sinusknoten verloren gegangen wäre und das Präparat für weitere Versuche nicht brauchbar wäre.

Der isolierte Vorhof wurde schließlich für weitere Präparationen in einer extra Petrischale, die mit Tyrode befüllt war, befestigt. Dafür wurden beide Enden mit einem Faden versehen und daran je ein Silberhäkchen eingefädelt, die mittels Knoten fixiert wurden.

Der fertig präparierte Vorhof wurde sofort in eine Nährlösung gegeben und zum Organbad transportiert.

3.5.1.2. Arteria pulmonalis (Lungenarterie)

In meiner Versuchsreihe wurde für die Lungenarterie nur der Truncus pulmonalis verwendet, das ist derjenige Teil, der direkt aus dem rechten Ventrikel entspringt. Um zur Lungenarterie zu gelangen musste das bereits für den Vorhof herangezogene Herz noch von dem restlichen Fettgewebe befreit werden. Im Unterschied zur Aorta, deren Länge circa 2 bis 3 cm betrug, lag hier nur 1 cm der Arterie frei. Nach dem Entfernen des überschüssigem Fett- und Muskelgewebes und etwaigen Blutgerinnseln am Pulmonalisring wurden ringförmige Präparate von zwei bis drei Millimeter abgeschnitten und in eine begaste Nährlösung übergeführt.

3.5.1.3. Musculus papillaris (Papillarmuskel)

Zum Schluss wurden nach der Isolierung des Vorhofes und der Lungenarterie die Papillarmuskeln präpariert. Dafür wurde das Herz über die Arteria pulmonalis entlang des Septums geöffnet und beide Herzkammern freigelegt. Austretendes Blut trübte die Tyrode und wurde daher gewechselt. Da die Purkinje-Fasern eine Spontanaktivität aufweisen und das unsere Versuchsreihe negativ beeinflusst hätte, mussten eventuell vorhandene Fasern sowie auch fremdes Gewebe entfernt werden. An den Muskelansätzen wurde mit Hilfe einer Pinzette Bindefäden befestigt, die jeweils mit einem Silberhäkchen versehen wurden. Anschließend schnitt man mit einer Schere die Muskeln heraus. Je nach Größe des Versuchstieres konnte man 3-5 Papillarmuskeln isolieren. Die Präparate wurden in einer Nährlösung unter Begasung aufbewahrt.

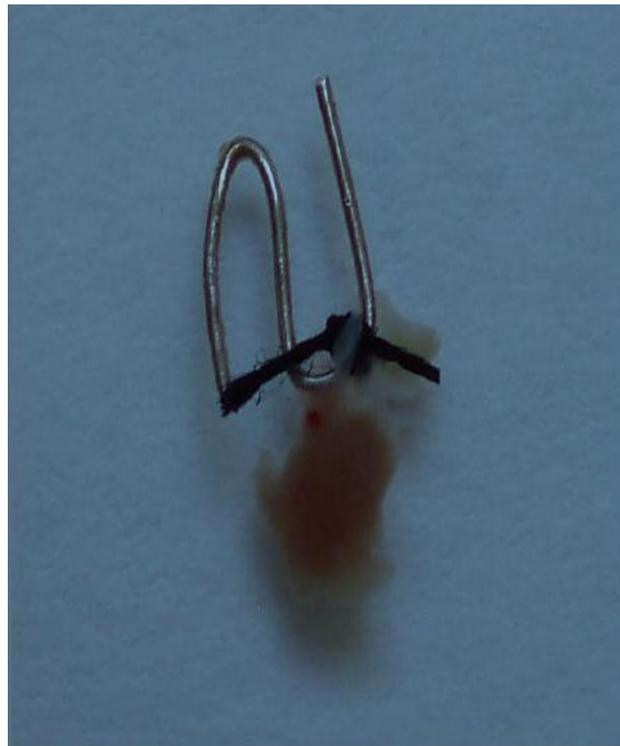


Abbildung 3: fertig präparierter Papillarmuskel

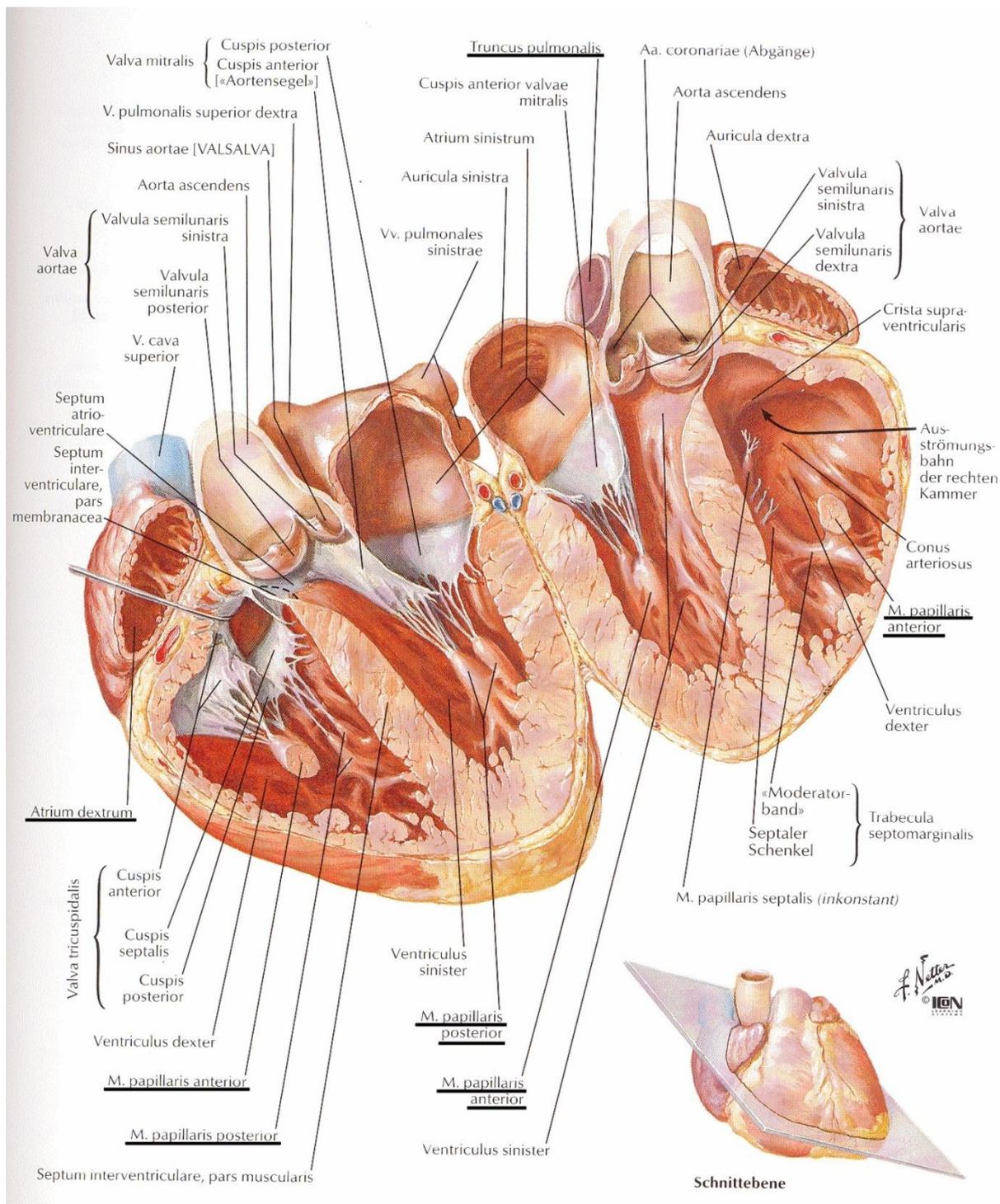


Abbildung 4: Darstellung des Herzens (Netter FH 2003)

3.5.1.4. Terminales Ileum (Dünndarm)

Der Bauchraum wurde nach dem Entfernen des Herzens sorgsam mit einer Schere weiter geöffnet. Für meine Versuchsreihe wurde der terminale Teil des Ileums, der Krummdarm verwendet. Dieser liegt zwischen Jejunum (Leerdarm) und Intestinum tenue (Dickdarm).

Mit der Hand wurde der benötigte Teil des Dünndarms herausgenommen und mit einer Schere ein circa 20 cm langes Stück herausgeschnitten. Das Ende des Organs wurde mit einem Faden befestigt, das einerseits zur besseren Handhabung, andererseits zur Markierung des richtigen Endes diente. Wie auch bei den anderen Organen wurde auch hier der Darm sofort in eine begaste Elektrolytlösung gelegt.

Für die Präparation wurde ein 1 cm langes Stück mit einer Schere abgeschnitten. Dabei war darauf zu achten, dass die Enden schräg abgeschnitten wurden, um ein Einrollen der Enden zu vermeiden und die Nährlösung mit dem Wirkstoff gut durch die Öffnung zirkulieren konnte. Diese Enden wurden mit zwei Präpariernadeln am Kork fixiert und mit der gleichen Vorgehensweise wie beim Vorhof (Kapitel 3.5.1.1.) Silberhäkchen angebracht. Während der Präparation war es von großer Wichtigkeit den Darm nicht zu stark zu dehnen, da sonst Muskelfasern, die für die positive Durchführung des Versuches notwendig waren, verletzt worden wären. Zusätzlich war darauf zu achten die Öffnung durch das Anbringen der Silberhäkchen nicht zu verschließen oder abzubinden. Dies konnte überprüft werden, indem man das Darmstück mit Hilfe einer Pipette ein wenig mit Nährlösung durchspülte. Durch diesen Vorgang wurde der Darm von eventuell zurückgebliebenen Darmresten (Chymus) befreit.

3.5.1.5. Aorta descendens (Aorta)

Abschließend wurde die thorakale Aorta entlang des Rückgrats herausgeschnitten. Man durchtrennte die Aorta, zog das Ende vorsichtig in die Höhe und schnitt millimeterweise entlang der Wirbelsäule mit einer spitzen Schere ein 3 cm langes Stück heraus. Während dieser Präparation musste der Thorax überdehnt werden, um die Aorta gut erreichen zu können. Generell war hierbei aufzupassen, dass die Aorta nicht zu stark gedehnt und nicht mit Löchern versehen wurde.

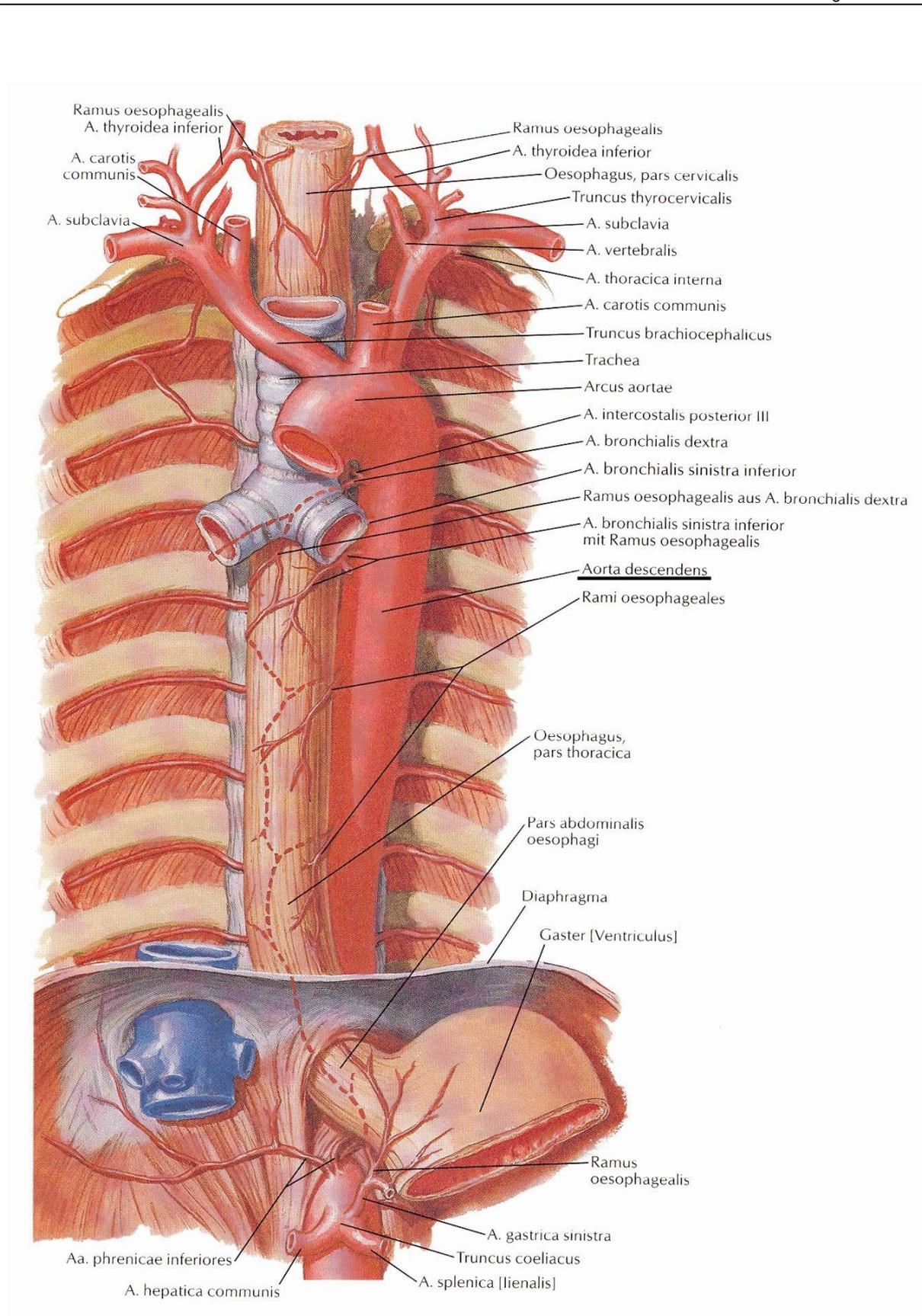


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Aorta (Netter FH 2003)

Die Aorta wurde mit 2 Präpariernadeln am Kork der Petrischale, die mit Nährlösung befüllt ist, befestigt. Mit einer Federgriffschere wurde nun das überschüssige Binde-, Muskelgewebe sowie Blutgerinnsel unter dem Auflichtmikroskop entfernt und die gesäuberte Aorta in 1-2 mm breite Ringe geschnitten. Die isolierten Organe wurden in der begasten Elektrolytlösung aufbewahrt.

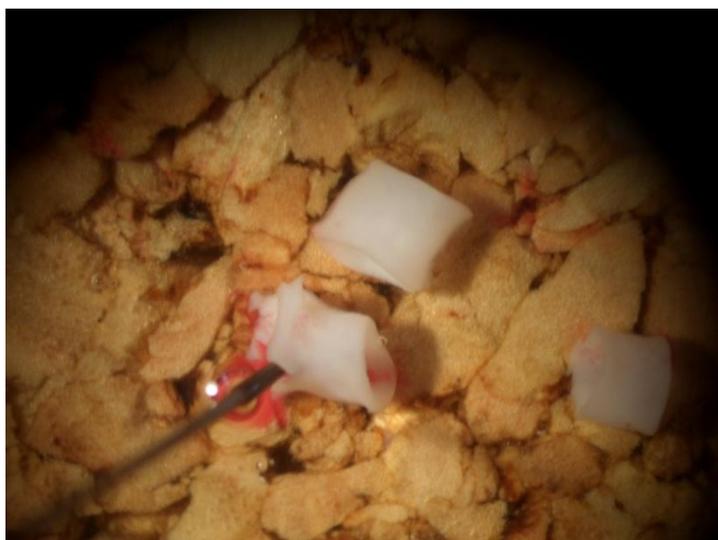


Abbildung 6: Originalabbildung der präparierten Aorta

3.6. Verwendete Apparaturen

Für meine Versuchsreihe standen zwei verschiedene Apparaturen zur Verfügung. Die Apparatur A wurde für den Papillarmuskel verwendet. Darm, Aorta, Pulmonalis und Vorhof wurden in Apparatur B eingespannt.

Über einen Silberdraht wurden die Organe mit dem Kraftwandler verbunden. Dieser wandelte das mechanische Signal in ein elektrisches Signal um und gab den elektrischen Impuls an den Amplifier weiter. Das Signal wurde durch den Amplifier verstärkt, daher auch das Synonym Verstärker. Letztendlich wurde das verstärkte Signal mittels Schreiber auf Millimeterpapier aufgezeichnet.

Für die Reproduzierbarkeit war es von besonders großer Wichtigkeit, dass Temperatur, pH-Wert, Zusammensetzung der Tyrode und konstante Sauerstoffversorgung gewährleistet waren.

3.6.1. Apparatur A

Wie bereits in Kapitel 3.6 erwähnt wurden mit dieser Apparatur nur Versuche am Papillarmuskel durchgeführt.

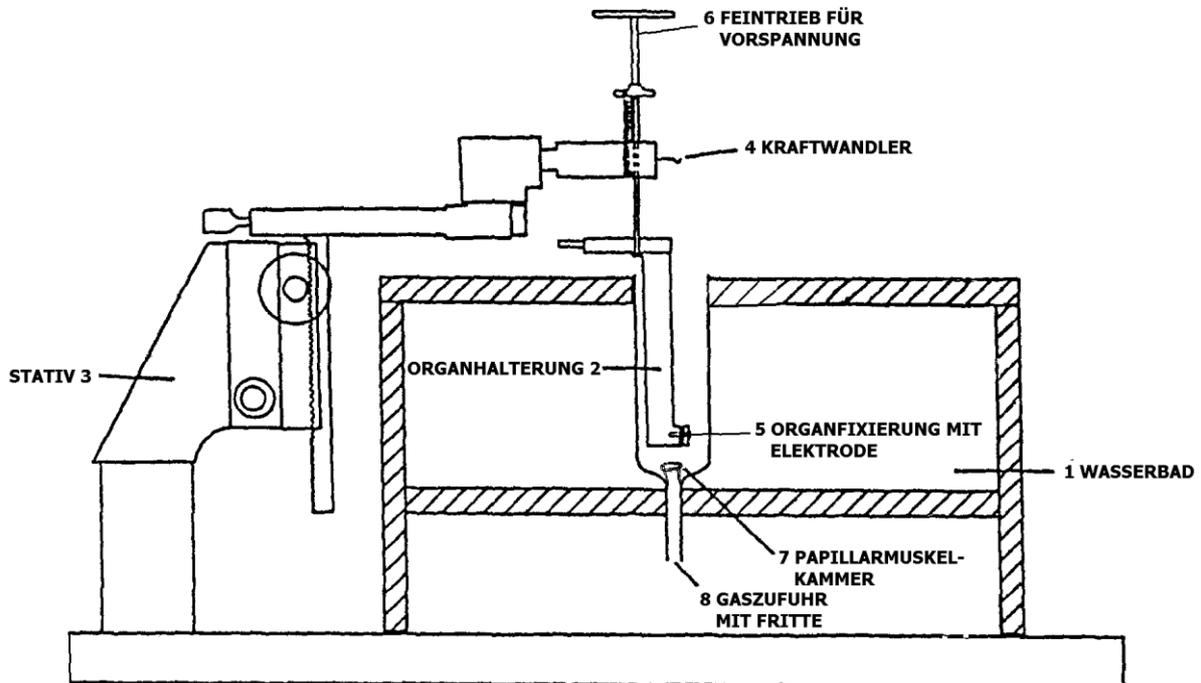


Abbildung 7: Skizze der Apparatur A

Das Gerät setzt sich grob aus einer Wasserbadwanne, bestehend aus Acrylglas, und aus einer Muskelkammer, die ein paar Zentimeter tief in das Wasser hineinragt, zusammen.

Über ein Stativ sind der Feintrieb, der Kraftregler und die Organhalterung angebracht.

Die Muskelkammer hat ein Fassungsvermögen von 25 ml. Bereits zehn Minuten vor Versuchsbeginn wird das Organbad mit 25 ml Tyrode befüllt und sogleich mit Oxymix begast. Die Temperatur des Wasserbades wird über ein Thermostat konstant auf $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ gehalten und ermöglicht so physiologische Bedingungen.

Die Präparation des Papillarmuskels wurde bereits in Kapitel 3.5.1.3 beschrieben. Über ein Silberhäkchen wurde der Muskel an die Organhalterung, den Silberdraht, angebracht. Die Spitze des Muskels wurde zwischen einer Elektrode und einem Plexiglasplättchen vorsichtig befestigt. Dabei war darauf zu achten, dass das Organ flach an der Elektrode anlag.

Nach der erfolgreichen Einspannung wurde der Papillarmuskel in die erwärmte Tyrode eingetaucht. Da der Papillarmuskel von selbst keine Regung zeigt, wurde dieser mit einem Accupulser Stimulator, Model Isostim 301T, WPI, Hamden,CT, USA elektrisch gereizt und zur Kontraktion gebracht.

Über den Silberdraht wurde das mechanische Signal, die Inotropie, auf den Kraftwandler übertragen, in ein elektrisches Signal umgewandelt und mittels Schreiber auf Millimeterpapier aufgezeichnet.

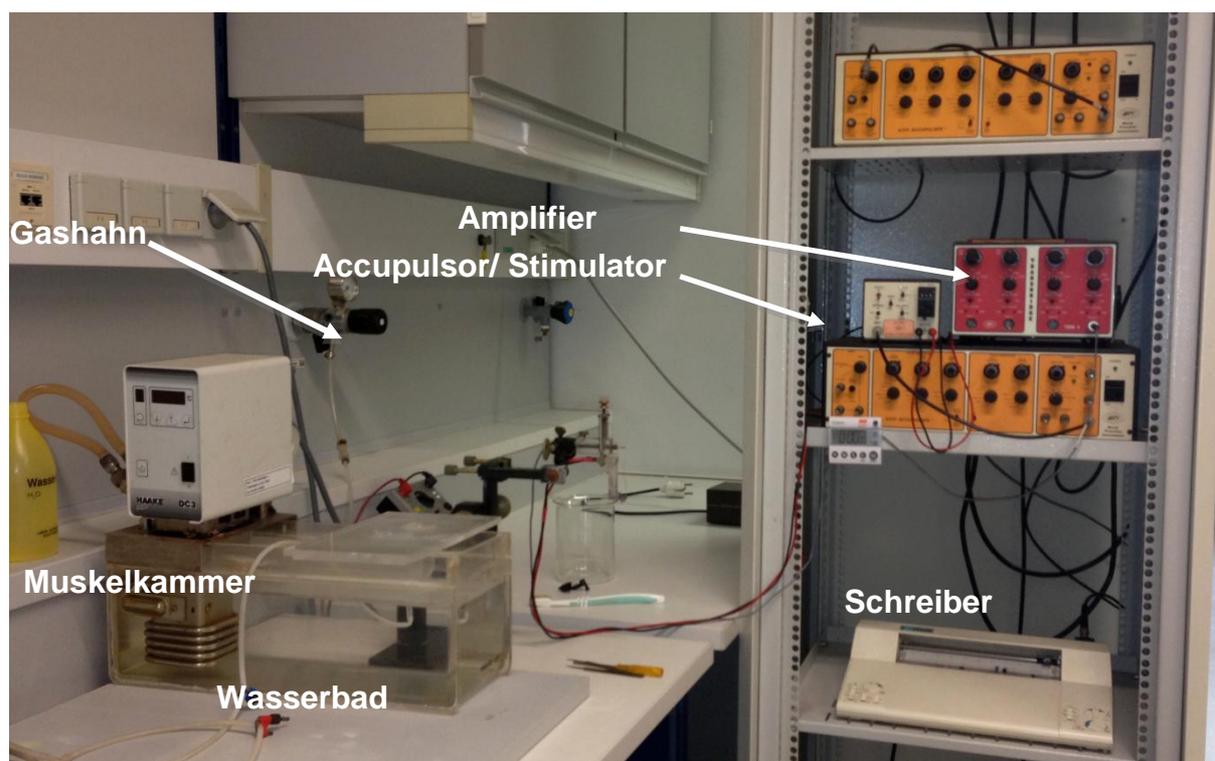


Abbildung 8: Originalabbildung der Versuchsapparatur A

3.6.2. Apparatur B

Apparatur B stand nur für die Versuchsreihe am Darm, Aorta, Lungenarterie und rechten Vorhof zur Verfügung.

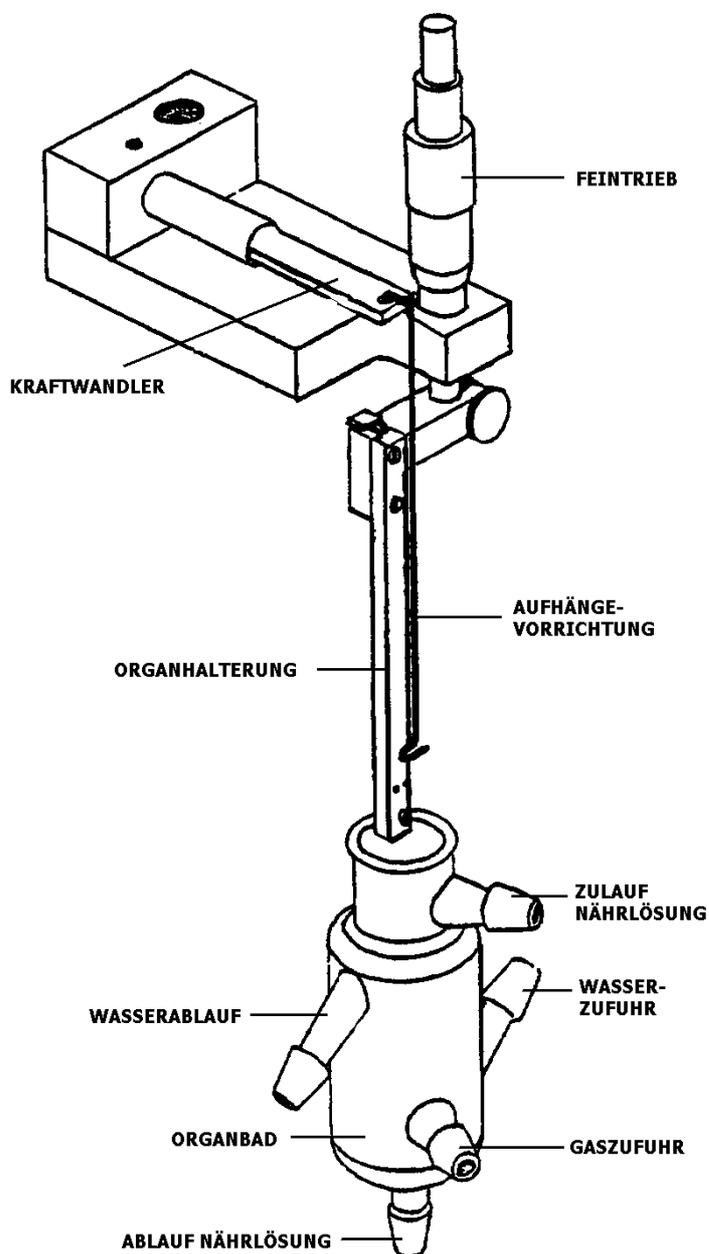


Abbildung 9: Skizze der Apparatur B

Der große Unterschied zur Apparatur A ist, dass hier das Organbad nicht in ein Wasserbad taucht um auf gleicher Temperatur gehalten zu werden, sondern über ein

Schlauchsystem wird das Wasser konstant auf 37 °C temperiert. Weiters fehlt ihr der Accupulser, da die Organe nicht elektrisch gereizt werden müssen.

Darm und Vorhof wurden über zwei Silberhäkchen (Präparation siehe Kapitel 3.5.1.1 und 3.5.1.4) an der Aufhängevorrichtung angebracht, während die Aorta und die Pulmonalis direkt durch Einfädeln an den Silberdrähten befestigt werden konnten. Nach erfolgreicher Einspannung, wurde das jeweilige Organ in die bereits mit Tyrode befüllten und temperierten Organbäder abgesenkt. Mittels Feintrieb konnte nun die für jedes Organ benötigte Vorspannung angelegt werden. Dieser Schritt war für die Reproduzierbarkeit sehr wichtig.

Wie auch bei Apparatur A sind die Silberdrähte mit dem Kraftwandler verbunden und leiten somit ein mechanisches Signal weiter. Beim Vorhof konnte somit eine Veränderung der Schlagfrequenz und bei den Gefäßen bzw. Darm eine Veränderung des Gefäßtonus festgestellt werden, die vom Schreiber aufgezeichnet wurde.

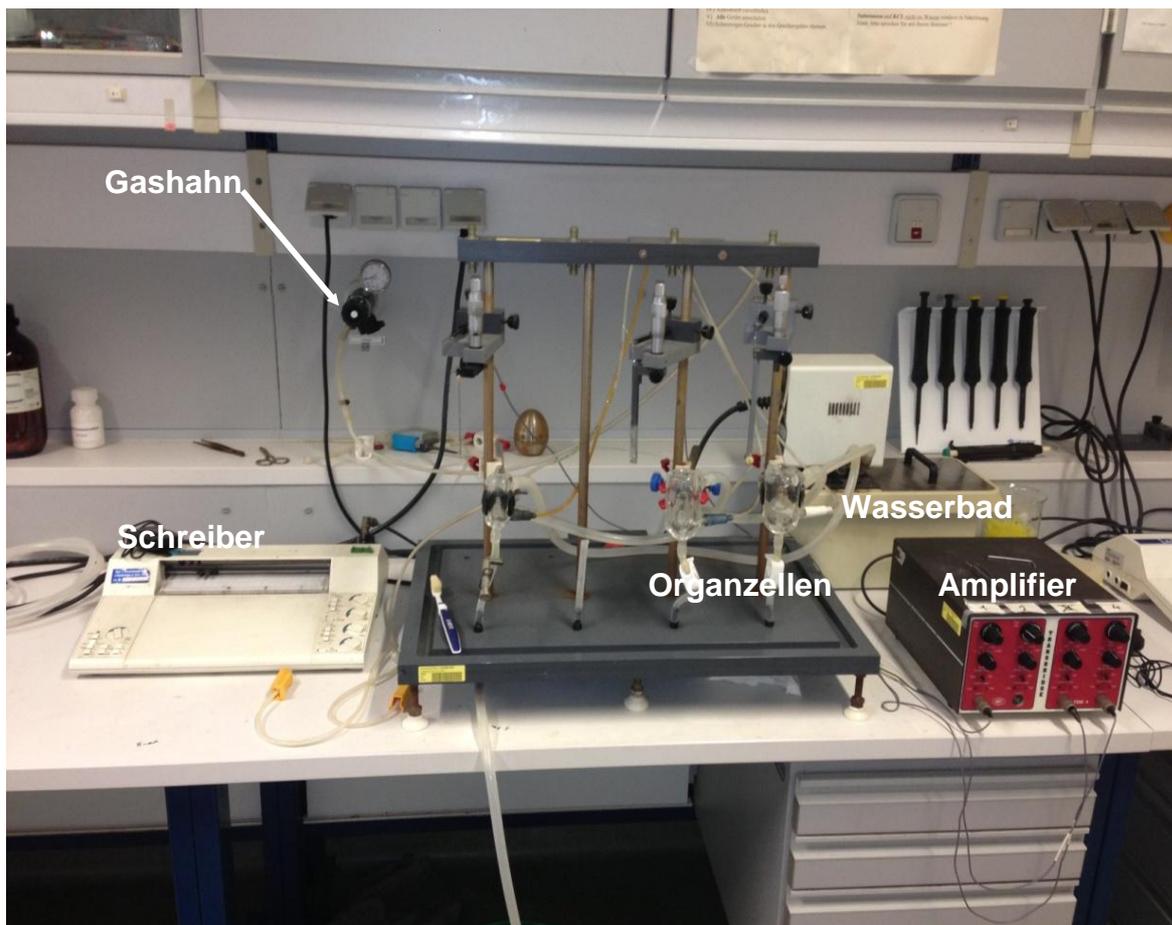


Abbildung 10: Originalabbildung der Versuchsapparatur B

3.6.3. Der Kraftwandler

Während der einzelnen Versuche erhält man lediglich ein mechanisches Signal. Um dieses Signal aufzeichnen zu können wird es mittels Kraftwandler in eine elektrische messbare Größe überführt. Diese Umwandlung funktioniert über einen Widerstandswandler. Dieser misst die Veränderung des Dehnungsmessstreifens, der auf mechanische Kontraktion reagiert. Es kommt schließlich zu einer Veränderung im Stromfluss.

Der Kraftwandler leitet nun den Impuls zu einem Verstärker (4-Channel Transducer Amplifier, Firma WPI) weiter, der das Signal intensiviert. Dieses wird schlussendlich über einen Flachbettstreiber der Firma Kipp & Zonen (Flatbed Recorder Modell BD 112) auf Millimeterpapier übertragen.

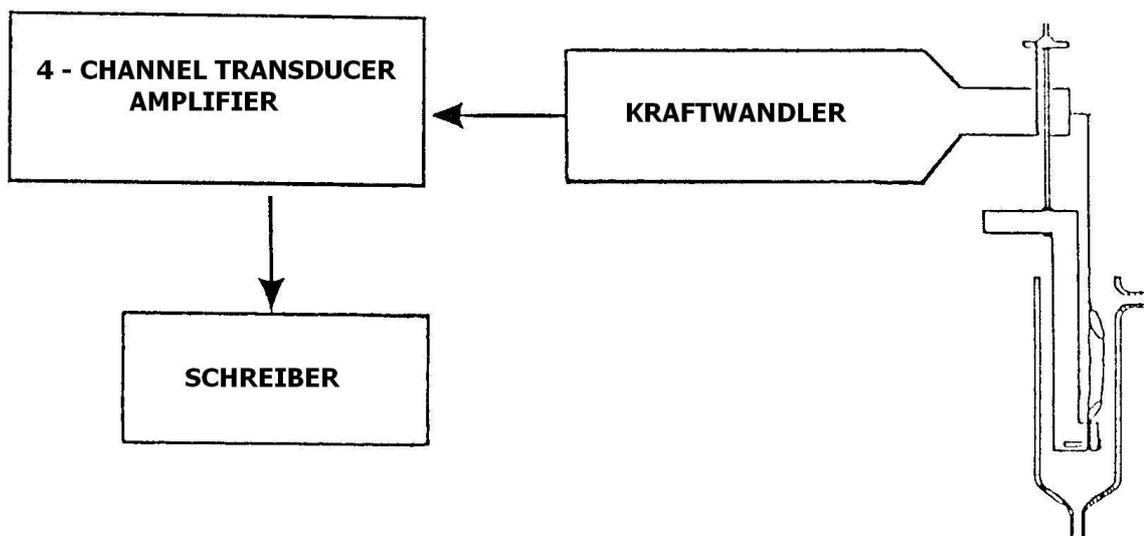


Abbildung 11: Skizze des Kraftwandlers

3.6.4. Versorgung mit Oxymix

Damit die Organe auch außerhalb des lebenden Organismus überleben können, werden sie, wie bereits erwähnt, in eine Tyrode gelegt, die mit einem Gasgemisch, dem Oxymix, begast wird. Das Oxymix besteht aus einem Gemisch von 95% O₂ und 5% CO₂. Die Begasung sorgt dafür, dass das Organ ausreichend mit Sauerstoff versorgt wird und im Nährmedium ein konstanter physiologischer pH-Wert von ungefähr 7,2 bis 7,4 vorherrscht.

Auch während der Versuche wird die Sauerstoffversorgung über Schläuche immer gewährleistet. Die Stärke der Luftzufuhr konnte über Glasfritten, welche als Art Filter dienten und über Schraubklemmen geregelt werden. Ein Leck im Schlauchsystem oder das Vergessen die Gaszufuhr einzuschalten, hätte verheerende Folgen für den Versuchsablauf, nämlich das vorzeitige Absterben des Organes. Daher musste die Begasung mit Oxymix lückenlos erfolgen.

3.7. Durchführung der Versuche

Im nachfolgenden Kapitel wird auf die genaue Beschreibung der Versuchsabläufe eingegangen.

Die Organbäder wurden vor jedem Versuchsbeginn sorgfältig von eventuellen Rückständen gereinigt. Zuerst spülte man die Organbäder zwei Mal mit destilliertem Wasser und einmal mit Tyrode durch. Schlussendlich wurden die Organbäder mit dem nötigen Volumen der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung, 8 ml beziehungsweise 25 ml, befüllt und mittels Wasserbad entsprechend temperiert.

3.7.1. Untersuchung der Wirkstärke von MAH10.HCl auf die isolierten Meerschweinchenorgane– Versuchsablauf

3.7.1.1. Versuchsablauf am Atrium cordis dextrum

Der Vorhof wurde wie in Kapitel 3.5.1.1 beschrieben präpariert, mit den Silberhäkchen an den Organhalterungen der Apparatur B eingespannt und sogleich in die begaste und temperierte Tyrodelösung abgesenkt. Dabei musste unbedingt darauf geachtet werden, dass der Vorhof nicht überdehnt wurde, da sonst die Spontanaktivität des Sinusknoten verloren gegangen wäre. Der Vorhof musste nicht elektrisch gereizt werden, sondern schlug spontan.

Nach erfolgreicher Organeinspannung konnten die Geräte eingeschaltet werden. In Abhängigkeit von den unterschiedlichen Organen mussten verschiedene Einstellungen vorgenommen werden. Als erstes musste der Schreiber auf 5mV und die Schreibgeschwindigkeit auf 5mm/sec gestellt werden. Der Amplifier wurde mit einem Kippschalter zugeschaltet und der Schreiber auf den Nullpunkt gesetzt. Anschließend wurde die Vorspannung angelegt, um eine Reproduzierbarkeit zu

gewährleisten. Diese betrug 10,4 mN. Mittels Drehrad am Amplifier wurde der Nullpunkt nachjustiert.

Es folgte nun eine 45-minütige Gewöhnungsphase, in der sich der Vorhof auf die vorherrschenden Bedingungen im Organbad einstellen konnte. Nach dieser Zeitspanne konnten die Messungen begonnen werden. Dafür wurde der Schreiber auf das Papier aufgesetzt und die Schlagfrequenz wurde nun 12 Sekunden lang mit einem Speed von 5 mm/sec gemessen. Dies entsprach auf dem Millimeterpapier 6 Kästchen (= 6 cm). Die Messung wurden insgesamt 7 Mal oder bis zur Schlagkonstanz durchgeführt und diente als Kontrollwert. Das heißt, dass die restlichen gemessenen Werte in Abhängigkeit vom Kontrollwert ausgewertet wurden. Dabei wurde die ermittelte Schlaganzahl mit dem Faktor 5 multipliziert und dadurch die Schlaganzahl pro 60 Sekunden, also pro Minute berechnet.

Nach der Kontrollwertmessung begann nun der eigentliche Versuch. Meine Substanz wurde kumulativ der Nährlösung zugesetzt. Das genaue Pipettierschema wurde bereits in Kapitel 3.1.2 näher erläutert. Zuerst begann man mit der geringsten Konzentration, die 3 μ l betrug. Alle 5 Minuten wurde nun die Schlagfrequenz aufgenommen. Nach 45 Minuten wurde die nächsthöhere Konzentration zugespritzt bis man die Konzentration von 100 μ mol/l im Organbad erreicht hat.

Während der Substanzzugabe musste man genauestens darauf achten, dass man weder den Vorhof, noch die Organhalterungen berührte, da dies Fehlströme erzeugen würde. Verfälschte Ergebnisse wären die Folge.



Abbildung 12: rechter Vorhof eingespannt in Apparatur B

3.7.1.2. Versuchsablauf am terminalen Ileum

Das isolierte Ileumstück wurde mit Silberhäkchen versehen (Kapitel 3.5.1.4) an denen das Organ in Apparatur B eingespannt und in das begaste Organbad, dessen Temperatur 37 °C betrug, getaucht wurde. Hierbei musste man wiederum aufpassen, den Darm beim Einspannen nicht allzu sehr zu dehnen, da sonst die glatte Muskulatur in Mitleidenschaft gezogen worden und es zu keinem Versuchsergebnis gekommen wäre.

Die Geräte wurden nun, wie in Kapitel 3.7.1. ausführlich erklärt, aktiviert, jedoch die Schreibgeschwindigkeit des Schreibers auf 1 Millimeter/Minute gestellt. Die Vorspannung betrug 4,92 mN. Während der 20 minütigen Akklimatisierungsphase, konnte sich der Schreiber verschieben, was auf eine Veränderung der Peristaltik hinwies. Der Nullpunkt musste daher nachjustiert werden.

Nach der Gewöhnungsphase wurde der Schreiber gesenkt, die Tyrode über einen Ablaufschlauch abgelassen und das Organbad mit exakt 25 ml einer 60 mmolaren Kaliumchloridlösung befüllt (Kapitel 3.4). Die Zugabe der Kaliumchloridlösung führte zu einer sofortigen Kontraktion der glatten Muskulatur, die mittels Flachbrettschreiber aufgezeichnet wurde. In den meisten Fällen waren die ersten Kontraktionen am stärksten und pendelten sich ungefähr bei der Hälfte der Anfangskontraktionsstärke ein. Um den Wirkstoff laut Pipettierschema nach Kapitel 3.1.2 kumulativ dem Organbad zusetzen zu dürfen, waren zwei Faktoren besonders wichtig. Einerseits musste die Kontraktion konstant sein. Diese Konstanz bzw. Plateauphase wurde nach ca. 45 - 60 Minuten erreicht. Andererseits musste die Kurve über 5 cm liegen, da ansonsten die Reproduzierbarkeit nicht gegeben war.

Ein Hinweis auf ein nicht zu verwendendes Organ war das schnelle Absinken der Kontraktion, das heißt die Kurve ging gegen null.

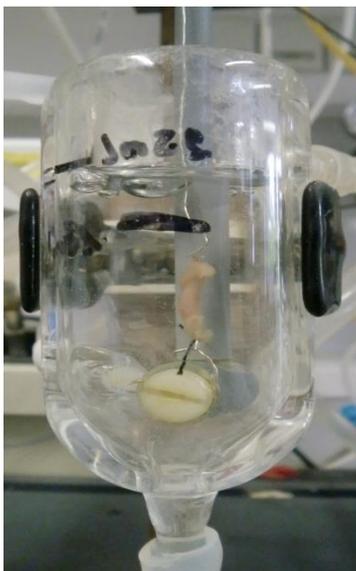


Abbildung 13: Terminalis Ileum eingespannt in Apparatur B

3.7.1.3. Versuchsablauf am Musculus papillaris

Auch dieses isolierte und nach Kapitel 3.5.1.3 präparierte Organ wurde mit Hilfe eines Silberhakens auf die Organhalterung der Apparatur A angebracht und die Spitze des Muskels zwischen einer Plexiglasplatte und einer Elektrode eingeklemmt. Danach wurde die Muskelkammer in die begaste und temperierte Nährlösung eingebracht.

Wie auch bei den beiden Organen davor wurden nun die Geräte wie in Kapitel 3.7.1 bereits geschildert aktiviert, wobei man den Speed auf 20 mm/sec einstellte. Der Papillarmuskel wurde auf 3,92 mN bei 2 bzw. 5 mV vorgespannt und der Schreiber auf den Nullpunkt gesetzt. Während der Versuchsdurchführung wurden eventuelle Nullverschiebungen durch Nachjustierung des Schreibers korrigiert, um eine Abnahme der Kontraktionskraft durch verringerte Ausgangsspannung zu verhindern (Reiter 1967).

Die Akklimatisierungsphase des Organs belief sich auf 10 bis 20 Minuten, bevor der Papillarmuskel elektrisch mit einem Reizgerät (Accupulser A310-Akkumulator Stimulus, WPI, Hamden, USA) stimuliert werden konnte. Kam es schon vor der Reizung zu einer Kontraktion des Papillarmuskels war dies ein Hinweis auf noch vorhandene Purkinjefasern. Die Purkinjefasern sind spontan aktiv und würden zu einer Verfälschung der Versuchsergebnisse führen. Erst nach Entfernen von diesen Fasern konnte der Versuch weiter durchgeführt werden. Die quergestreifte

Muskulatur wurde nun mit Rechteckimpulsen über eine Platinelektrode mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Dauer von 3 ms kontrahiert. Man musste darauf Acht geben, dass die Stromstärke am Beginn der Reizung nur 10% über der minimalen Reizschwelle lag. Somit wurde eine rasche Entleerung der Katecholaminspeicher verhindert und es kam zu keiner Abweichung der Versuchsergebnisse (Furchgott R. F. et al. 1959).

Konnte während der Kontrollperiode eine konstante Amplitude von minimal 2 cm festgestellt werden, wurde die Testsubstanz der Muskelkammer kumulativ zugesetzt. Nach jeder Konzentrationszugabe wurden in einer 45-minütigen Gewöhnungs – bzw. Kontrollphase alle 5 Minuten 7-8 Amplituden auf dem Millimeterpapier aufgezeichnet und vermessen.

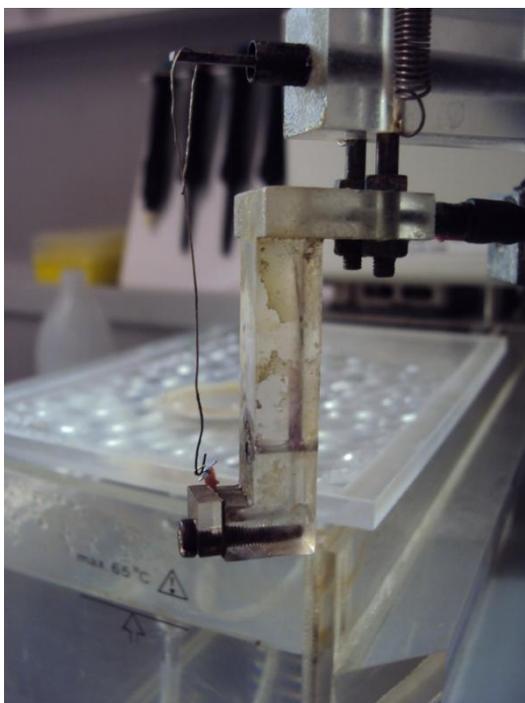


Abbildung 14: Originalabbildung des Papillarmuskels in der Apparatur A

3.7.1.4. Versuchsablauf an der Aorta descendens

Nachdem die Aorta in ringförmige Stücke präpariert wurde (Kapitel 3.5.1.5), musste man diese in die Apparatur A einspannen und in das mit Tyrode befüllte und begaste Organbad eintauchen. Für die Aufrechterhaltung der physiologischen Bedingungen musste eine Temperatur von 37 °C vorherrschen.

Nach dem Aktivieren des Schreibers und des Amplifiers wurde der Nullpunkt fixiert und die Vorspannung auf 10 mN eingestellt. Nun musste sich das Organ mindestens

20 Minuten an die physiologischen Bedingungen der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung gewöhnen. Mögliche Nullpunktverschiebungen mussten mittels Zero-Drehrad korrigiert werden.

Sobald sich das Organ akklimatisiert hatte, erfolgte am Schreibgerät eine Umstellung der elektrischen Spannung von 10 mV nach 5mV, der Schreiber wurde auf das Millimeterpapier gesetzt und die Aufzeichnung mit einem Speed von 1 mm/Minute gestartet. Die Tyrodelösung wurde nun ausgelassen und sofort mit 8 ml bzw. 25 ml einer 90 mmolaren Kaliumchloridlösung befüllt. Sogleich konnte anhand eines Ausschlages am Flachbrettschreiber eine Kontraktion festgestellt werden. Wie auch beim terminalen Ileum musste sich ein annähernd konstantes Plateau einstellen und die Kurve eine Marke von über 5 cm erreichen. Nun konnte die Kontrollphase beginnen. Dabei wurde alle 45 Minuten die Wirksubstanz laut Pipettierschema (Kapitel 3.1.2) der Kaliumchloridlösung zugesetzt bis eine Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ erreicht wurde.

3.7.1.5. Versuchsablauf an der Arteria pulmonalis

Der Ablauf der Versuche an der Arteria Pulmonalis verlief analog zu den Versuchsdurchführungen an der Aorta descendens (Kapitel 3.7.1.4) ab. Jedoch gab es einen Unterschied bezüglich der Vorspannung, die durchgängig 5 mV betrug und einer Kraft von 9,81 mN entsprach. Sowohl bei der Aorta als auch bei der Lungenarterie wurde die vasodilatierende Wirkung der Wirksubstanz auf die glatte Muskulatur getestet.

3.7.2. Untersuchung des Wirkmechanismus von MAH10.HCl an der Arteria Pulmonalis

3.7.2.1. Versuchsablauf mit Glibenclamid

Die Testsubstanz MAH10.HCl übte auf alle Organe eine starke Wirkung aus. In meinen Fall jedoch stand die Untersuchung des Wirkmechanismus an der Lungenarterie im Vordergrund. Ein vasodilatierender Effekt auf die Arteria pulmonalis tritt selten auf, daher ist der Wirkmechanismus von besonderem Interesse. Die Wirkungsweise der Testsubstanz wurde in Gegenwart von Glibenclamid getestet.

Dazu wurden die präparierten Ringe (Kapitel 3.5.1.2) in die Apparatur A eingespannt, in das begaste und temperierte Organbad eingetaucht und die Geräte aktiviert. Nun ging man wie in Kapitel 3.7.1.5 beschrieben vor. Nach Erhalt eines konstanten Plateaus konnte man den Antagonisten Glibenclamid zufügen. Die Versuchsreihe wurde sowohl mit einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ als auch mit 100 $\mu\text{mol/l}$ durchgeführt. Nach einer 45 minütigen Wartezeit wurde jene Menge der Testsubstanz zugegeben die dem EC_{50} -Wert entsprach. Nach weiteren 45 Minuten war der Versuch zu Ende.

Der EC_{50} -Wert ist jener Wert bei dem bereits 50% der Wirkung eingetreten ist. Je niedriger dieser Wert ist, desto potenter ist der Wirkstoff (Aktories et al. 2009).

3.8. Verwendeter Antagonist zur Untersuchung des Wirkmechanismus

3.8.1. Glibenclamid

M= 494,0g/mol

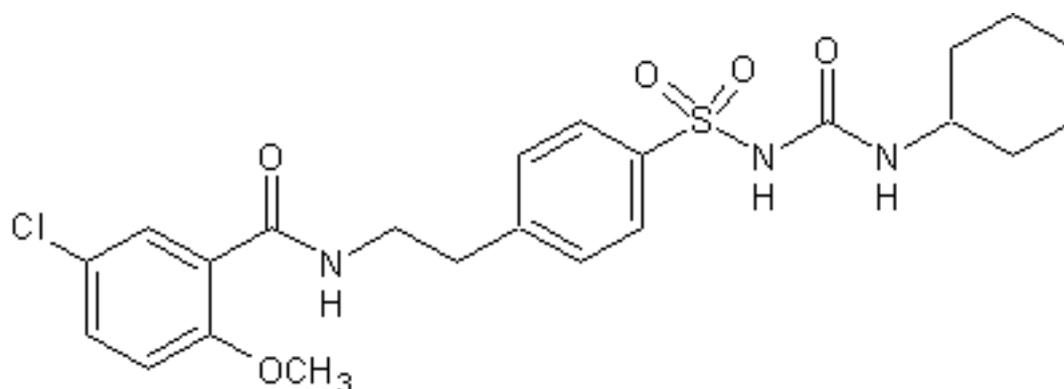


Abbildung 15: Chemische Struktur von Glibenclamid

Glibenclamid gehört zur Gruppe der Sulfonylharnstoffe und wird oral als Antidiabetikum bei Diabetes Typ 2 verabreicht. Glimepirid und Gliquidon werden ebenfalls der Substanzklasse zugeordnet.

Sulfonylharnstoffe haben alle eine einheitliche Struktur. Diese besteht aus einem aromatischen Ring, der in konstanten Abständen mit einer sauren Gruppe verknüpft

ist. Bei physiologischen pH-Wert sind die Sulfonylharnstoffe > 90% dissoziiert und erreichen somit eine hohe orale Bioverfügbarkeit.

Sulfonylharnstoffe schließen ATP-abhängige Kalium-Kanäle durch Bindung der SUR1-Untereinheit in den B-Zellen. Die daraus resultierende Depolarisation führt zur Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle und die Insulinsekretion in den B-Zellen wird angeregt. Die Produktion von Insulin läuft unabhängig von der Blutglucosekonzentration ab, wodurch die Sulfonylharnstoffe sowohl bei Diabetes Typ 2 als auch bei Stoffwechselgesunden ein schwere Hypoglykämie auslösen können.

Weitere mögliche Nebenwirkungen wie Appetitlosigkeit, Gewichtszunahme, Diarrhoe und Erbrechen können auftreten. In seltenen Fällen kann es zur Blutbildveränderung kommen (Aktorien et al. 2009).

3.9. Auswertung und Statistik

3.9.1. Atrium cordis dextrum

Die Messungen am Vorhof dienen zur Bestimmung der Chronotropie. Als Chronotropie bezeichnet man die Schlagfrequenz des Herzens (Hunnius 1986).

In 4 Versuchen (Kapitel 3.7.1.1) wurde der Einfluss der Testsubstanz auf die Frequenz des Herzens gemessen. Während der 45-minütigen Gewöhnungsphase wurden alle 5 Minuten 12 Sekunden lang die Schläge am Millimeterpapier aufgenommen. Zur Auswertung durften jedoch nur die letzten Messungen jeder Konzentration herangezogen werden, da sich erst nach frühestens 30 Minuten ein steady state eingestellt hat. Es wurden die Schläge gezählt und mit dem Faktor 5 multipliziert, um die Anzahl der Schläge pro Minute zu erhalten. Die erhaltenen Werte wurden mit dem Kontrollwert, der 100% entsprach, in Relation gesetzt.

3.9.2. Musculus papillaris

Um eine Aussage über die Auswirkung der Wirksubstanz auf die Inotropie, der Kontraktionskraft des Muskelgewebes (Hunnius 1986), zu erhalten, wurden die Versuche am Papillarmuskel durchgeführt.

Während der Versuche (Kapitel 3.7.1.3) wurden, analog zum Vorhof, während der Gewöhnungsphase alle 5 Minuten Messungen durchgeführt und mit dem Schreiber am Millimeterpapier festgehalten. Es wurden, wie schon beim Vorhof, für die Auswertung nur die Messungen im steady state herangezogen. Die Amplituden wurden mit einem Lineal vermessen und der Durchschnitt der Amplitudenlänge in Zentimetern notiert. Um den tatsächlichen Wert der Kontraktion zu erhalten, musste der Wert mit dem Eichfaktor des Kraftwandlers multipliziert werden. Wie auch schon beim Vorhof stellte der Kontrollwert die 100% dar und somit konnte jegliche Inotropieveränderung prozentuell ermittelt werden.

3.9.3. Aorta, Arteria pulmonalis, terminales Ileum

Welche Wirkung die Wirksubstanz auf die glatte Muskulatur ausübt, wurde an der Aorta, Lungenarterie und Krummdarm getestet. Während beim Darm die spasmolytische Wirkung im Vordergrund stand, wurde an den Gefäßen die vasodilatierende Wirkung untersucht.

Das kontraktile Organgewebe wurde mit einer Kaliumchloridlösung zur maximalen Kontraktion gereizt. Nach Erreichen der Plateauphase wurde die Wirksubstanz alle 45 Minuten kumulativ zugesetzt, wobei jede Wirkstoffzugabe mit einer Markierung am Graphen festgehalten wurde. Der Abstand zwischen Plateauphase und Nullpunkt wurde in Zentimetern vermessen und entsprach der 100%igen Kontraktionskraft und stellte zugleich den Kontrollwert dar. Nun wurden die Längen zwischen den Markierungen und dem Nullpunkt mittels Lineal ermittelt und die Messdaten in Abhängigkeit des Kontrollwertes (entspricht 100%) prozentuell berechnet. Bei der Berechnung musste der Eichfaktor berücksichtigt werden. Dieser betrug bei 5 mV 0,98 mN und bei 10 mV $2 \times 0,98$ mN.

3.9.4. Statistik

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse meiner Versuchsreihe wurde das Programm Sigmaplot 9.0 verwendet.

Es wurde für jedes Organ das arithmetische Mittel sowie der Standardfehler der Mittelwerte in % und in mN errechnet. Um eine erwartungsgetreuen Standardfehler zu erhalten, mussten mindestens 4 Versuche pro Organ durchgeführt werden.

Dieses Programm wurde auch für die Berechnung der EC_{50} -Werte herangezogen. Dazu wurde auf der x-Achse die Konzentration der Testsubstanz in $\mu\text{mol/l}$ und auf der y-Achse die Änderung der Kontraktion bzw. Schlagfrequenz in % eingetragen. Nach Erhalt der Kurve konnte nun graphisch ermittelt werden, bei welcher Konzentration der Testsubstanz eine 50%ige Abnahme der Schlagfrequenz bzw. Kontraktion eingetreten ist. Dies entsprach dem EC_{50} -Wert. Der EC_{50} gibt also Auskunft über die effektive Konzentration, bei der 50% der Wirkung eintritt (Estler 2000).

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der Testsubstanz MAH10.HCl

4.1.1. Atrium cordis dextrum

In insgesamt 4 Versuchen wurde der Einfluss der Testsubstanz MAH10.HCl auf die Chronotropie getestet.

Nach Erreichen einer konstanten Schlagfrequenz wurde die Testsubstanz in den üblichen Konzentration 3, 10, 30, 100 $\mu\text{mol/l}$ alle 45 Minuten der Nährlösung zugegeben. Aus allen 4 Versuchen wurden die Mittelwerte und die Standardfehler berechnet (siehe Tabelle 6)

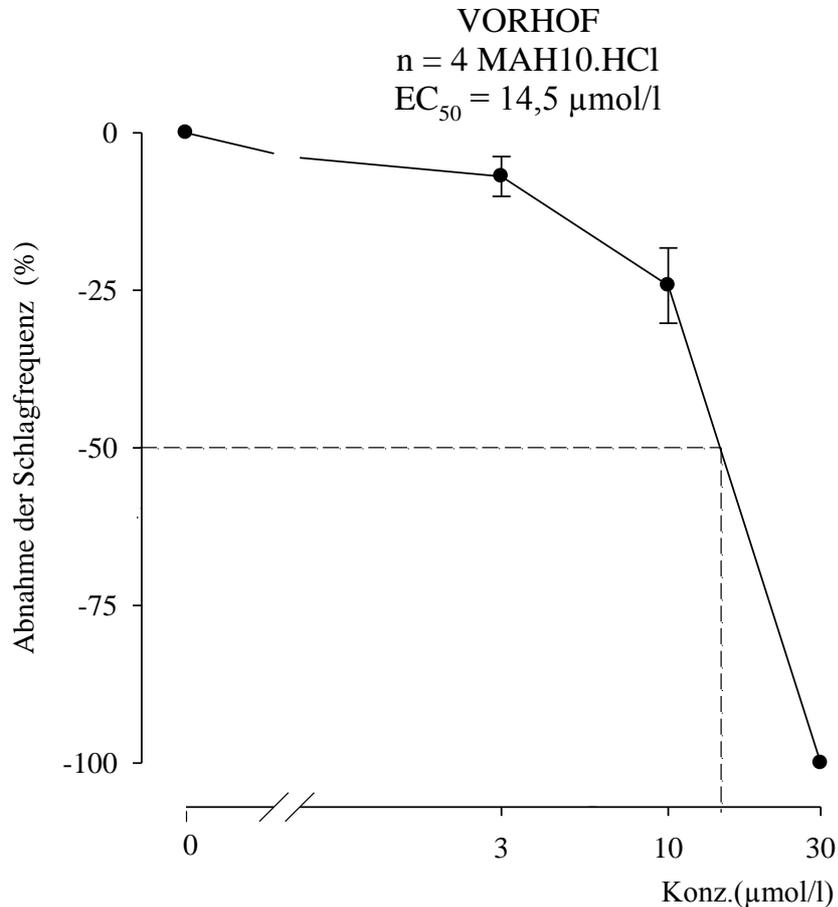
Die Testsubstanz zeigte einen großen Effekt auf die quergestreifte Muskulatur des Herzens. Schon bei der ersten zugegebenen Substanzmenge von 3 μl konnte eine negative Beeinflussung der Schlagfrequenz registriert werden, die sich mit steigender Konzentration potenziert hat. Bei einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ konnte eine Abnahme der Spontanaktivität des Sinusknoten gegen null registriert werden.

Tabelle 6: Versuchsergebnisse der Substanz MAH10.HCl auf den rechten Vorhof

MAH10.HCl ($\mu\text{mol/l}$)	f \pm SEM (x/min)	f \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	205 \pm 9,57	0 \pm 0	4	-
3	191 \pm 13,44	- 6,93 \pm 3,16	4	n.s.
10	156 \pm 17,00	- 24,24 \pm 5,96	4	0,05
30	0 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	4	0,001

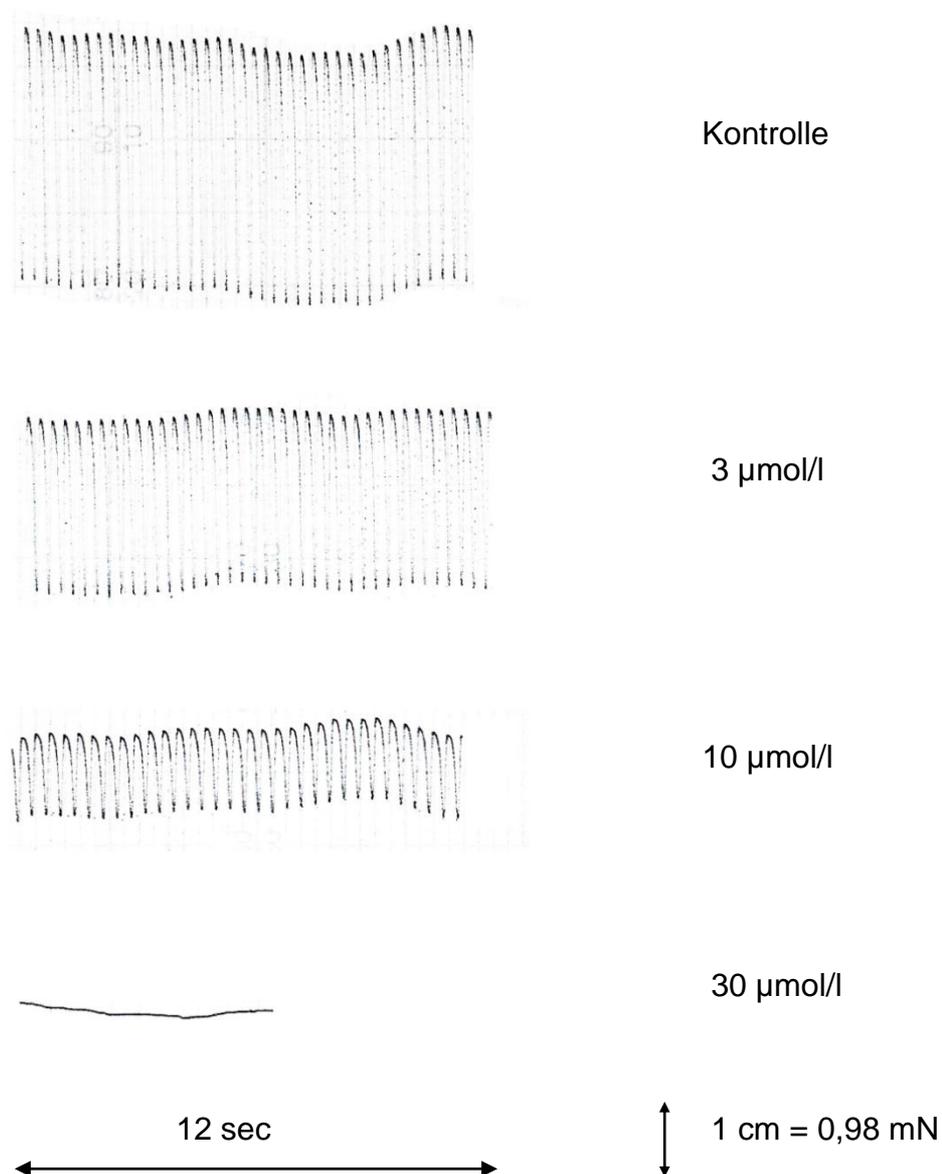
Legende zur Tabelle 6:

Diese Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte (f) der Schlagfrequenz in Schläge/Minute bzw. in % unter Einbeziehung des Standardfehlers (SEM). Die Anzahl der Versuche n belief sich auf 4.

Diagramm 1: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MAH10.HCl am rechten Vorhof**Legende zu Diagramm 1:**

Die obige Abbildung stellt die Wirkung der Testsubstanz auf die Schlagfrequenz dar. Auf der Abszisse wurde die Konzentration in µmol/l und auf der Ordinate die Abnahme der Schlagfrequenz in % aufgetragen. Die Punkte kennzeichnen den Mittelwert der Schlagfrequenz, die Balken, die durch den Mittelpunkt verlaufen, stellen den Standardfehler dar. Der EC₅₀ wird, wie bereits erwähnt, graphisch ermittelt und kann anhand der strichlierten Linie abgelesen werden.

Abbildung 16:Originalaufzeichnung der Schlagfrequenz des rechten Vorhofes von MAH10.HCl



Legende zu Abbildung 16:

Die Abbildung 16 zeigt uns die Schlagfrequenz des rechten Vorhofes. Diese nimmt durch kumulative Zugabe der Wirksubstanz MAH 10 HCl kontinuierlich ab. Daher kann man auf eine negativ chronotrope Wirkung der Testsubstanz schließen.

4.1.2. Musculus Papillaris

Die Versuche am Papillarmuskel dienten zur Bestimmung der inotropen Wirkung von MAH10.HCl.

Die Testsubstanz wurde nach Erreichen einer konstanten Schlagfrequenz laut Pipettierschema kumulativ der Nährlösung zugesetzt. Bereits nach der ersten Konzentrationszugabe war eine deutliche Abnahme der Schlagfrequenz sichtbar, die sich mit jeder weiteren Wirkstoffzugabe erhöhte. In zwei Versuchen konnte man ein Absterben des Muskels bereits bei einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ beobachten, bei den beiden anderen Versuchen erst bei 100 $\mu\text{mol/l}$.

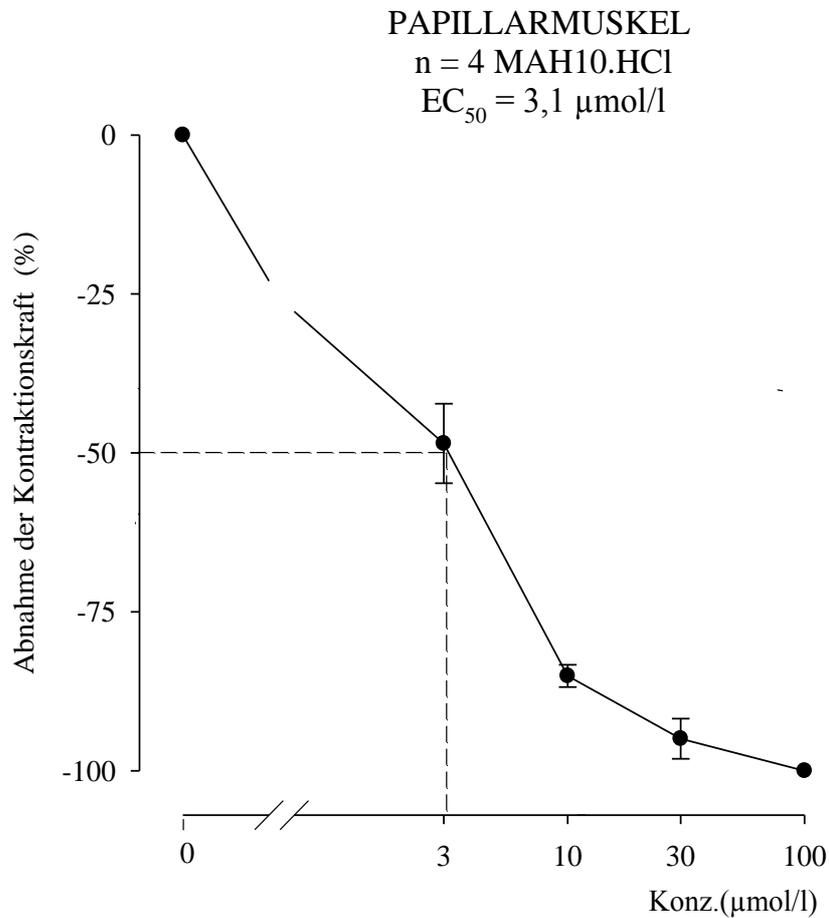
Der Mittelwert wurde aus allen Versuchen errechnet, wobei der Standardfehler berücksichtigt werden musste. Der Kontrollwert, der dem 0%-Wert entsprach, belief sich auf $1,60 \pm 0,32$ mN.

Tabelle 7: Versuchsergebnisse der Substanz MAH10.HCl auf den Papillarmuskel

MAH10.HCl ($\mu\text{mol/l}$)	f \pm SEM (mN)	f \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$1,60 \pm 0,32$	0 ± 0	4	-
3	$0,81 \pm 0,16$	$-48,53 \pm 6,25$	4	0,01
10	$0,25 \pm 0,07$	$- 85,08 \pm 1,75$	4	0,001
30	$0,11 \pm 0,07$	$- 94,96 \pm 3,16$	4	0,001
100	$0 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	4	0,001

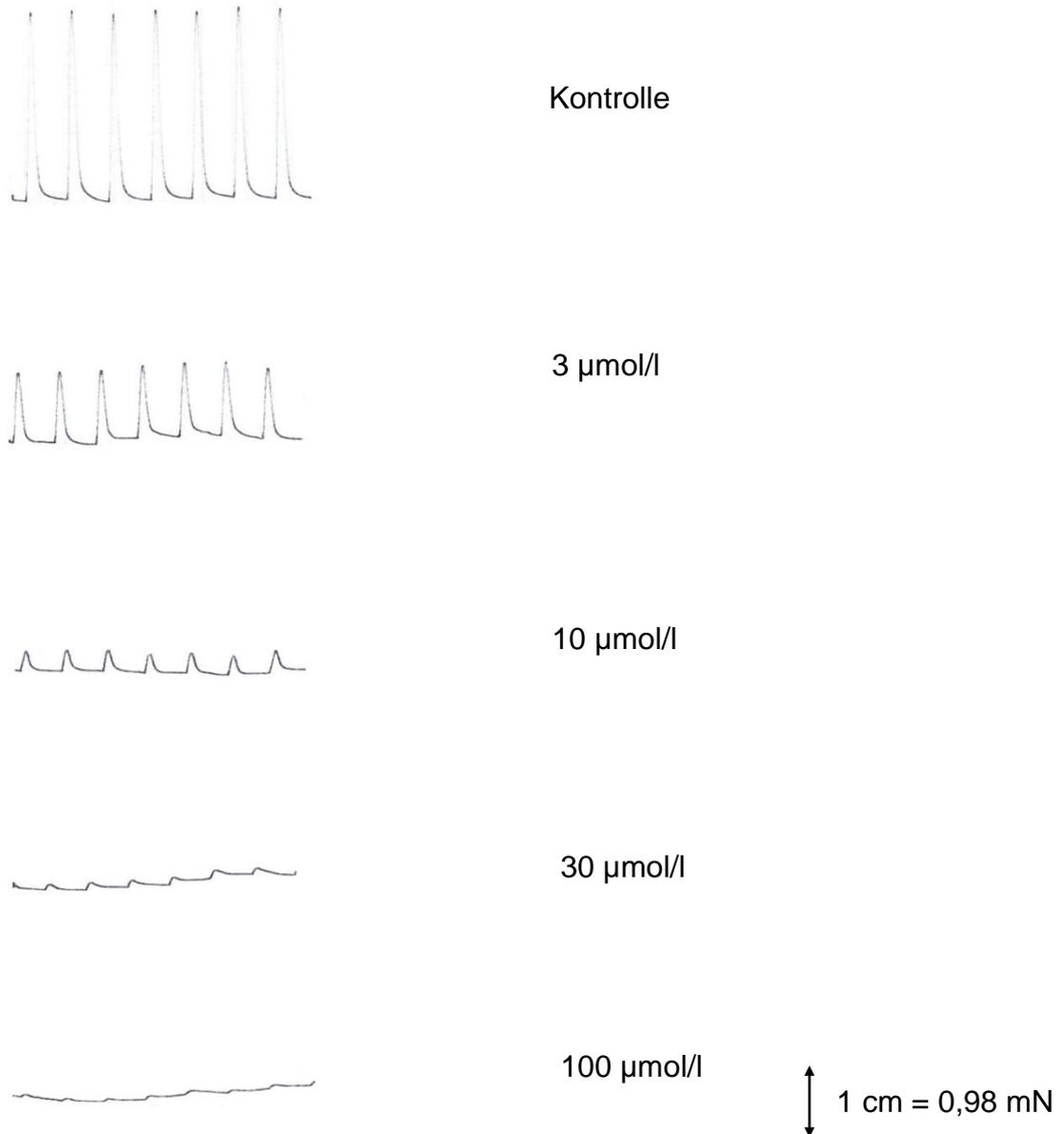
Legende zur Tabelle 7:

Die Tabelle zeigt die Mittelwerte in mN und % unter Berücksichtigung des Standardfehlers (SEM), sowie die Anzahl der Versuch (n).

Diagramm 2: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MAH10.HCl am Papillarmuskel**Legende zu Diagramm 2:**

Wie auch schon bei der Konzentrations-Wirkungskurve des rechten Vorhofes, stellt die x-Koordinate die Konzentration der Wirksubstanz in µmol/l und die y-Achse die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft dar. Anhand von diesem Diagramm ist die inotrope Abnahme des Muskels sehr gut ersichtlich. Mit Hilfe der strichlierten Linien kann man der EC₅₀-Wert ablesen, der sich auf 3,1 µmol/l beläuft.

Abbildung 17: Originalaufzeichnung der inotropen Wirkung von MAH10.HCl auf den Papillarmuskel



Legende zur Abbildung 17:

Die Originalaufzeichnung zeigt bei steigender Konzentration eine deutliche Erniedrigung der Amplitude.

4.1.3. Aorta descendens

Mit Hilfe der Versuche an der Aorta wurde die vasodilatierende Wirkung der Substanz MAH10.HCl untersucht.

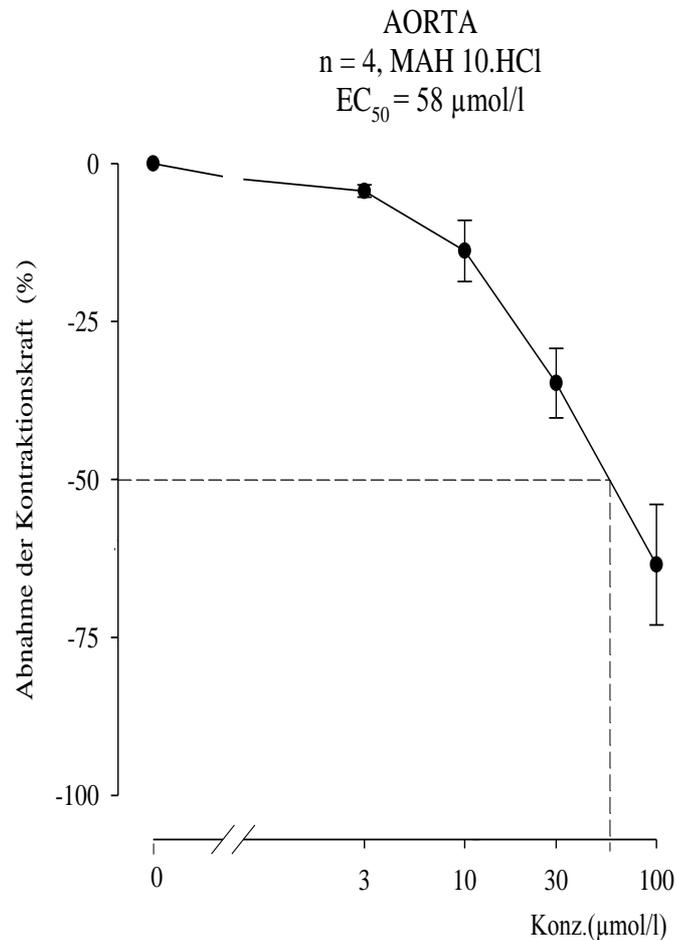
Die Versuche wurden wie in Kapitel 3.7.1.4 beschrieben durchgeführt. Das Arithmetische Mittel der 4 Kontrollwerte belief sich auf $9,44 \pm 2,48$ mN und wurde als 0%-Wert herangezogen. Bei den ersten Konzentrationszugaben konnte nur eine minimale vasodilatierende Wirkung beobachtet werden, die jedoch bei $30 \mu\text{mol/l}$ stark stieg und am Graph deutlich sichtbar war. Eine vollständige Vasodilatation konnte in diesem Versuch nicht erreicht werden.

Tabelle 8: Versuchsergebnisse der Substanz MAH10.HCl an der isolierten Aorta

MAH10.HCl ($\mu\text{mol/l}$)	f \pm SEM (mN)	f \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$9,44 \pm 2,48$	0 ± 0	4	-
3	$8,99 \pm 2,30$	$-4,35 \pm 0,97$	4	n.s.
10	$7,86 \pm 1,67$	$-13,83 \pm 4,24$	4	0,05
30	$5,78 \pm 0,94$	$-34,76 \pm 5,51$	4	0,01
100	$3,25 \pm 0,78$	$-63,50 \pm 9,54$	4	0,01

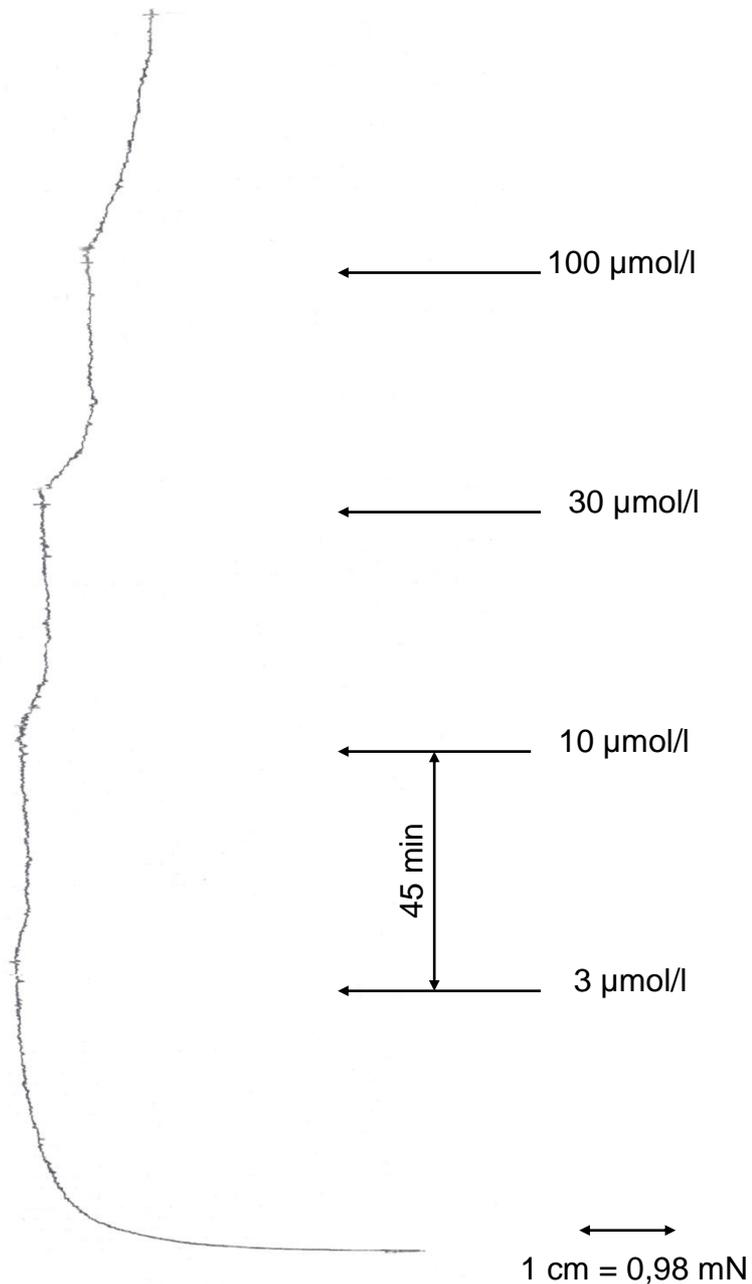
Legende zur Tabelle 8:

In der obigen Tabelle sind die berechneten Mittelwerte (f) und Standardfehler (SEM) in mN und prozentuell, sowie die Anzahl der Versuche (n) angegeben.

Diagramm 3: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MAH10.HCl an der Aorta**Legende zu Diagramm 3:**

Anhand dieser Graphik kann man deutlich erkennen, dass die vasodilatierende Wirkung sich erst mit steigender Konzentration einstellt. Die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft ist auf der Ordinate, die Konzentration in µmol/l auf der Abszisse eingetragen. Die Mittelwerte werden als Punkte und die Standardfehler als Balken dargestellt. Der EC₅₀-Wert ist anhand der strichlierten Linie graphisch abzulesen und beträgt 58 µmol/l.

Abbildung 18: Originalaufzeichnung der Kontraktionskraft von MAH10.HCl an der Aorta



Legende zu Abbildung 18:

Die flach verlaufende Kurve in dieser Graphik zeigt einen schwachen vasodilatierenden Effekt der Testsubstanz auf die Gefäße. Die Pfeile kennzeichnen den Zeitpunkt der Substanzzugabe. Dies geschah alle 45 Minuten.

4.1.4. Arteria pulmonalis

Nicht nur an der Aorta sondern auch anhand der Arteria Pulmonalis wurde die vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz MAH10.HCl untersucht. Dazu wurden 4 Versuche durchgeführt. Auf den Versuchsablauf wurde bereits in Kapitel 3.7.1.5 genauer eingegangen. Der Kontrollwert wurde aus allen 4 Versuchen errechnet und betrug $11,06 \pm 1,61$ mN und entsprach dem 0%-Wert.

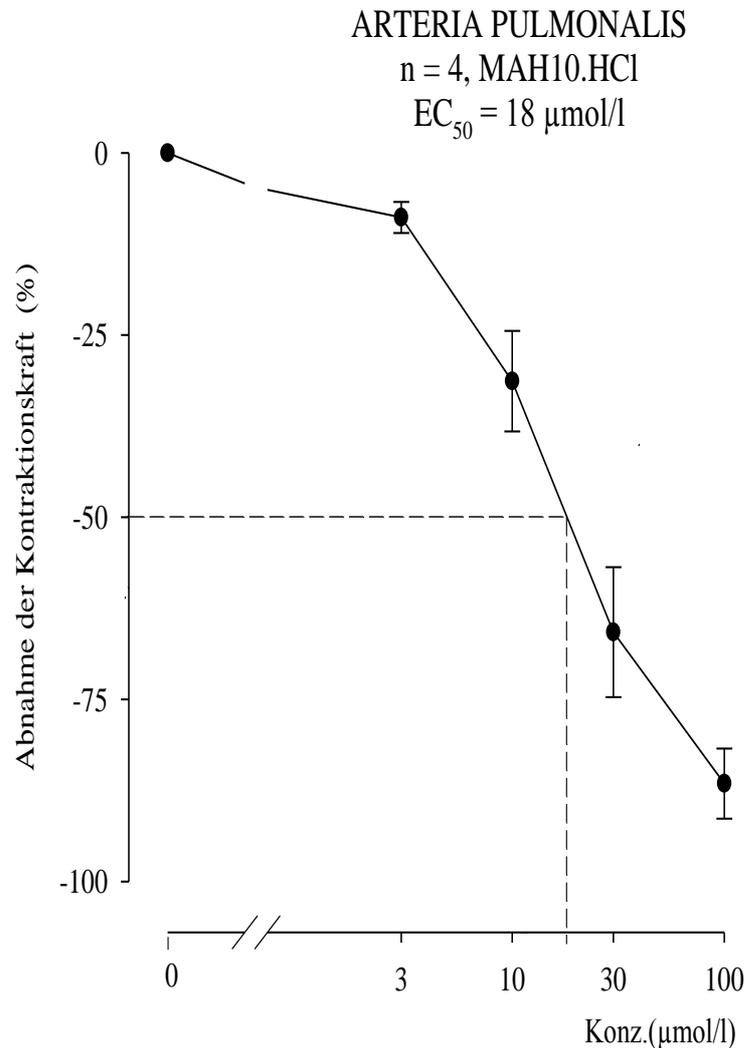
Die Abnahme der Kontraktion verlief im Vergleich zur Aorta stärker ab. Schon bei der ersten Konzentration von $3 \mu\text{mol/l}$ konnte eine sichtbare Beeinflussung der glatten Muskulatur festgestellt werden, die mit zunehmender Konzentration deutlich stieg. Somit lag der EC_{50} -Wert mit $18 \mu\text{mol/l}$ weit unter dem der Aorta. Die Testsubstanz führte zu keiner vollständigen Vasodilatation der glatten Muskulatur.

Tabelle 9: Versuchsergebnisse der Substanz MAH10.HCl an der isolierten Lungenarterie

MAH10.HCl ($\mu\text{mol/l}$)	f \pm SEM (mN)	f \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$11,06 \pm 1,61$	0 ± 0	4	-
3	$10,09 \pm 1,55$	$-8,86 \pm 2,14$	4	n.s.
10	$7,79 \pm 1,71$	$-31,33 \pm 6,91$	4	0,01
30	$3,97 \pm 1,47$	$-65,78 \pm 8,91$	4	0,01
100	$1,57 \pm 0,76$	$-86,56 \pm 4,82$	4	0,001

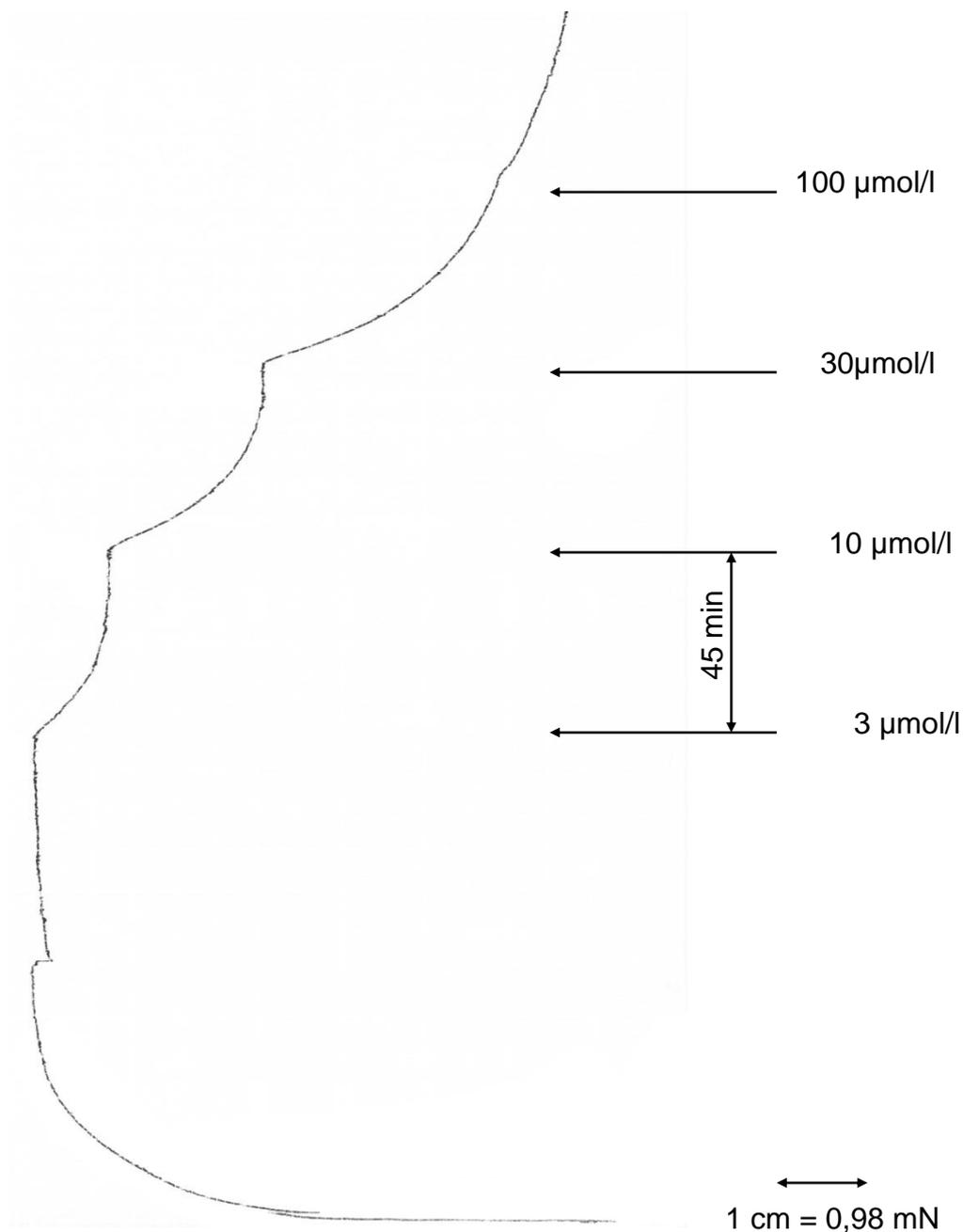
Legende zu Tabelle 9:

In dieser Tabelle lassen sich das arithmetische Mittel (f) und der Standardfehler (SEM) in mN und prozentuell ablesen. Zusätzlich bekommt man Auskunft über die Anzahl der Versuche (n) und der Irrtumswahrscheinlichkeit (P).

Diagramm 4: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MAH10.HCl an der Lungenarterie**Legende zu Diagramm 4:**

Mit Hilfe dieser Kurve werden die Ergebnisse der Versuche am isolierten Lungenarterienpräparat graphisch dargestellt. Auf der x-Achse werden die unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz aufgetragen. Die prozentuelle Abnahme der Kontraktion wird auf der y-Achse angegeben. Die Punkte stellen die Mittelwerte da und deren Balken symbolisieren die Standardfehler.

Abbildung 19: Originalaufzeichnung der Kontraktionskraft von MAH10.HCl an der Lungenarterie



Legende zu Abbildung 19:

Die Abbildung 19 zeigt die Originalregistrierung der Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis in Anwesenheit von MAH10.HCl. Nach Erreichen der Plateauphase wurde die Testsubstanz alle 45 Minuten die Testsubstanz kumulativ zugegen. Dies wird anhand der Pfeile markiert.

4.1.5. Terminales Ileum

Die spasmolytische Wirkung der Testsubstanz MAH10.HCl wurde anhand isolierter Krummdarmpräparate getestet. Insgesamt wurden die Versuche 4 Mal durchgeführt. Der daraus berechnete Mittelwert ergab $6,44 \pm 0,35$ mN und wurde als 0%-Wert herangezogen.

Die Testsubstanz hatte einen großen Effekt auf die Abnahme der Kontraktionskraft. Bei einer Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ konnte bereits ein spasmolytischer Effekt gemessen werden. Dieser nahm mit stetiger Konzentration zu bis es bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ zur vollständigen Spasmolyse der glatten Muskulatur kam.

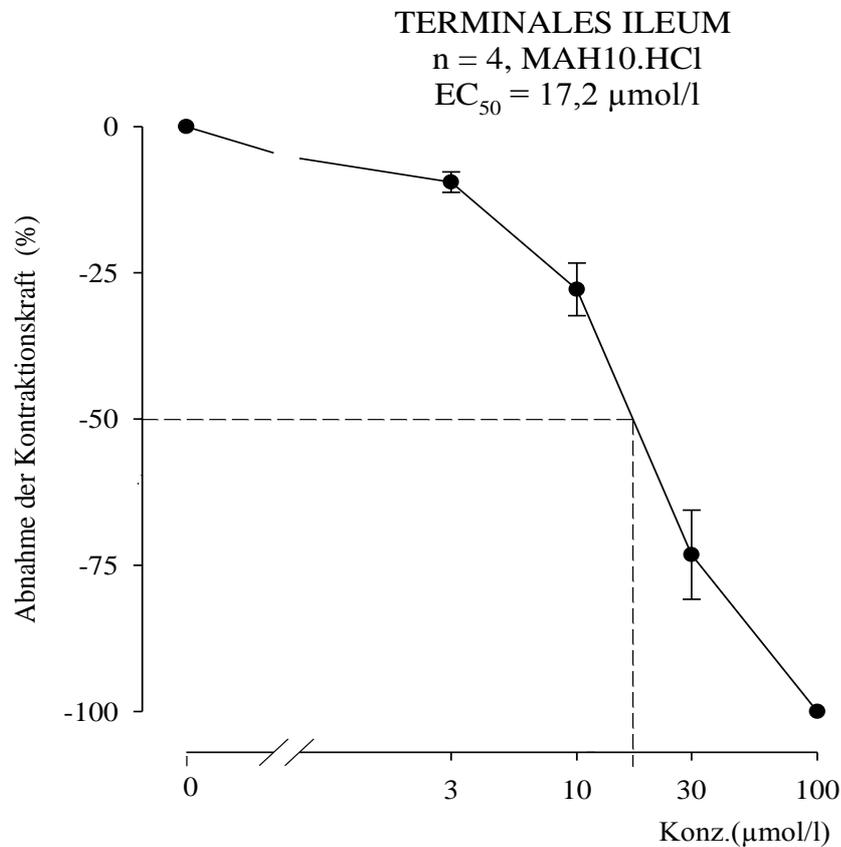
Der EC_{50} -Wert konnte graphisch abgelesen werden und lag bei 17,2 $\mu\text{mol/l}$.

Tabelle 10: Versuchsergebnisse der Substanz MAH10.HCl auf den isolierten Darm

MAH10.HCl ($\mu\text{mol/l}$)	f \pm SEM (mN)	f \pm SEM (%)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtums- wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$6,44 \pm 0,35$	0 ± 0	4	-
3	$5,81 \pm 0,32$	$-9,49 \pm 1,75$	4	0,05
10	$4,66 \pm 0,40$	$-27,84 \pm 4,50$	4	0,01
30	$1,79 \pm 0,58$	$-73,20 \pm 7,61$	4	0,001
100	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	4	0,001

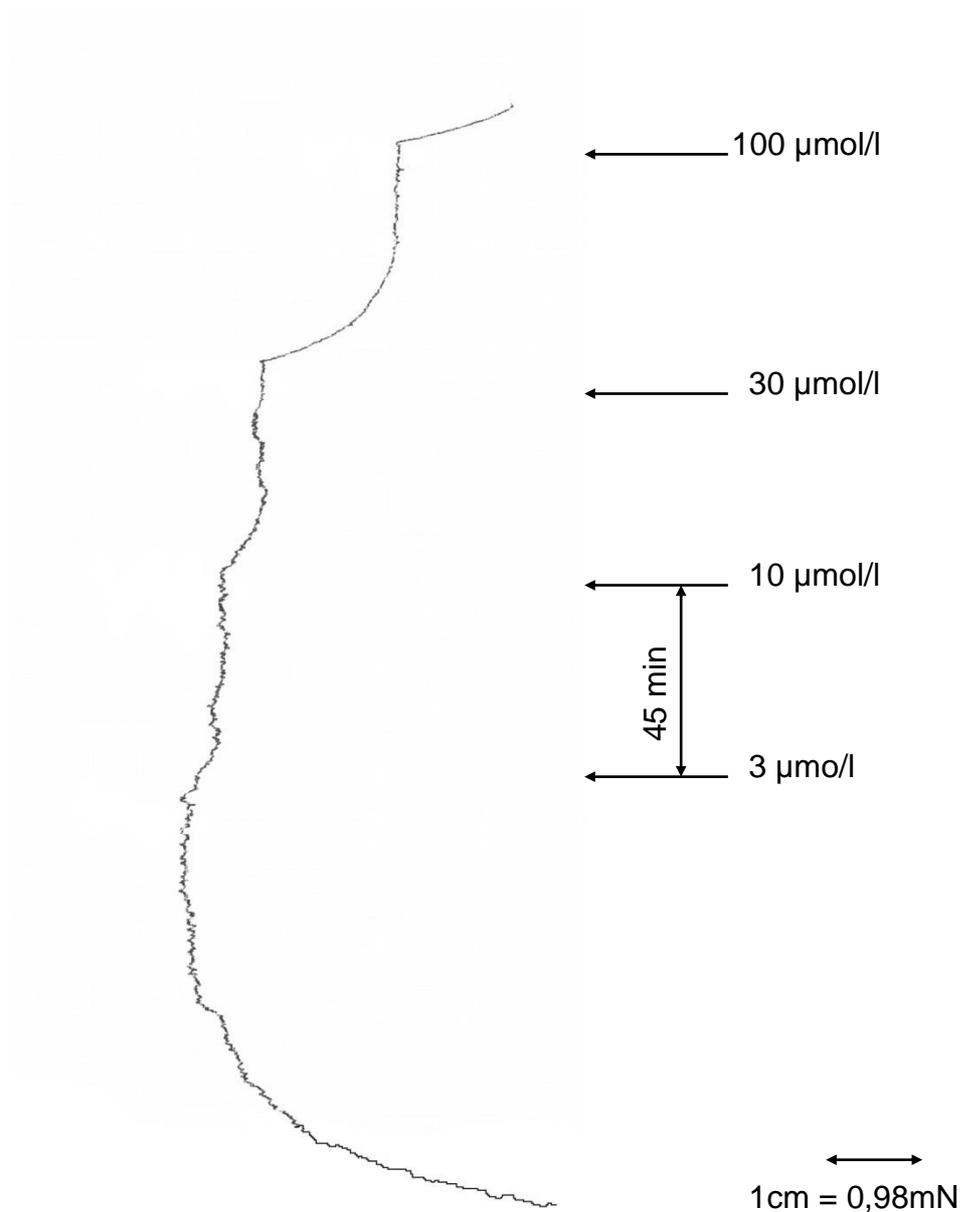
Legende zu Tabelle 10:

Die Tabelle enthält den Mittelwert (f) und den Standardfehler (SEM) in mN und %, die aus einer Anzahl n von Versuchen berechnet wurden.

Diagramm 5: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MAH10.HCl am Darm**Legende zu Diagramm 5:**

Graphische Darstellung der Werte von Tabelle 10. Die Konzentration wurde in µmol/l auf die Ordinate und die prozentuelle Abnahme der Kontraktion auf die Abszisse aufgetragen. Die strichlierte Linie kennzeichnet den EC₅₀-Wert, der auf der x-Achse abzulesen ist.

Abbildung 20: Originalaufzeichnung der Kontraktionskraft von MAH10.HCl am Darm



Legende zu Abbildung 20:

Anhand dieser Graphik wird die Abnahme der Kontraktion und somit die spasmolytische Wirkung der Substanz sichtbar. Die Pfeile markieren das Einspritzen der Substanz, der Abstand zwischen den Pfeilen kennzeichnet das Zeitintervall, das 45 Minuten betrug.

4.2. Analyse des Wirkmechanismus von MAH10.HCl an der Lungenarterie

In weiterer Folge wurden Versuche mit dem Antagonisten Glibenclamid durchgeführt um über den Wirkmechanismus der getesteten Substanz MAH10.HCl eine Aussage treffen zu können. Als Organ wurde die Lungenarterie verwendet, da die Testsubstanz bei diesem isolierten Präparat mit einem EC_{50} von $18 \mu\text{mol/l}$ eine starke Wirkung hervorruft. Es kommt selten vor, dass ein vasodilatierender Effekt auf die Arteria pulmonalis ausgeübt wird. Es war daher von großem Interesse mehr über den Wirkmechanismus zu erfahren.

4.2.1. Versuchsablauf an der Arteria Pulmonalis mit MAH10.HCl in Kombination mit Glibenclamid

MAH10.HCl hat womöglich einen Prodrugcharakter und setzt im Organismus Schwefelwasserstoff frei, der ATP-abhängige Kaliumkanäle aktiviert. Dies resultiert in einen vasodilatierenden Effekt (Vohr 2010).

Anhand von Versuchen sollte nachgewiesen werden, ob die Wirkung der Testsubstanz tatsächlich auf eine Öffnung der K_{ATP} -Kanäle basiert. Dazu wurden die Kaliumkanäle mit Glibenclamid blockiert.

Die Versuche wurden mit zwei verschiedenen Konzentrationen, 30 und $100 \mu\text{mol/l}$, durchgeführt. Die Einwaage der Substanz richtete sich nach der Größe des Organbades und wurde in $100 \mu\text{l}$ Wasser gelöst.

Tabelle 11: Einwaageschema von Glibenclamid

Substanz	Molare Masse	Volumen Organbad	Einwaage Substanz ($30 \mu\text{mol}$)	Einwaage Substanz ($100 \mu\text{mol}$)
Glibenclamid	494,0 g/mol	8 ml	0,12	0,40
		25 ml	0,37	1,24

Nach Erreichen der Plateauphase wurden $30 \mu\text{mol/l}$ bzw. $100 \mu\text{mol/l}$ Glibenclamid dem Organbad zugesetzt. Nun musste man 45 Minuten warten ehe man $20 \mu\text{mol/l}$

Testsubstanz MAH 10 HCl mit der Kolbenhubpipette zugeben. Die Änderung der Kontraktilität wurde mittels Schreiber am Millimeterpapier aufgezeichnet.

4.2.2. Ergebnisse der Versuche von MAH10.HCl in Kombination mit Glibenclamid an der isolierten Arteria pulmonalis

Die Versuche wurden wie in Kapitel 3.7.2.1 bereits beschrieben durchgeführt. Aus jeweils 3 Durchführungen wurde bei 30 µmol/l ein Kontrollwert von $11,27 \pm 2,36$ und bei einer Konzentration von 100 µmol/l eine Kontrolle von $8,38 \pm 2,96$ errechnet. Diese wurden als 0%-Wert herangezogen.

Nach Zugabe von 30 µmol/l Glibenclamid konnte eine Abnahme der Kontraktilität von 6% registriert werden, die nach Zugabe von 20 µl Testsubstanz auf 48% sank. Bei einer Konzentration von 100 µmol/l verminderte sich die Kontraktilität um 15%, wobei die nachfolgende Verabreichung von 20 µl MAH10.HCl zu einer weiteren Kontraktionsabnahme der glatten Muskulatur um 45% führte.

Anhand dieser Versuche konnte eindeutig festgestellt werden, dass die vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz nicht auf die Öffnung von ATP-sensitiven Kaliumkanälen zurückzuführen ist, da es trotz Kaliumkanalblocker zu einer weiteren Abnahme der Kontraktilität kam.

Tabelle 12 und Tabelle 13: Versuchsergebnisse der Substanz MAH10.HCl auf die isolierte Lungenarterie in Kombination mit 30 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid

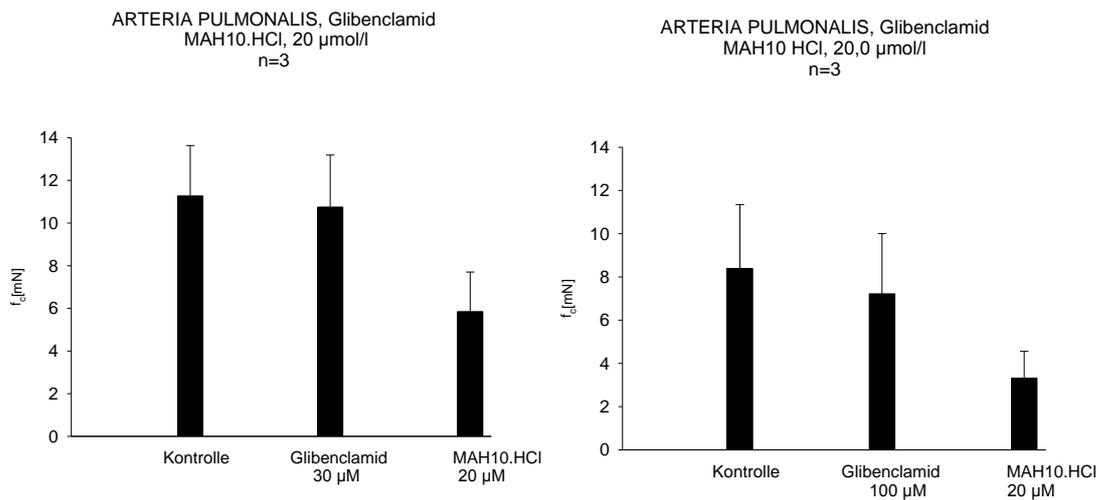
Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	$f \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$11,27 \pm 2,36$	3	-
30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid	$10,75 \pm 2,44$	3	-
+ 20 $\mu\text{mol/l}$ MAH10.HCl	$5,85 \pm 1,85$	3	0,05

Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	$f \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche (n)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$8,38 \pm 2,96$	3	-
100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid	$7,22 \pm 2,78$	3	-
+ 20 $\mu\text{mol/l}$ MAH10.HCl	$3,32 \pm 1,24$	3	0,05

Legende zu Tabelle 12 und 13:

Die Konzentration der Testsubstanz MAH10.HCl und von Glibenclamid ist in $\mu\text{mol/l}$ angegeben. Aus der Anzahl der Versuche (n) wurden die arithmetischen Mittelwerte (f) und deren Standardfehler (SEM) berechnet.

Diagramm 6: Graphische Darstellung der Auswirkung der Testsubstanz MAH10.HCl auf die Lungenarterie in Kombination mit 30 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid

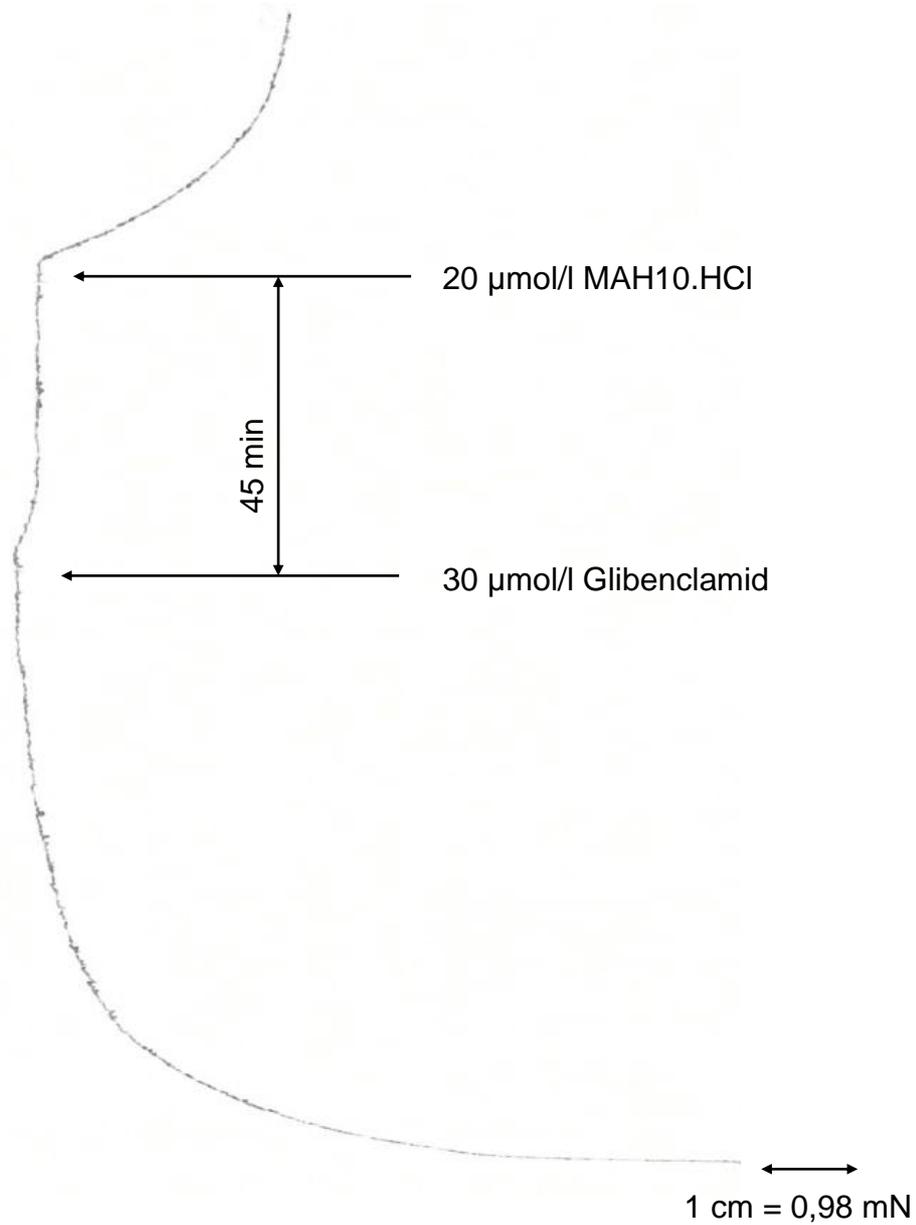


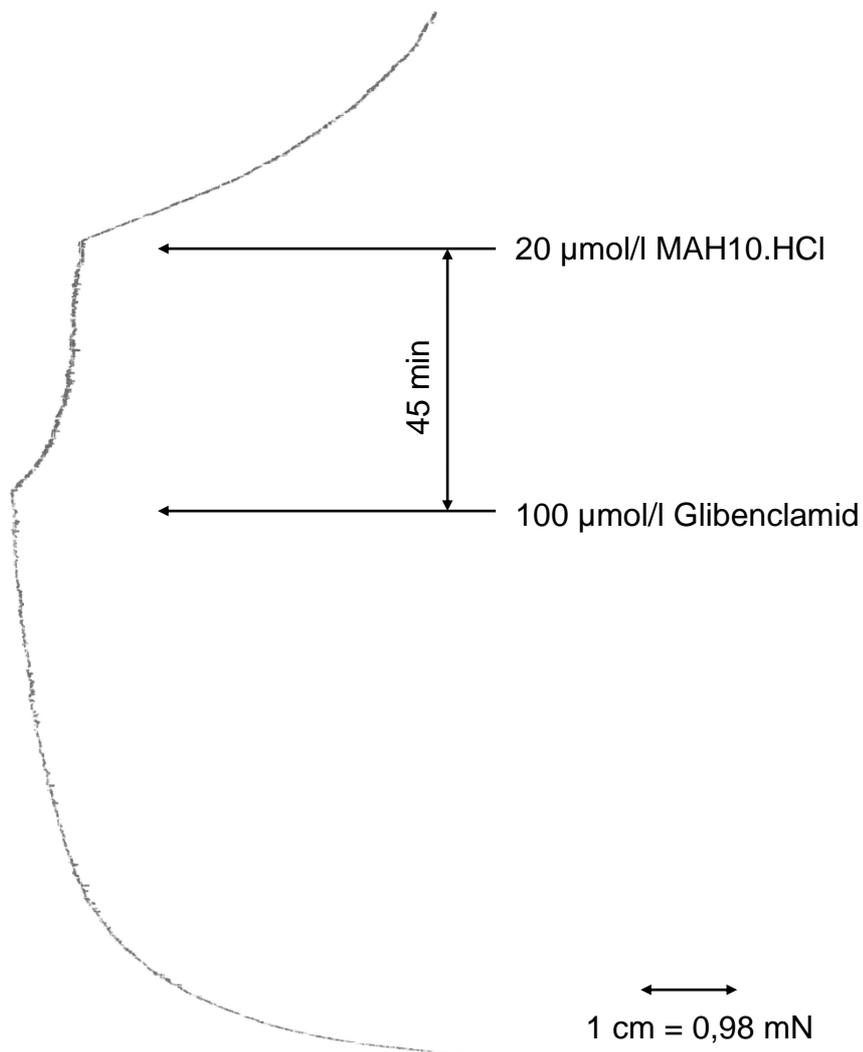
Legende zu Diagramm 6:

In diesem Diagramm wird die Auswirkung von MAH10.HCl auf die Kontraktilität der glatten Muskulatur in Kombination mit Glibenclamid graphisch dargestellt.

Auf der Ordinate werden Kontrollwert und Konzentrationen von Glibenclamid und MAH10.HCl aufgetragen, die Mittelwerte der Kontraktionskraft in mN auf der Abszisse. Die senkrechten Balken entsprechen demzufolge der Kontraktionsstärke in mN. Der Standardfehler wird als dünner Strich dargestellt.

Abbildung 21: Originalaufzeichnungen des Versuches mit Glibenclamid in der Konzentration 30 bzw. 100 $\mu\text{mol/l}$.



**Legende zu Abbildung 21:**

Der Zeitpunkt der Substanzzugabe wird mit Hilfe eines Pfeiles markiert. Dies geschah alle 45 Minuten.

5. Diskussion

Die Zielsetzung meiner Diplomarbeit befasste sich mit der Untersuchung der Wirkstärke der Testsubstanz MAH10.HCl auf die verschiedenen Typen der Muskulatur. Anhand der glatten Muskulatur wurde sowohl die spasmolytische als auch die vasodilatierende Wirkung untersucht. Die inotrope bzw. chronotrope Wirkung von MAH10.HCl wurde an der Herzmuskulatur, die aus quergestreiftem Gewebe besteht, getestet.

5.1. Wirkung der Testsubstanz MAH10.HCl auf die glattmuskulären Organe

Das terminale Ileum, die Arteria pulmonalis und die Aorta descendens weisen alle eine glatte Muskulatur auf. Der Spasmolytische Effekt wurde am Darm getestet, der vasodilatierende Effekt an der Aorta und an der Lungenarterie.

Tabelle 14: Wirkung von MAH10.HCl auf die glatte Muskulatur

Organpräparate	MAH10.HCl	
	Kontraktionskraft $f \pm \text{SEM}$ (%) bei 100 $\mu\text{mol/l}$	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
Ileum terminale	0,00 \pm 0,00	17,2
Arteria pulmomalis	-86,56 \pm 4,82	18,0
Aorta descendens	- 63,50 \pm 9,54	57,0

Am isolierten Ileumpräparat kam es zur vollständigen Spasmolyse. Somit wurde der größte vasodilatierende Effekt am Darm erzielt. An der Arteria pulmonalis übte die Testsubstanz mit einem EC_{50} -Wert von 18,0 $\mu\text{mol/l}$ ebenfalls eine starke gefäßerweiternde Wirkung aus. Aufgrund der in Kapitel 3.7.2 bereits besprochenen Gründen wurde die Lungenarterie zur Untersuchung des Wirkmechanismus herangezogen. Auf die Durchführung dieser Versuche wurde in Kapitel 3.7 genauer

eingegangen. Bei allen drei Organen wurde ein EC_{50} -Wert erreicht, wobei die Testsubstanz am Darm und an der Lungenarterie am wirksamsten war.

5.1.1. Wirkung von MAH10.HCl auf das terminale Ileum

Aus den 4 Versuchen wurde bei der maximalen Kontraktion ein Kontrollwert von $6,44 \pm 0,35$ mN ermittelt. In Abhängigkeit von diesem Wert, wurde die Abnahme der Kontraktilität berechnet, die bei $100 \mu\text{mol/l}$ 100% betrug. Dies entspricht einer vollständigen Dilatation der glatten Muskulatur. Der EC_{50} -Wert konnte graphisch bestimmt werden und belief sich auf $17,2 \mu\text{mol/l}$. Demnach hat die Testsubstanz eine potente Wirkung auf die Kontraktilität des Darmes.

5.1.2. Wirkung von MAH10.HCl auf die Arteria pulmonalis

Schon bei einer Konzentrationszugabe von $3 \mu\text{mol/l}$ kam es zu einer Abnahme der Kontraktilität von $-8,86 \pm 2,14$ % bezogen auf den Kontrollwert. Bei weiterer Zugabe nahm die Kontraktion immer weiter ab, bis bei einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ eine Spannung von nur mehr $1,57 \pm 0,76$ mN registriert werden konnte. Dies entsprach eine Abnahme um $86,56 \pm 4,82$ %.

Anhand der Konzentrations-Wirkungskurve konnte der EC_{50} -Wert ermittelt werden, der $18 \mu\text{mol/l}$ betrug. Dieser Wert besagt, dass schon bei $18 \mu\text{mol/l}$ eine halbmaximale Wirkung eingetreten ist und gibt Hinweise darauf, dass MAH10.HCl eine starke Wirkung auf die Lungenarterie ausübt.

5.1.3. Wirkung von MAH10.HCl auf die Aorta descendens

An der Aorta wurde analog zur Lungenarterie die vasodilatierende Wirkung in 4 Versuchen untersucht.

Die Kontraktilität nahm nach der Zugabe von $3 \mu\text{mol/l}$ Testsubstanz um nur $4,35 \pm 0,97$ % ab. Erst bei der 10-fachen Konzentration konnte eine deutliche Abnahme der Kontraktilität registriert werden. Wie auch bei der Lungenarterie konnte keine völlige Vasodilatation erreicht werden, jedoch lag die Kontraktionsabnahme mit $-63,50 \pm 9,54$ bezogen auf den Kontrollwert (0%) deutlich über dem Wert der Arterie

pulmonalis (siehe Kapitel 4.1.4). Die schwächere vasodilatierende Wirkung der Aorta spiegelt sich auch im EC_{50} -Wert wieder, der sich auf $58 \mu\text{mol/l}$ belief und deutlich höher liegt als jener EC_{50} -Wert, den man für die Lungenarterie ermittelt hat.

5.2. Wirkung der Testsubstanz MAH10.HCl auf die Herzmuskulatur

Zu den quergestreiften Herzmuskulaturorganen zählen der Papillarmuskel und der rechte Vorhof.

Anhand der Papillarmuskelpräparate wurde eine starke Abnahme der Inotropie getestet. Eine negative Auswirkung der Testsubstanz MAH10.HCl auf die Chronotropie konnte am Vorhof gezeigt werden.

Damit die Versuche am Papillarmuskel reproduzierbare Ergebnisse lieferten, wurden die Präparate mit einem Rechteckimpuls vorkontrahiert, wohingegen der Vorhof auf Grund des Sinusknotens über ein eigenes Erregungsbildungszentrum verfügt und daher spontan aktiv ist (Schmidt et al. 2010).

Tabelle 15: Wirkung von MAH10.HCl auf die quergestreifte Muskulatur

Organpräparate	MAH10.HCl	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
	Kontraktionskraft $f \pm \text{SEM}$ (%) bei $100 \mu\text{mol/l}$	
Musculus papillaris	$0,00 \pm 0,00$	3,1
Atrium dexter	$0,00 \pm 0,00$	14,5

5.2.1. Wirkung von MAH10.HCl auf den Kontraktionstonus des Musculus papillaris

Die Testsubstanz MAH10.HCl hatte eine signifikante Wirkung auf die Inotropie des Papillarmuskels. Schon bei einer Konzentration von nur $3 \mu\text{mol/l}$ nahm der Kontraktionstonus im Vergleich zum Kontrollwert um die Hälfte ab. Bei $100 \mu\text{mol/l}$ der Testsubstanz ging die Amplitude gegen 0 mN und signalisierte somit eine vollständige Abnahme der Kontraktilität. Mit einem EC_{50} -Wert von nur $3,1 \mu\text{mol/l}$ erzielte die Testsubstanz am Papillarmuskel im Vergleich zu den anderen Organen die größte Wirkung.

5.2.2. Wirkung von MAH10.HCl auf die Schlagfrequenz des Atrium cordis dextrum

Aus den 4 Versuchen wurde der 0%-Wert ermittelt, in dessen Abhängigkeit die Abnahme der Schlagfrequenz berechnet wurde. Dieser Kontrollwert betrug $205 \pm 9,57$ Schläge pro Minute.

Zu Beginn der Testsubstanzzugabe kam es nur zu einer mäßigen Beeinflussung der Chronotropie. Die Abnahme belief sich auf knapp 25 %. Dies änderte sich jedoch bei einer Konzentration von $30 \mu\text{mol/l}$, die zu einem vorzeitigen Ende der Schlagkraft und somit zum Absterben der Vorhofpräparate führte.

Betrachtet man nun die ganze Versuchsreihe, erkennt man sehr gut, dass die Testsubstanz MAH10.HCl auf die quergestreifte Muskulatur die stärkste Wirkung ausgeübt hat. Bei beiden Organen, sowohl beim Vorhof als auch beim Papillarmuskel kam es zur maximalen Abnahme der Schlagfrequenz bzw. der Kontraktionskraft.

An den glattmuskulären Organen wurde ebenfalls eine signifikante Wirkung der Testsubstanz registriert, besonders am Darm kam es zur vollständigen Spasmolyse. Der vasodilatierende Effekt an der Lungenarterie war mit knapp 90% höher als an der Aorta, bei der sich der erweiternde Effekt auf die Gefäße nur auf 63% belief.

Die **Wirksubstanz MAH10.HCl** weist somit **keine selektive Wirkung** auf die Organe auf.

5.3. Untersuchung des möglichen Wirkmechanismus anhand der isolierten Arteria pulmonalis

Aufgrund der starken vasodilatierenden Wirkung vom MAH10.HCl auf die isolierte Arteria pulmonalis, wurde die Lungenarterie für die Untersuchung des möglichen Wirkmechanismus herangezogen.

Die kardiovaskulären Effekte wurden von Zhao et al. (2001) sowohl in vivo als auch in vitro untersucht. Anhand von Ratten wurde gezeigt, dass Schwefelwasserstoff einen wichtigen endogenen vasodilatierenden Faktor darstellt, dessen Wirkung auf die Öffnung der K_{ATP} -Kanäle beruht. Diese Aktivierung führt über eine Steigerung der

Calciumkonzentration zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase, die die Modulation diverser Signalwege anregt (Vohr 2010).

Unsere Untersuchungen an der Lungenarterie sollten klären, ob die Testsubstanz über die Freisetzung von H_2S K_{ATP} -Kanäle aktiviert. Für diesen Zweck wurden die K -Kanäle mit Glibenclamid (Kapitel 3.7.2.1) blockiert. Würde der Wirkmechanismus auf der Öffnung von Kaliumkanälen beruhen, müsste die Wirkung von MAH10.HCl auf die Arteria pulmonalis antagonisiert werden. Die Abnahme der Kontraktion des isolierten Lungenarterienpräparates nahm jedoch bei einer Konzentration der Testsubstanz von $30 \mu\text{mol/l}$ um 51 % ab und bei $100 \mu\text{mol/l}$ um 60%.

Die Ergebnisse und Diagramme aus Kapitel 4.1 zeigen deutlich, dass die Testsubstanz MAH10.HCl im Organismus kein oder nur eine geringe Menge an Schwefelwasserstoff freisetzt.

Andere denkbare Wirkmechanismen könnten z.B. auf der Freisetzung von Stickstoffmonoxid, der Blockade von H_1 -Rezeptoren oder von Ca -Kanälen beruhen.

6. Zusammenfassung

Im Zuge meiner Diplomarbeit wurde die Testsubstanz MAH10.HCl auf dessen Wirkung an isolierten Meerschweinchenorganen überprüft.

Die inotrope Wirkung wurde anhand der Papillarmuskelpräparate getestet, die Veränderung der Chronotropie wurde am rechten Vorhof untersucht. Beide Herzmuskelpräparate bestanden überwiegend aus quergestreiften Muskulaturfasern. Um die spasmolytische bzw. vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz zu überprüfen wurden glattmuskuläre Organe verwendet. Dazu werden der Darm, die Aorta und die Lungenarterie gezählt.

Am Ende jeder Versuchsreihe, die sich pro Organ aus mindestens 4 Versuchen zusammensetzte, wurde die prozentuelle Abnahme des Graphen und der EC_{50} -Wert ermittelt.

MAH10.HCl hatte auf alle Organe eine starke Wirkung. Besonders an den Herzmuskelpräparaten konnten effektive Resultate erzielt werden. Sowohl beim Vorhof als auch beim Papillarmuskel kam es zu einer 100%igen Abnahme der Schlagfrequenz bzw. Kontraktilität. Diese potente Wirkung spiegelt sich auch im EC_{50} -Wert wieder, der sich beim rechten Vorhof auf $14,5 \mu\text{mol/l}$ belief und beim Papillarmuskel auf $3,1 \mu\text{mol/l}$.

Auch an der glatten Muskulatur konnten signifikante Ergebnisse registriert werden. Am Darm führte die Substanz bei einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ zur vollständigen Spasmolyse und erzielte einen EC_{50} -Wert von knapp unter $18 \mu\text{mol/l}$. An der Aorta kam es mit einer 86%igen Abnahme der Kontraktilität und einem EC_{50} -Wert von $18 \mu\text{mol/l}$ zu einem starken vasodilatierenden Effekt. An der Aorta übte die Wirksubstanz im Vergleich zu den anderen Organen eine schwächere Wirkung aus. Bei einer maximalen Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ betrug der vasodilatierende Effekt 63,5%.

Anhand dieser Ergebnisse konnte keine Aussage über eine selektive Wirkung der Testsubstanz MAH10.HCl getroffen werden.

Um den Wirkungsmechanismus zu untersuchen wurden an Präparaten der Arteria pulmonalis in Kombination mit dem Kaliumkanalblocker Glibenclamid Versuche durchgeführt. Während dieser Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, dass K_{ATP} -Kanäle nicht am Wirkmechanismus beteiligt sind. Demzufolge müssen andere Wirkmechanismen an der Wirkung beteiligt sein.

7. Literaturverzeichnis

Ali, M.Y., Ping, C.Y., Mok, Y.Y., Ling, L., Whiteman, M., Bhatia, M., Moore, P.K. (2006): Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? *Br J Pharmacol* 149(6):625-34

Aktories K., Förstermann U., Hofmann F., Starke K. (2009): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10. Auflage. Urban & Fischer 451, 472-474, 616-617, 624-626, 1031

Estler C. J., Schmidt H. (2007): Pharmakologie und Toxikologie: Für Studium und Praxis. 6. Auflage, Schattauer Verlag 996

Fiorucci S., Distrutti E., Cirino G., Wallace J.L. (2006) The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology* 131: 259-271

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

Holleman Arnold F, Wilberg E, (2007) Lehrbuch der anorganischen Chemie. 102. Auflage. Walter de Gruyter 557-558, 1039

Huang, X.L., Zhou, X.H., Wei, P., Zhang, X.J., Meng, X.Y., Xian, X.H. (2008): Role of endogenous hydrogen sulfide in pulmonary hypertension induced by lipopolysaccharide. *Sheng Li Xue Bao* 60:211-215

Hunnus. Pharmazeutisches Wörterbuch (1986) 6. Auflage Walter de Gruyter 251, 535

Kane GC, Liu XK, Yamada S, Olson TM, Tercic A (2005) Cardiac KATP channels in health and disease. *J Mol Cell Cardiol* 38: 937-943

Kimura, Y., Kimura, H. (2004): Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J* 18:1165-1167

Konietzko N., Wendel H., Wiesner B., (1994): Erkrankungen der Lunge. Walter de Gruyter 581

Lefter, D.J. (2007): A new gaseous signaling molecule emerges: Cardioprotective role of hydrogen sulfide. *PNAS*, 104:17907-17908

Mortimer E. Charles, Ulrich Müller (2010) Chemie. 10. Auflage. Georg Thieme Verlag 422-423

Mutschler Ernst, Gerd Geisslinger, Heyo K. Kroemer, Peter Ruth, Monika Schäfer-Korting (2008) Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 9. Auflage. Wiss. Verlag-Ges. 557,574-585

Nelson MT, Quayle JM (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscles. *Am J Physiol* 268: C799-C822

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

Pryor, W.A., Houk, K.N., Foote, C.S., Fukuto, J.M., Ignarro, L.J., Squadrito, G.L., Davies, K.J. (2006): Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291(3):491-511

Schidt RF, Lang F, Heckmann Manfred (2010) Physiologie des Menschen. 29. Auflage. Springer Verlag

Seino S, Miki T (2003) Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺-channel. *Prog Biophys Mol Biol* 81:133-176

Thieme Chemistry (2009), Römpp online. Version 3.5 Auflage, Thieme

Vohr HW (2010) Toxikologie: Band 2: Toxikologie der Stoffe. Wiley-VCH. 43

Wang, Y.F., Mainali, P., Tang, C.S., Shi, L., Zhang, C.Y., Yan, H., Liu, X.Q., Du, J.B. (2008) Effects of nitric oxide and hydrogen sulfide on the relaxation of pulmonary arteries in rats. *Chin Med J* 121:420-423

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 Angaben:

Name: Reichinger Katharina
Geburtsdaten: 14.02.1989, Linz
Nationalität: Österreich

Ausbildung:

1999 - 2007: Bischöfliches Gymnasium Petrinum
Matura 11.06.2007

10/2007 – 07/2013 Studium an der Universität Wien
Diplomstudium Pharmazie

Berufliche Erfahrung:

März 2011 – Juni 2013: Universität Wien - Praktikum „Identitäts- und
Reinheitsprüfung biogener Arzneimittel “
(Tutor)

Februar 2011 – Juni 2013: Allerheiligen Apotheke Herbert Baldia KG (Teilzeit)

Juli 2009/10: Kreisapotheke in Gallneukirchen (Ferialpraktikant)

Juli 2007/08: Fresenius Kabi Austria GmbH (Ferialpraktikant)