



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Untersuchung der Wirkung der beiden neu synthetisierten Testsubstanzen SWS 73 HCl und SWS 80 HCl an isolierten Organen des Meerschweinchens

Verfasserin

Claudia Köberl

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik

## **Danksagung**

In erster Linie möchte ich mich vor allem bei Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Christian Studenik bedanken, der uns immer mit seiner überaus freundlichen, hilfsbereiten und fachkompetenten Betreuung zur Seite stand und dadurch ein stressfreies und angenehmes Arbeiten ermöglichte.

Des Weiteren möchte ich mich bei meiner Diplomkollegin und gleichzeitig auch eine meiner besten Freundinnen Anna Poznanska, die über all die Studienjahre an meiner Seite stand, bedanken. Dank ihr und Fatemeh Ektefaei herrschte ein tolles Arbeitsklima und ich hoffe, wir lachen auch in Zukunft noch so viel!

Aber auch meiner lieben Freundin und Studienkollegin Edvina Keserovic gilt großer Dank, weil sie immer für mich da war und durch sie unsere gemeinsame Lernzeit an den Fachprüfungen zu einer lustigen Zeit wurde.

Auch meiner Mama möchte ich herzlichst danken, dass sie immer hinter mir stand und mir Kraft gab.

Ein Dankeschön gilt auch meinem Papa, der mich in Fragen der Organisation unterstützte.

Meinem Bruder Stefan möchte ich vor allem für seine Hilfe bei den computerbezogenen Problemen bei der Gestaltung meiner Diplomarbeit danken.

Und last but not least möchte ich meinem Freund, Hannes Groll, vom ganzen Herzen danken, dass er immer für mich da war und auch in den stressigen Zeiten des Studiums stets Geduld und Verständnis für mich aufgebracht hat. DANKE!

## Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG .....	1
2. ZIEL DER DIPLOMARBEIT .....	6
3. MATERIAL UND METHODIK.....	7
3.1. Testsubstanzen: SWS 73 HCl und SWS 80 HCl .....	7
3.1.1. SWS 73 HCl .....	7
3.1.2. SWS 80 HCl .....	8
3.1.3. Herstellung der Testlösung .....	9
3.2. Verwendete Lösungen .....	10
3.2.1. Physiologische Nährlösung.....	10
3.2.2. Kaliumchloridlösung.....	11
3.2.2.1. Kaliumchloridlösung für die Versuche am Ileum terminalis .....	11
3.2.2.2. Kaliumchloridlösung für die Versuche an der Aorta descendes und Arteria pulmonalis .....	12
3.3. Versuchstiere.....	12
3.4. Isolierung und Präparation der Organe .....	13
3.4.1. Isolierung der einzelnen Organe .....	13
3.4.2. Präparation der einzelnen Organe .....	14
3.4.2.1. Präparation des rechten Vorhofs (Atrium cordis dexter) .....	15
3.4.2.2. Präparation der Lungenarterie (Arteria pulmonalis) .....	16
3.4.2.3. Präparation des Papillarmuskels (Musculus papillaris).....	16
3.4.2.4. Präparation der Aorta (Aorta descendes) .....	17
3.4.2.5. Präparation des Darms (Ileum terminalis) .....	19
3.5. Aufbau der Versuchsapparaturen .....	19
3.5.1. Versuchsapparatur A.....	20
3.5.2. Versuchsapparatur B.....	22
3.5.3. Kraftwandler, Verstärker, Schreiber .....	24
3.6. Der Versuchsablauf .....	25
3.6.1. Atrium dexter .....	26
3.6.2. Arteria pulmonalis.....	27
3.6.3. Musculus papillaris.....	27
3.6.4. Aorta descendes.....	28
3.6.5. Ileum terminalis .....	28

3.7. Auswertung und Statistik .....	30
3.7.1. Auswertung vom rechten Vorhof.....	30
3.7.2. Auswertung vom Papillarmuskel.....	30
3.7.3. Auswertung von den Organen der glatten Muskulatur .....	30
3.7.4. Statistik.....	31
4. ERGEBNISSE.....	32
4.1. Ergebnisse der Testsubstanz SWS 73 HCl.....	32
4.1.1. Atrium cordis dexter .....	32
4.1.2. Arteria pulmonalis.....	35
4.1.3. Musculus papillaris.....	38
4.1.4. Aorta descendes.....	41
4.1.5. Ileum terminalis .....	44
4.2. Ergebnisse der Testsubstanz SWS 80 HCl.....	47
4.2.1. Atrium dexter .....	47
4.2.2. Arteria pulmonalis.....	50
4.2.3. Musculus papillaris.....	53
4.2.4. Aorta descendes.....	56
4.2.5. Ileum terminalis .....	59
5. DISKUSSION .....	62
5.1. Wirkung auf glattmuskuläre Organe.....	62
5.2. Wirkung auf die Herzmuskulatur .....	63
6. ZUSAMMENFASSUNG .....	66
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	67
8. LEBENSLAUF .....	70

# 1. EINLEITUNG

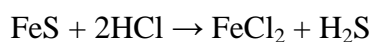
Schwefelwasserstoff ist ein farbloses, brennbares und intensiv nach faulen Eiern riechendes Gas.

Dieser Geruch entsteht bei der Einwirkung von Säuren auf Schwermetallsulfide und bei der reduktiven Zersetzung von Eiweiß, insbesondere schwefelhaltigen Aminosäuren. Während Schwefelwasserstoff in geringeren Konzentrationen durch seinen typischen stechenden Geruch leicht vom Menschen wahrgenommen wird, riecht das Gas in höheren Konzentrationen eher süßlich. Jedoch kommt es ziemlich rasch zu einem Gewöhnungseffekt und weiters sogar zu einer Blockade der Geruchsrezeptoren (Aktories 2009).

Schwefelwasserstoff mit der Formel  $H_2S$  ist wenig in Wasser und etwas besser in Alkohol löslich.



Die Gewinnung von  $H_2S$  erfolgt im Labor nach folgender Reaktionsgleichung, indem Salzsäure auf Eisen-II-sulfid getropft wird.



$H_2S$  besitzt einen MAK-Wert von  $15\text{mg}/\text{m}^3$  und ist deshalb als durchaus toxisches Gas anzusehen. Dieser Wert gibt die maximal zulässige Konzentration eines Stoffes am Arbeitsplatz an, bei der kein Gesundheitsschaden zu erwarten ist, auch wenn man der Konzentration in der Regel 8 Stunden täglich, maximal 40 (42) Stunden in der Woche ausgesetzt ist (Hunnius 1997, Mutschler et al. 2001).

Große Mengen an  $H_2S$  entstehen vor allem in Ställen bei Massentierhaltung.  $H_2S$  Intoxikationen treten meistens bei Arbeiten in chemischen Laboratorien und Abwasserkanälen auf (Aktories 2009).

Bei der Aufnahme von nur geringen Mengen kommt es bereits zu Übelkeit, Erbrechen, Hyperpnoe, Krämpfe, Schwäche und auch Reizung der Atemwege, währenddessen es bei höheren Konzentrationen zu einer akuten Vergiftung führen kann, die sich in einer rasch eintretenden zentralen Atemlähmung äußern kann. Man geht davon aus, dass diese Vergiftungserscheinungen auf der Hemmung der eisenhaltigen Atmungsenzyme durch  $H_2S$  beruhen. Jedoch ist der genauere Wirkungsmechanismus noch nicht geklärt (Mutschler et al. 2005).

Die Therapie erfolgt symptomatisch durch künstliche Beatmung. Dazu besteht die Möglichkeit der zusätzlichen Applikation von 4- DMAP (Diethylaminophenol) (Oberdisse et al. 2001). Da diese Verbindung eine höhere Affinität zur Cytochromoxidase besitzt als  $H_2S$  wird die Gabe oftmals sehr empfohlen (Mutschler et al. 2008).

Aus diesen Gründen wurde  $H_2S$  lange Zeit nur als übelriechendes, giftiges Gas eingestuft (Zhao et al 2001). Erst als man herausfand, dass es auch endogen im Menschen durch den Cysteinmetabolismus gebildet wird, hat es eine höhere physiologische Bedeutung bekommen (Kammoun et al. 2004). Dabei wird L-Cystein, eine schwefelhaltige Aminosäure, durch die zwei Enzyme Cystathion-beta-Synthase (CBS) und Cystathion-gamma-Lyase (CSE) zu  $H_2S$  umgewandelt (Stipanuk and Beck 1982, Erickson et al. 1990, Hosoki et al 1997).

Diese beiden Enzyme unterscheiden sich vor allem durch ihre Lokalisation. Während CBS verstärkt die Bildung von  $H_2S$  im Gehirn und Nervensystem steuert, findet man CSE vermehrt in der Leber und im kardiovaskulären System (Szabo 2007, Abe and Kimura 1996).

Somit stand fest, dass das anorganische Molekül  $H_2S$  neben seinen schädlichen Wirkungen auch physiologische Wirkungen haben muss (Wang et al. 2002).

Forscher konnten durch zahlreiche Studien zeigen, dass  $H_2S$  eine Analogie zu den anderen vaskulären Faktoren wie NO und CO besitzt. Diese beiden Mediatoren erhöhen das zelluläre cGMP (Cyclische Guanosinmonophosphat) und führen dadurch zu einer Gefäßrelaxation (Zhao et al. 2001).

Dieser vasodilatierende Effekt ist bereits durch die kardioprotektive Wirkung des Knoblauchs bekannt, dessen Wirkung auf die Bildung von H<sub>2</sub>S aus die von ihm enthaltenen Polysulfide zurückgeführt wird (Benavides et al. 2007).

Zhao stellte zuerst die Hypothese auf, dass der vasodilatierende Effekt von H<sub>2</sub>S auf einer Aktivierung des ATP abhängigen Kalium Kanals beruht (Zhao 2001).

Der K<sub>ATP</sub> Kanal wurde zum ersten Mal im Herzen entdeckt. Sein Aufbau gleicht einem Heterooctamer, der sich in jeweils zwei mal vier homologen Untereinheiten gliedert. Die eine vierer Gruppe trägt den Namen SUR (Sulfonylharnstoff Rezeptor) und die andere wird als KIR (Killer cell immunoglobulin like Rezeptor) bezeichnet (Seino and Miki 2003, Holzwarth 2004).

Der Kanal wird physiologisch durch Adenosinriphosphat, kurz auch als ATP bezeichnet, gesteuert, indem er durch dessen Anstieg geschlossen beziehungsweise bei dessen Abfall geöffnet wird (Mutschler 2001).

Folglich kommt es durch die Öffnung dieser Kanäle zu einer Hyperpolarisation der Zelle und weiteres zur Erschlaffung der glatten Muskulatur (Zhao et al. 2001).

Andere Studien zeigten jedoch, dass der K<sub>ATP</sub> Kanal nicht der einzige Wirkmechanismus von H<sub>2</sub>S sein kann.

Der Versuch, den vasodilatierenden Effekt von NaHS durch den Kalium Kanalblocker Glibenclamid zu kompensieren, schlug in mehreren Studien fehl (Kubo et al. 2007, Teague et al. 2002).

Zudem fand man heraus, dass sowohl der intrazelluläre pH-Wert (Lee et al. 2007) als auch die Sauerstoffversorgung (Koenitzer et al. 2007) eine beteiligende Rolle am relaxierenden Effekt spielen.

Schwefelwasserstoff stellt somit aufgrund seiner vasodilatierenden und kardioprotektiven Wirkung einen neuen möglichen Ansatz für die Therapie der essentiellen Hypertonie dar.

Nach Definition der WHO gilt ein systolischer Blutdruck bis 130 mmHg oder ein diastolischer Blutdruck bis 85 mmHg als normaler Blutdruck. Als Hypertonie wird ein

Blutdruck ab 140/90 mmHg bezeichnet. Dazwischen liegt ein Bereich, der zwar als „hoch normal“ angeführt wird, jedoch noch keine Pharmakotherapie benötigt. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass hier einfache Änderungen der Lebensgewohnheiten schon große Effekte erzielen können. Dazu zählen folgende Maßnahmen:

- Gewichtsreduktion bei übergewichtigen Patienten
- Einschränkung des Alkoholkonsums auf unter 30g Ethanol/Tag
- Körperliche Betätigung, Sport
- Kochsalz- und fettarme Ernährung, gesunde obst- und gemüsereiche Kost
- Entspannungsverfahren und Stressbewältigung
- Einstellen des Rauchens

Wird jedoch eine Hypertonie diagnostiziert, sollte zusätzlich zu diesen Maßnahmen eine medikamentöse Behandlung unter Aufsicht eines Arztes erfolgen. Zu der antihypertensiven Therapie stehen uns prinzipiell folgende fünf unterschiedliche Substanzklassen zur Verfügung:

- ACE- Hemmer (zB Captopril, Ramipril, Enalapril)
- Sartane (zB Losartan, Candesartan)
- Betaadrenorezeptorblocker (zB Metoprolol, Bisoprolol, Atenolol)
- Diuretika (zB Furosemid, Chlorothiazid, Spironolacton)
- Calciumantagonisten (zB Nifedipin, Amlodipin)

ACE-Hemmer verhindern durch die Hemmung des Angiotensin-Converting-Enzyms die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II, welches Blutdruck steigernd wirkt. Zusätzlich inhibieren sie den Abbau von Bradykinin, welches eine zusätzliche vasodilatierende Wirkung mit sich bringt.

Sartane sind AT1-Rezeptor-Antagonisten und blockieren die Bindung von Angiotensin II an seinen Rezeptor und somit wiederum den Blutdruck steigernden Effekt.

Betaadrenorezeptorblocker senken den Blutdruck, indem das Herz ökonomischer arbeiten kann.

Diuretika führen zu einer vermehrten Flüssigkeitsausscheidung, wodurch das Blutvolumen und schlussendlich wieder der Blutdruck gesenkt werden.



Calciumantagonisten bewirken durch die Hemmung des Calciumeinstroms eine Vasodilatation der glatten Gefäßmuskelzellen, wodurch der periphere Widerstand abnimmt und zu einer Blutdrucksenkung führt (Aktories 2009).

Sollte der gewünschte therapeutische Effekt durch die bereits genannten Wirkstoffklassen ausbleiben, gibt es noch folgende Reservewirkstoffe, auf die zugegriffen werden kann:

- Alphaadrenorezeptorblocker
- Kaliumkanalöffner
- Vasopeptidasehemmer

Ziel der Pharmakotherapie der Hypertonie ist es, die Folgen wie Arteriosklerose und des weiteren einen Myokardinfarkt sowie Apoplexie zu verhindern (Aktories 2009).

Eine Unterform der Hypertonie ist die pulmonale Hypertonie, die zu den Orphan Diseases gezählt wird. Sie gehört zu einen der schwerwiegendsten Erkrankungen mit geringer Chance auf Heilung und kurzer Überlebenszeit von 5 Jahren (Mutschler et al. 2008).

Huang konnte zeigen, dass durch Einsatz von NaHS eine künstlich hervorgerufene Hypertonie gelindert werden konnte (Huang et al. 2008). Dies wäre von großer Bedeutung, da zurzeit nur folgende Therapieansätze zur Verfügung stehen und diese auch nur mit eingeschränktem Erfolg zu sehen sind (Mutschler et al. 2008):

- Endothelinantagonist (Bosentan)
- Prostacyclinderivat (Iloprost)
- Phosphodiesterasehemmer (Sildenafil)

H<sub>2</sub>S kam bereits bei vielen anderen Erkrankungen wie einer akuten Bauchspeicheldrüsenentzündung (Bhatia et al. 2005) und beim Down Syndrom (Kamoun 2001) zur Anwendung und stellt nun einen neuen Hoffnungsträger für die Zukunft im Bereich der Therapie der Hypertonie dar.

## 2. ZIEL DER DIPLOMARBEIT

Die Aufgabe bestand darin, die Wirkungen der beiden neu synthetisierten Testsubstanzen SWS 73 HCl und SWS 80 HCl an fünf isolierten Organen des Meerschweinchens zu erforschen.

Diese beiden möglicherweise Schwefelwasserstoff freisetzenden Verbindungen wurden zum einen an der glatten Muskulatur wie der Aorta und der Lungenarterie getestet. Hier erhoffte man sich einen vasodilatierenden Effekt, der jedoch bei beiden Substanzen ausblieb.

In einer weiteren Versuchsreihe überprüfte man die spasmolytische Aktivität der Wirkstoffe auf den isolierten Darm.

Um eine unerwünschte Wirkung auf die quergestreifte Muskulatur des Herzens ausschließen zu können, wurden am rechten Vorhof Änderungen der Chronotropie und am Papillarmuskel Änderungen der Inotropie durch die Testsubstanzzugabe gemessen.

Anhand der ermittelten Ergebnisse konnte eine Dosis-Wirkungskurve erstellt werden, wobei es galt, einen  $EC_{50}$ -Wert unter  $30\mu\text{mol/l}$  zu erreichen, um von einer potentiellen Wirkung sprechen zu können.

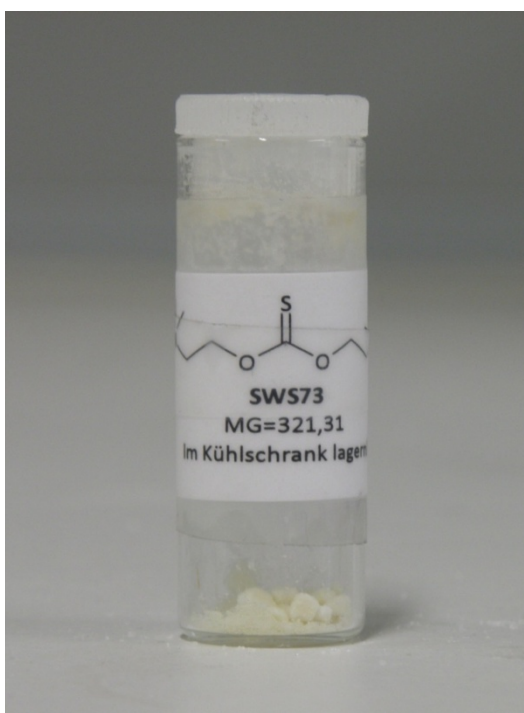
### 3. MATERIAL UND METHODIK

#### 3.1. Testsubstanzen: SWS 73 HCl und SWS 80 HCl

Am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien wurden die beiden Testsubstanzen mit dem Substanzcode SWS 73 HCl und SWS 80 HCl unter der Leitung von Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker synthetisiert, um dessen pharmakologische Wirkung an isolierten Organen von Meerschweinchen zu untersuchen.

##### 3.1.1. SWS 73 HCl

Abbildung 1: Originalabbildung der Testsubstanz SWS 73 HCl



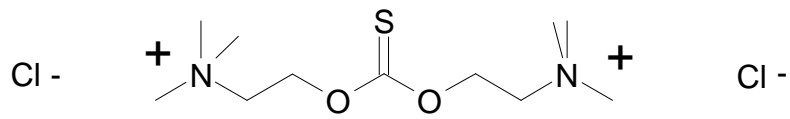
Substanzcode: SWS 73 HCl

Systematische Bezeichnung:

Di[2-*N,N,N*-trimethylammonium]ethylthiocarbonatdichlorid

Molekulargewicht: 321,31 g/mol

Abbildung 2: Strukturformel von SWS 73 HCl



### 3.1.2. SWS 80 HCl

Abbildung 3: Originalabbildung der Testsubstanz SWS 80 HCl



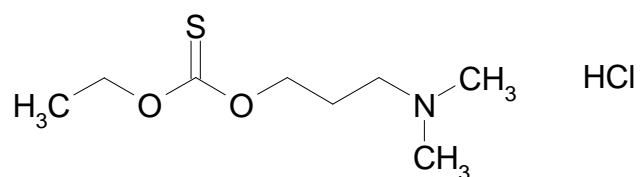
Substanzcode: SWS 80 HCl

Systematische Bezeichnung:

Ethyl [2-(Dimethylamino)propoxy]methanthioat-Hydrochlorid

Molekulargewicht: 225,74 g/mol

Abbildung 4: Strukturformel von SWS 80 HCl



### 3.1.3. Herstellung der Testlösung

Zu Beginn musste die Art des Lösungsmittels für die beiden Schwefelwasserstoff freisetzenden Verbindungen bestimmt werden, um die nachfolgenden Untersuchungen durchführen zu können.

Da es sich um hydrophile Substanzen handelte, konnten sie problemlos in je 100 µl Aqua bidestillata gelöst werden und die benötigte Substanzmenge wurde anhand des Molekulargewichtes einzeln berechnet und eingewogen.

Um reproduzierbare Ergebnisse erzielen zu können war es wichtig, dass die Testlösung jeden Tag frisch zubereitet und sie danach solange im Kühlschrank aufbewahrt wurde, bis sie für die Versuche benötigt wurde.

Da Organbäder mit unterschiedlichem Fassungsvermögen von 8 ml und 25 ml zur Verfügung standen, musste auch dies in die Berechnung der Substanzmenge, wie folglich der Tabelle 1 zu entnehmen, berücksichtigt werden.

Tabelle 1: Einwaage der Testsubstanzen

Testsubstanz	Organbadvolumen (ml)	Molekulargewicht	Einwaage der Testsubstanz (mg)
SWS 73 HCl	8	321,31	0,27
	25		0,80
SWS 80 HCl	8	225,74	0,19
	25		0,56

Bevor man mit der Zugabe der Testlösung beginnen konnte, erfolgte eine Kontrollphase von mindestens 45 Minuten. In dieser Zeit passte sich das Präparat an sein Umgebungsmilieu an und es galt eine konstante Kontraktionskurve abzuwarten. Sobald dieses konstante Niveau erzielt war, durfte die kumulative Zugabe der Testsubstanz nach folgendem Pipettierschema begonnen werden.

Tabelle 2: Pipettierschema

Testsubstanzvolumen	Organbadkonzentration ( $\mu\text{mol/l}$ )
1	1
2	3
7	10
20	30
70	100

## 3.2. Verwendete Lösungen

### 3.2.1. Physiologische Nährlösung

Jeden Morgen, eine halbe Stunde vor Arbeitsbeginn, musste eine physiologische Nährlösung hergestellt werden. Diese Mischung wird auch als Tyrode bezeichnet, dessen Namen sie dem Pharmakologen Maurice Veju Tyrode verdankt. Nach der Vorschrift von Reiter (1967) wurden die in der folgenden Tabelle 3 aufgelisteten Substanzen miteinander vermengt.

Tabelle 3: Bestandteile der Tyrodelösung

Substanz	Molare Masse (g/mol)	Stocklösung	Menge für 1 Liter Tyrode	Mmol/l
NaCl	58,44	1000,25g/5L	33,6	115,01
KCl	74,55	50,33g/5L	35,0	4,73
NaHCO <sub>3</sub>	84,01	125,00g/5L	83,7	24,91
MgSO <sub>4</sub>	120,37	147,02g/5L	1,18	0,29
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	62,00g/250ml	1,18	2,15
CaCl <sub>2</sub>	110,98	34,00g/250ml	3,2	3,92
Glucose	180,16	Reinsubstanz	1,98	

Zu Beginn titrierte beziehungsweise pipettierte man die bereits fertig zubereiteten Lösungen von Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, Magnesiumsulfat und Kaliumhydrogenphosphat in einen 2 Liter Messkolben. Daraufhin

fügte man die Festsubstanz Glucose hinzu und füllte den Kolben bis ungefähr zu  $\frac{3}{4}$  seines Endvolumens mit Aqua bidestillata auf. Nun musste die Mischung 20 Minuten mit einer Gaskombination namens Oxymix bestehend aus 95% CO<sub>2</sub> und 5% O<sub>2</sub> durchperlt werden. Erst nach Ablauf dieser Zeitspanne durfte die letzte Substanz, das Calciumchlorid, vorsichtig tropfenweise ergänzt werden. Diese langsame Zugabe sollte eine weiße Trübung der Lösung verhindern, die das Ausfallen von schwerlöslichen Calciumsalzen bedeuten würde. In so einem Fall wäre die Tyrode nicht für die bevorstehenden Versuche geeignet und zu verwerfen gewesen. Bleibt die Tyrode klar, konnte das restliche Volumen bis zur Eichmarke nochmals mit Aqua bidestillata aufgefüllt werden. Um abschließend noch eine optimale Mischung der einzelnen Komponenten zu erhalten, schwenkte man den Kolben einige Male um.

Die nun fertige Tyrode diente vor allem zur Aufbewahrung der isolierten Organe. Sowohl während des Präpariervorganges als auch während des gesamten Versuchsablaufes gewährleistete die stets umgebene Nährlösung eine optimale Elektrolytversorgung der einzelnen Organe.

### ***3.2.2. Kaliumchloridlösung***

Für die Versuche an der glatten Muskulatur des Ileums terminalis, der Arteria pulmonalis und der Aorta descendes war zusätzlich jeden Tag die Herstellung einer frischen Kaliumchloridlösung von Nöten. Sie diente zur Vorkontraktion der Präparate, um nach der darauffolgenden Testsubstanzzugabe eine mögliche gefäßerweiternde Wirkung feststellen zu können.

Bei den Präparaten des Papillarmuskels konnte ohne Kaliumchloridlösung gearbeitet werden, da hier die Reizung mittels Elektrode erfolgte. Ebenso bei den Versuchen am Atrium war die autonome Schlagfähigkeit durch den Sinusknoten bereits gegeben.

Die benötigte Menge an Kaliumchloridlösungen mussten in zwei unterschiedlichen Konzentrationen – wie folglich beschrieben – zubereitet werden.

#### **3.2.2.1. Kaliumchloridlösung für die Versuche am Ileum terminalis**

Für die Vorkontraktion des Ileums terminalis war die Herstellung einer 60 mmolare Lösung notwendig. Dafür wurden 0,45 g KCl in einen 100 ml Messkolben genau

eingewogen und anschließend mit der bereits zubereiteten Tyrodelösung bis zur Eichmarke aufgefüllt.

### **3.2.2.2. Kaliumchloridlösung für die Versuche an der Aorta descendes und Arteria pulmonalis**

Für die Vorkontraktion dieser beiden Organe wurde eine 90 mmolare Lösung hergestellt, indem man 0,67 g KCl in einen 100 ml Messkolben füllte und diesen wiederum bis zum Meniskus mit der Tyrode ergänzte.

## **3.3. Versuchstiere**

Um die pharmakologische Wirkung der beiden Testsubstanzen auf die glatte Muskulatur und der Herzmuskulatur feststellen zu können, benötigte man Versuchstiere, die ähnliche Ionenkanäle wie der Mensch besitzen. Dafür kamen vor allem das Schwein und das Meerschweinchen in Betracht. Da man aber zusätzlich durch die Größe der Versuchsanordnung eingeschränkt war, entschied man sich schlussendlich für das Meerschweinchen.

Bei den folgenden Versuchen wurden ausschließlich Tiere vom TRIK Stamm aus Graz verwendet. Sie waren sowohl männlich als auch weiblich, wogen durchschnittlich zwischen 300 und 600 g und waren maximal ein paar Wochen alt.

Für jeden Versuchstag war die Tötung eines Meerschweinchens notwendig. Dies geschah durch einen gezielten Genickschlag gegen die Tischkante von geschultem Personal. Der Schlag gewährleistete einen schnellen und schmerzfreien Tod des Versuchstieres.



Abbildung 5: Versuchstiere



### 3.4. Isolierung und Präparation der Organe

#### 3.4.1. Isolierung der einzelnen Organe

Für die Isolierung der einzelnen Organe war das wie in der nachfolgenden Abbildung ersichtliche Sezierbesteck von Nöten: Pinzette, Spitzschere, Federschere sowie zusätzlich drei Bechergläser und ein Bindfaden.

Abbildung 6: Sezierbesteck



Unmittelbar nach der Tötung des Meerschweinchens wurde der Thorax vorsichtig mit einer Schere geöffnet. Zuerst wurde das Herz entnommen und in ein Becherglas mit Oxymix versorgter Tyrodelösung befördert. Dieser Vorgang sollte rasch ablaufen, um eine Hypoxie des Organs zu vermeiden. Danach erfolgte die Isolierung des terminalen Ileums. Hierfür trennte man sorgfältig ein circa 20 cm langes Stück vor dem Caecum (Blinddarm) liegenden Darms ab und markierte das andere Ende nach dem Jejunum (Leerdarm) durch einen Knoten mit einem Bindfaden. Diese Markierung diente zur Vorbeugung einer späteren möglichen Verwechslung der beiden Enden. Das entnommene Darmstück tauchte man nun ebenfalls zügig in ein mit Tyrodelösung gefülltes Becherglas, da der Darm als besonders empfindlich bei fehlendem Sauerstoff galt. Nach der erfolgreichen Entnahme des Herzens und des Darms konnte nun die Isolierung der Aorta beginnen, welche hinter dem Herzen lokalisiert ist. Aus diesem Grund musste der Thorax noch weiter geöffnet werden, um die Lunge und das davorliegende Zwerchfell zu entfernen. Erst jetzt war es möglich, die entlang des Rückgrats angewachsene Aorta mit einer Pinzette zu erfassen und vorsichtig mit einer Spitzschere herauszuschneiden. Dies musste jedoch sehr vorsichtig durchgeführt werden, da die Aorta weder durch die Schere verletzt werden durfte, noch eine zu starke Überdehnung des Organs geschehen sollte. Das 2 - 3 cm lange Stück überführte man wiederum in ein weiteres, frisch mit Tyrode befülltes Becherglas.

Der restliche Tierkörper wurde unmittelbar entsorgt und die Präparation der einzelnen Organe konnte nun beginnen.

### ***3.4.2. Präparation der einzelnen Organe***

Die Präparation erfolgte in Glaspetrischalen, die mit einem Korkboden und einem Gummischlauch am Rand ausgestattet wurden. Diese Vorrichtung ermöglichte eine anschließend bessere Fixierung mit Präpariernadeln der fünf zuvor entnommenen Organe. Zusätzlich befüllte man die Schalen mit Nährstofflösung und begaste sie mit Oxymix, um ein frühzeitiges Absterben während des Präparationsvorganges zu verhindern. Aufgrund der geringen Größe der Organe fand die Bearbeitung der Präparate meist unter einem Mikroskop statt.

Abbildung 7: Präparierbesteck und Auflichtmikroskop



### 3.4.2.1. Präparation des rechten Vorhofs (Atrium cordis dexter)

Das im Becherglas schwimmende isolierte Herz wurde in eine vorbereitete Petrischale übergeführt und dort mittels zwei Präpariernadeln vorsichtig am Korkboden fixiert. Unter der Verwendung des Mikroskops war es möglich, umliegendes Fett- und Bindegewebe sowie störende Lungenfragmente präzise mit einer Federschere zu entfernen. Als nächstes trennte man den rechten Vorhof entlang des Sulcus coronarius von der Herzkammer ab. Für die Versuche eignete sich nur der rechte Vorhof, da hier an der oberen Hohlvene der Sinusknoten lokalisiert war und nur dieser die autonome Schlagfrequenz als primärer Impulsgeber gewährleisten konnte. Um nun ein erfolgreiches Einspannen des Organs in die Apparatur zu ermöglichen, war das Anbringen von Silberhäkchen von Nöten. Diese befestigte man mit Hilfe eines Bindfadens mittels Doppelknoten jeweils an der Basis und an der Spitze des Vorhofs. Dieser Vorgang war mit besonderer Sorgfalt auszuführen, da eine Überdehnung oder eventuelle Verletzung des Organs die Schlagkraft des Sinusknoten verhindert hätte und das Präparat nicht mehr versuchstauglich gewesen wäre. Den nun fertig präparierten Vorhof überführte man in ein mit Nährstofflösung gefülltes Becherglas, um ihn umgehend an seinen Versuchsort zu seiner entsprechenden Apparatur zu transportieren.

Abbildung 8: Präparierter Vorhof



#### **3.4.2.2. Präparation der Lungenarterie (Arteria pulmonalis)**

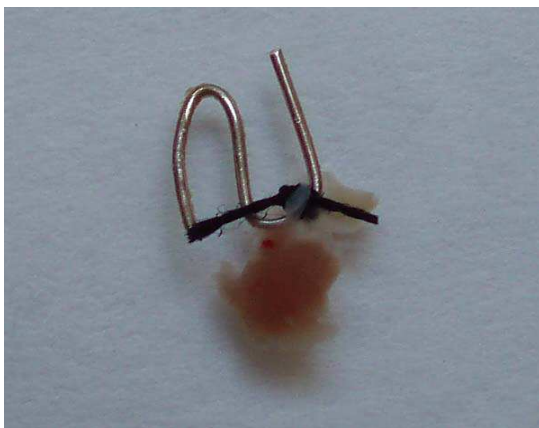
Das nun bereits vom Atrium dexter befreite Herz wurde als nächstes zur Isolierung der Lungenarterie herangezogen. Anatomisch betrachtet entspringt die Arteria pulmonalis aus der rechten Herzkammer und befördert sauerstoffarmes Blut in die Lunge. Das für die Versuche benötigte Arterienstück bezeichnet man auch als Truncus pulmonalis und ist nur in etwa 1 cm kurz, da es sich bald in eine rechte und linke Arterie aufsplittet. Aufgrund dieser geringen Länge war es wichtig, die Arterie so nah wie möglich am Herzen abzutrennen, um sie dann nochmals in zwei bis drei weitere kleine Ringe separieren zu können. Zum Schluss entfernte man noch, falls vorhanden, überschüssige Fett- und Muskelgewebereste mit Hilfe einer Federschere. Hier war das Anbringen von Silberhäkchen nicht erforderlich, da sich die Präparate aufgrund ihrer ringförmigen Struktur problemlos in die Apparatur einspannen ließen.

#### **3.4.2.3. Präparation des Papillarmuskels (Musculus papillaris)**

Als letzte Organisolierung aus dem Herzen waren die Papillarmuskeln, die sich in der Herzkammer befanden, an der Reihe. Man begann mit der Entnahme des Musculus

papillaris aus dem rechten Ventrikel, indem man diesen entlang des Septums bis zu der Herzspitze öffnete und vorsichtig umklappte. Als nächstes entfernte man die umliegenden Purkinje Fasern, die ein Teil des Erregungssystems darstellten, da diese durch ihre Spontanaktivität die gleichmäßige Kontraktionskraft des Organs stören würden. Zusätzlich entnahm man auch Papillarmuskeln aus dem linken Ventrikel, um mehrere Präparate für die Versuche zur Verfügung zu haben. Grundsätzlich bevorzugte man jedoch den Musculus papillaris aus der rechten Herzkammer, da dieser meist dünner ausgebildet war und dem maximalen Durchmesser von 0,87 mm eher entsprach (Koch-Weser 1963). Diese Tatsache bedingte eine oft bessere Kontraktionskraft. Um eine spätere Verwechslung zu vermeiden, benutzte man für das Anbringen des Silberhäkchens an der Oberseite des Papillarmuskels aus dem rechten Ventrikel einen roten Faden und für die anderen aus dem linken Ventrikel je einen gewöhnlichen blauen Faden. Auf das Festmachen eines zweiten Hakens konnte hier verzichtet werden, da die speziell nur für den Papillarmuskel vorhandene Apparatur dies nicht erforderte. Die erfolgreich bearbeiteten Organe gelangten abermals zur Aufbewahrung in ein mit Tyrodelösung gefülltes Becherglas.

Abbildung 9: Präparierter Papillarmuskel



#### **3.4.2.4. Präparation der Aorta (Aorta descendes)**

Die aus dem Thorax zuvor entnommene Aorta wurde ebenfalls in eine Petrischale transferiert und dort an beiden Enden mit jeweils einer Nadel am Korkboden befestigt. Mit großer Sorgfalt musste auch hier das umgebende Fettgewebe und die störenden Blutgerinnsel so gut wie möglich beseitigt werden. Für diese durchaus herausfordernde Aufgabe zog man die Federschere heran, wobei es wichtig war, keine Löcher in das

Organ damit zu verursachen. War dies gelungen, zerstückelte man das fettfreie Aortenstück in circa zwei bis drei Zentimeter große Ringe, die analog zur Lungenarterie direkt für die folgenden Versuche verwendet werden konnten. Währenddessen mussten Randstücke, die durch die Präpariernadeln bereits perforiert worden waren, verworfen werden.

Abbildung 10: Aorta descendens mit umgebenden Fettgewebe und Blutgerinnsel



Abbildung 11: Präparierte Aorta



### 3.4.2.5. Präparation des Darms (Ileum terminalis)

Genauso wie die zuvor beschriebenen Organe musste sich auch der Darm einer präzisen Präparation unterziehen, um ein müheloses Einspannen in die Apparatur sicherzustellen. Dafür trennte man ein circa ein Zentimeter langes Stück vom caecalen gelegenen Ende des circa zwanzig Zentimeter langen isolierten Darms ab. Dieses Darmsegment fixierte man an der Ober- und Unterseite mit zwei Präpariernadeln in einer Petrischale und schnitt dann die beiden Enden schräg ab. Bei vorhandenen Chymus durchspülte man das Organ zusätzlich mit einer Pasteurpipette. Dieses Vorgehen war erforderlich, um die spätere Wirkstoffzirkulation durch den Darm zu verbessern. Zum Schluss befestigte man die Silberhaken mittels Doppelknoten mit einem Bindefaden an beiden Enden, jedoch ohne die Löcher zu verschließen. Grundsätzlich war hier ein zügiges Arbeiten notwendig, da der Darm als besonders empfindlich gegenüber zu langem Sauerstoffmangel galt und somit sobald wie möglich in seine für ihn vorgesehene Apparatur eingespannt werden sollte.

Abbildung 12: Präparierter Darm



## 3.5. Aufbau der Versuchsapparaturen

Für die folgenden Untersuchungen der Testsubstanzen SWS 73 und SWS 80 standen zwei Apparaturen mit gleicher Funktionsweise zur Verfügung, die sich nur marginal wie unten beschrieben – unterscheiden.

Die Apparatur A kam ausschließlich für die Versuche am Papillarmuskel zum Einsatz währenddessen in Apparatur B alle übrigen Organe behandelt wurden.

### 3.5.1. Versuchsapparatur A

Abbildung 13: Original Darstellung der Apparatur A

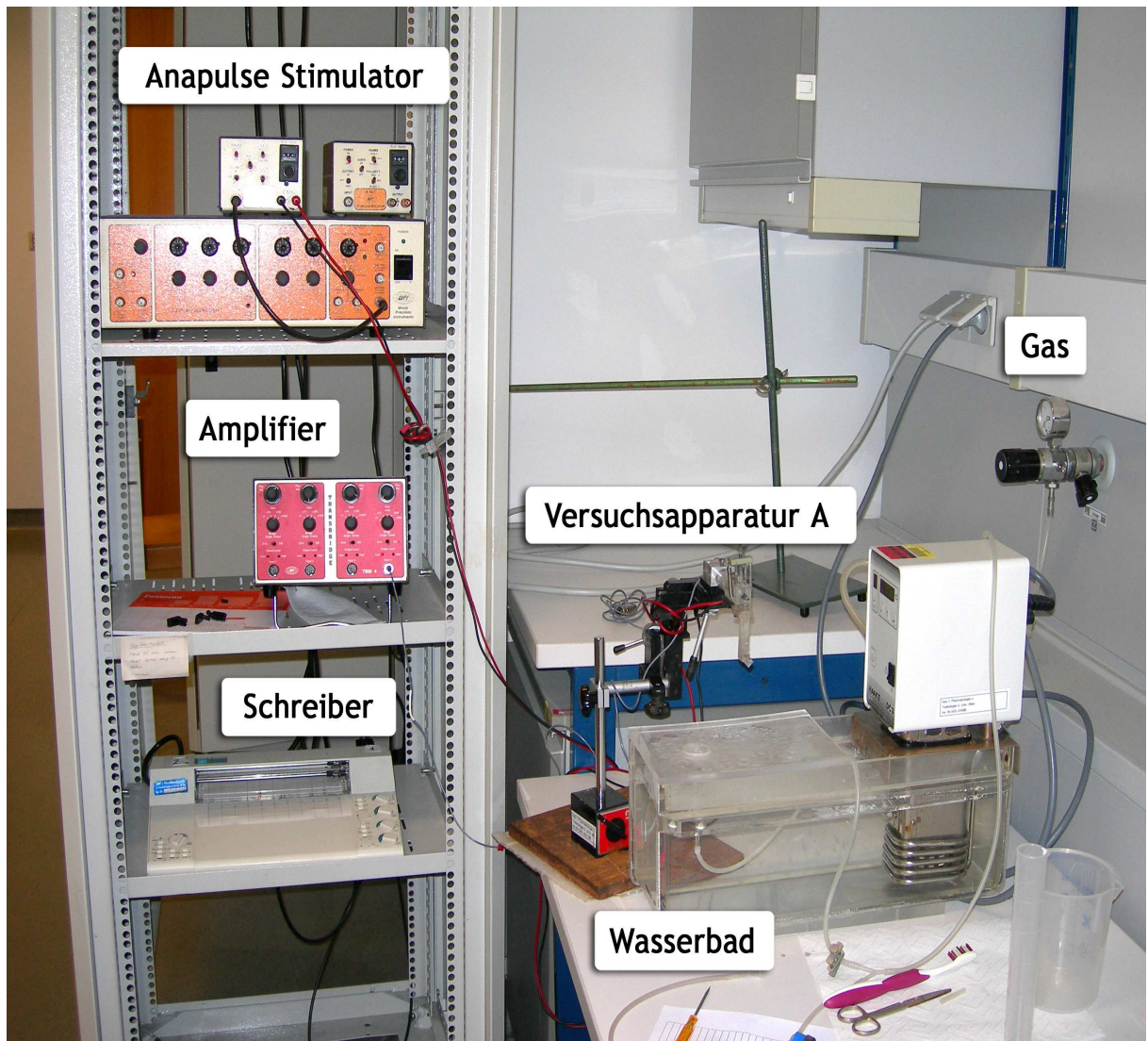
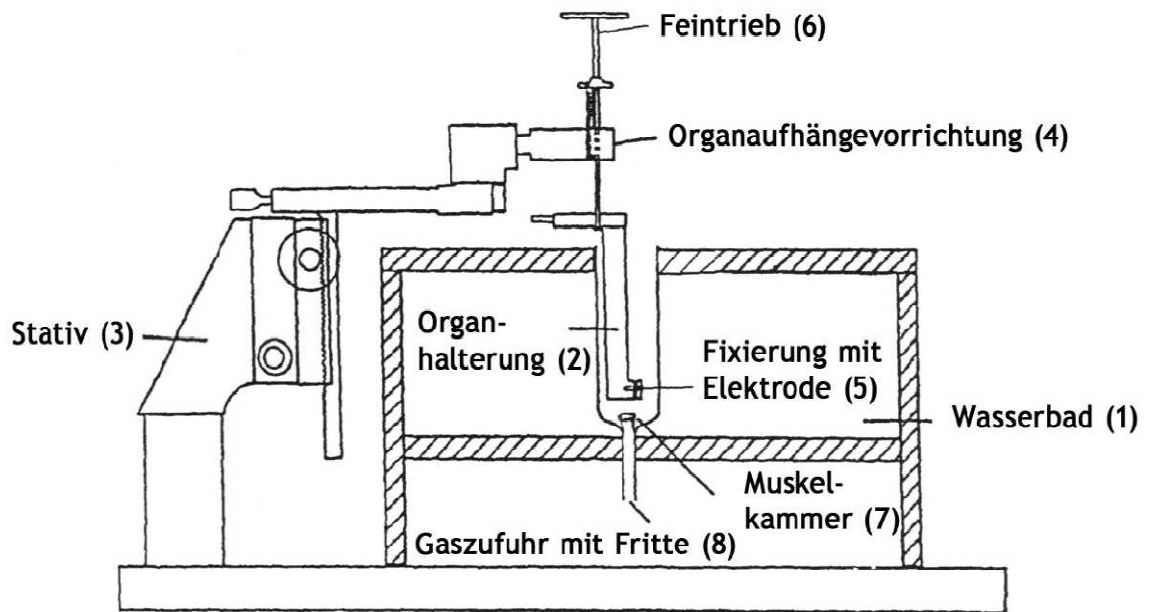




Abbildung 14: Schematische Darstellung der Apparatur A



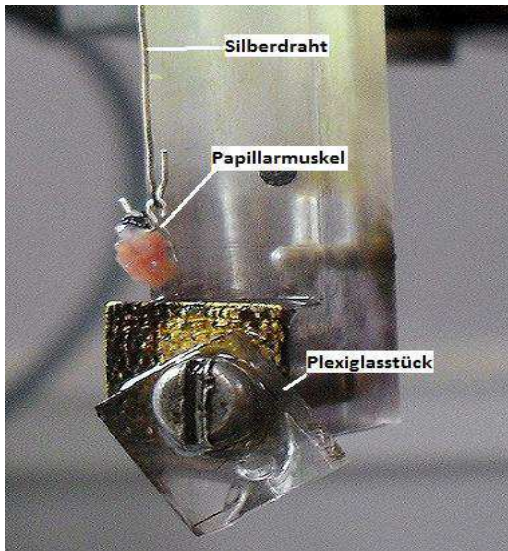
Die Abbildung 14 skizziert den genauen Aufbau der Apparatur A, welche zur Messung der Kontraktionskraft des Musculus papillaris diente.

Das Wasserbad (1) konnte mit Hilfe einer Heizspirale auf die vorgeschriebene Temperatur von  $35^{\circ}\text{C}\pm 1$  beheizt werden. Die Aufrechterhaltung dieser konstanten Temperatur war essentiell für die Simulierung physiologischer Bedingungen des menschlichen Körpers. In diesem temperierten Wasserbad befand sich eine Muskelkammer (7) mit einem Fassungsvermögen von ungefähr 27 Milliliter, in die man 25 Milliliter Tyrodelösung hineingoss. Um eine optimale Sauerstoffversorgung sicherzustellen wurde die Nährstofflösung in der Muskelkammer über eine Glasfritte mit Oxymix durchperlt. Zusätzlich ermöglichte diese Gaszufuhr eine körperähnliche pH-Wert-Einstellung von 7,2-7,4 und eine bessere Wirkstoffzirkulation während des Versuchsablaufes.

Einer der präparierten Papillarmuskeln konnte nun mit Hilfe seines angebrachten Silberhäkchens an der Aufhängevorrichtung am Silberdraht eingehängt werden. Dadurch entstand eine Verbindung mit dem Kraftwandler, der die einzelnen Kontraktionen des Muskels in elektrische Impulse umsetzte. Die Basis des Organs wurde hingegen zwischen zwei Plexiglasscheiben mittels Schraubenzieher eingequetscht, wodurch es nun mit einer dazwischenliegenden Platin-Kathode in engem Kontakt stand.

Diese dazwischengeschaltete aus Silberchlorid bestehende Elektrode diente zur Reizübertragung auf den Muskel, da diesem im Gegensatz zum rechten Vorhof die Fähigkeit zur Spontanaktivität fehlte.

Abbildung 15: Papillarmuskel in Apparatur A



### 3.5.2. Versuchsanordnung B

Abbildung 16: Originale Darstellung der Apparatur B

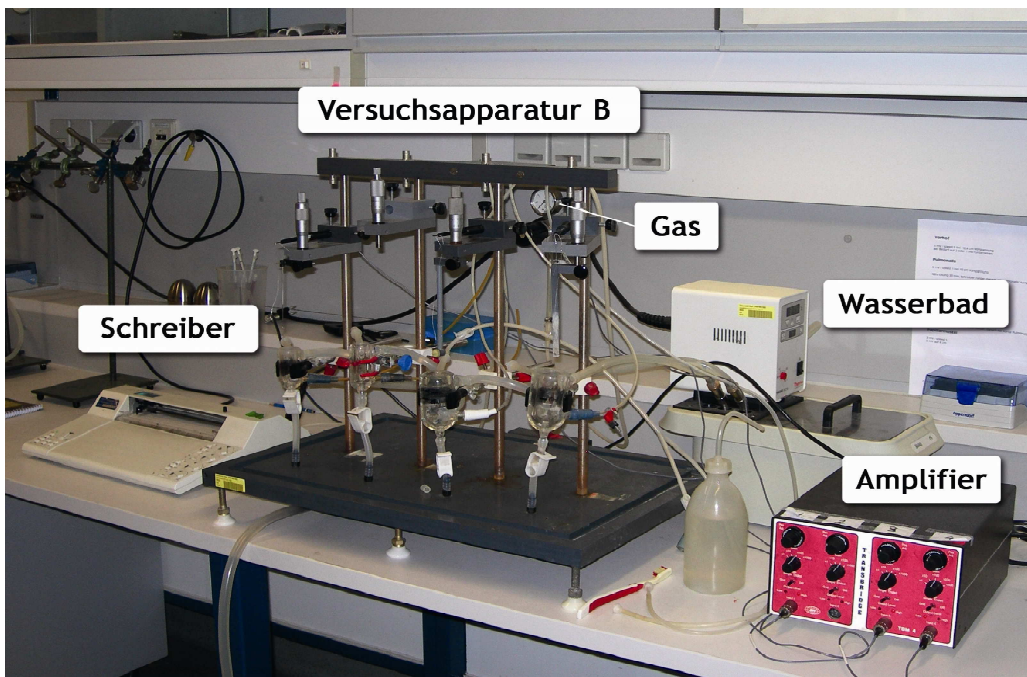
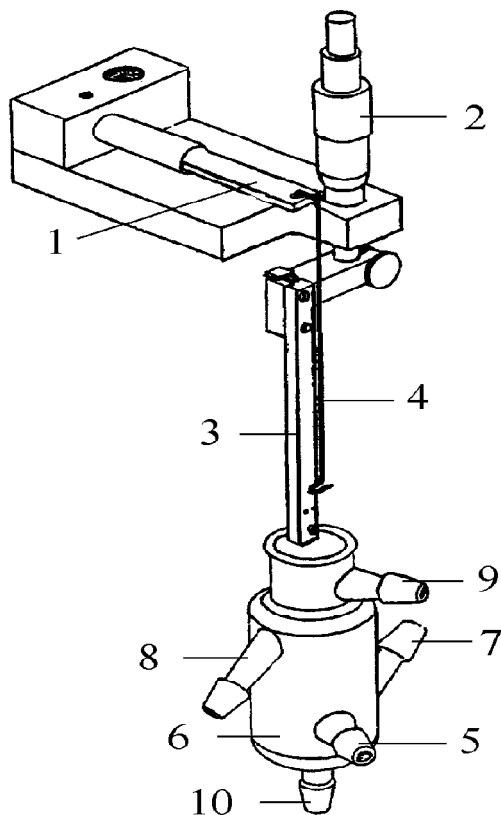


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Apparatur B



1. Kraftwandler
2. Mikrometerschraube
3. Organhalterung
4. Silberdraht
5. Begasung
6. Organbad
7. Wasserzufluss
8. Wasserabfluss
9. Nährlösungszufluss
10. Nährlösungsabfluss

Im Gegensatz zur Apparatur A fand man hier als Organbad ein doppelwandiges Glasgefäß vor, durch dessen umliegenden Hohlraum das temperierte Wasser fließen konnte. Für die restlichen Organe wie Atrium cordis dexter, Arteria pulmonalis, Aorta descendes und Ileum terminalis, die in dieser Apparatur getestet wurden, sollte die konstante Wassertemperatur  $37^{\circ}\text{C}\pm 1$  betragen, die sich mittels Thermostat leicht einstellen ließ. Grundsätzlich standen Organbäder mit einem Fassungsvermögen von 25 Milliliter oder 8 Milliliter zur Verfügung, welche mit dem entsprechenden Volumen an Nährstofflösung ergänzt werden mussten. Die Begasung fand hier durch einen seitlich gelegenen Schlauch abermals mit Oxymix statt. Die isolierten Organe wie Atrium dexter und Ileum terminalis wurden mittels ihrer Silberhaken an beiden Enden in die Aufhängevorrichtung vorsichtig eingespannt, währenddessen die Präparate der Arteria pulmonalis und der Aorta descendes aufgrund ihrer praktischen Ringstruktur direkt eingehängt werden konnten. Mittels Stativ war das Eintauchen in die begaste Nährlösung möglich. Allgemein hatte die Befestigung aller vier Organe rasch zu erfolgen um eine Mangelversorgung an der freien Luft gering zu halten.

### 3.5.3. Kraftwandler, Verstärker, Schreiber

Jedes in seiner vorgeschriebenen Apparatur eingespannte Organ stand über den Silberdraht mit dem Kraftwandler in Verbindung. Um die Kontraktionskraft der einzelnen Präparate erfassen zu können, musste der Kraftwandler diese mechanische Größe in ein elektrisches Signal umsetzen. Dieses Signal gelangte weiter zum Amplifier, der es verstärkte und schlussendlich zu einem Schreiber, der es auf Millimeterpapier aufzeichnete und jegliche Veränderungen der Kontraktionskraft somit dokumentierte.

Bei der Apparatur des Papillarmuskels gab es zusätzlich noch einen Impulsgenerator (Anapulse Stimulator), der zur Reizung des Muskels diente.

Abbildung 18: Original Darstellung des Prinzips der Signalübertragung

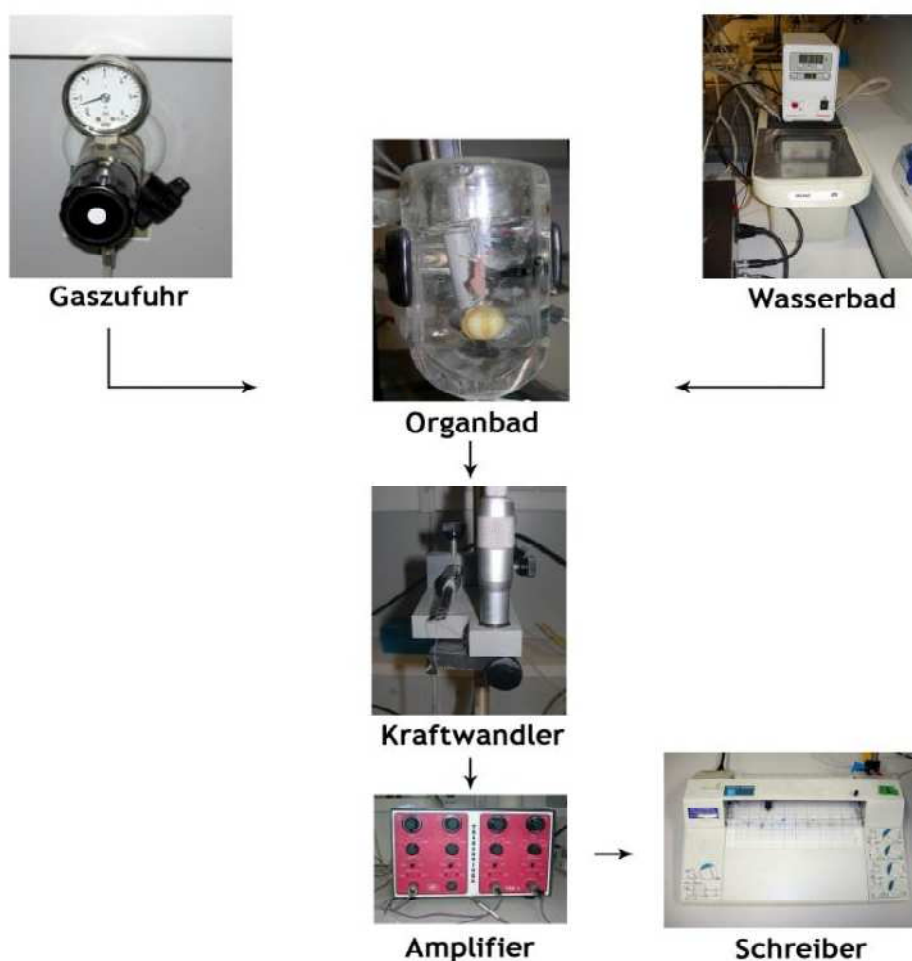
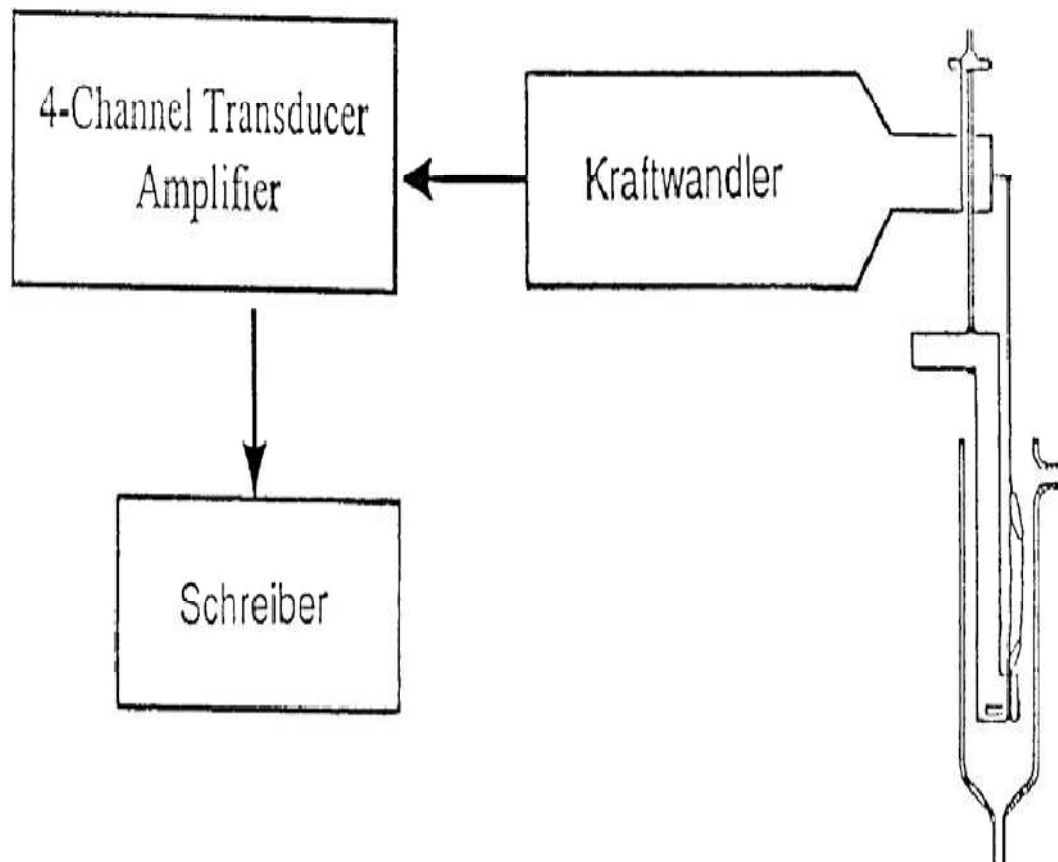


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Prinzips der Signalübertragung



### 3.6. Der Versuchsablauf

Vor jedem Versuchsablauf wurden die Organbäder bzw. die Muskelkammer zunächst mit bidestilliertem Wasser befüllt, um diese zu reinigen. Bei der Apparatur A musste das Wasser durch eine Kunststoffspritze wieder abgesaugt werden, während bei der Apparatur B ein Schlauch für den direkten Wasserabfluss vorhanden war. Dieser konnte bequem durch eine Klemme geöffnet beziehungsweise wieder abgedichtet werden. Nach diesem Reinigungsschritt durchspülte man die Bäder zusätzlich einmal mit Nährstofflösung, bevor man sie endgültig damit befüllte. Als letzten Vorbereitungsschritt setzte man die dazugehörigen Wasserbäder in Gang. Die in den Organbädern enthaltene Tyrodelösung sollte nämlich vor Eintauchen des Präparates die gewünschte Temperatur erreichen, was nach einer Wartezeit von circa 10 Minuten meist der Fall war.

### **3.6.1. Atrium dexter**

Der präparierte Vorhof wurde mittels der Silberhäkchen so in die Apparatur B eingehängt, dass die Seite, wo noch etwas Fettgewebe dran war, oben war. Danach tauchte man das eingespannte Organ in das Organbad, so tief, bis es vollkommen von begaster Elektrolytlösung bedeckt wurde. Nun schaltete man den Schreiber auf der Seite ein.

Für den Versuch am Atrium dexter war das Gerät auf 5 mV und Speed 5, welches die Schreibergeschwindigkeit darstellt, einzustellen und der Stift des Schreibers war mittels Zero-Drehrad auf die Nulllinie zu positionieren. Danach aktivierte man den Amplifier, wodurch sich der Stift meist von der Nulllinie wieder wegbewegte. Mit der zugehörigen Stellschraube des Amplifiers korrigierte man diesen Mechanismus.

Als nächstes erfolgte die Einstellung einer Vorspannung von 10,4 mN mittels Feintrieb. Das bedeutete eine erneute Wanderung des Stiftes, diesmal genau bis zur 10-Zentimetermarke. Mit Hilfe des Regelknopfes des Verstärkers war die Nulllinie wieder anzuvisieren. Dieser letzte Schritt garantierte gleiche Versuchsbedingungen und somit reproduzierbare Ergebnisse. Nun erfolgte eine Wartezeit von mindestens 45 Minuten, in der die Schlagfrequenz des Herzens in regelmäßigen Abständen kontrolliert wurde. Dafür drückte man auf die Tasten „Pen down“ und „Record on“ und ließ den Schreiber sechs Kästchen lang, was einer Zeitspanne von ca. 12 Sekunden entsprach, die Herzschläge aufzeichnen.

Diesen Vorgang wiederholte man alle fünf Minuten – mindestens 45 Minuten – solange, bis die Schläge über mindestens drei Messungen hintereinander einigermaßen konstant waren. War dies der Fall, konnte mit der ersten Einspritzung der Testsubstanz mittels Finnmikropipette begonnen werden.

Die Zugabe der Testsubstanzen war bei allen Organen identisch. Man begann stets mit 1µl und das Intervall zur nächsthöheren Wirkstoffzugabe betrug immer 45 Minuten. Beim rechten Vorhof mussten zusätzlich alle fünf Minuten Messungen der Herzfrequenz – wie oben beschrieben – erfolgen. Dieser Ablauf wurde so lange wiederholt, bis man die kumulative Endkonzentration von 100 µl im Organbad erzielt hatte.

### **3.6.2. Arteria pulmonalis**

Die elastischen Lungenarterienringe konnten direkt in die Apparatur B oben und unten am Silberdraht eingehängt werden. Dabei galt es eine Überdehnung des Organs zu vermeiden. Daraufhin tauchte man die Organhalterung in das mit Nährstofflösung gefüllte und begaste Organbad herab, bis das Präparat komplett umspült wurde.

Die Geräte wurden in der Reihenfolge, wie in Kapitel 3.6.1. beschrieben, aktiviert. Jedoch beim Schreiber war die Einstellung auf speed 1 zu ändern. Die Vorspannung musste auf 5 mV (= 9,81 mN) mittels Feintrieb angelegt werden und wurde durch die Stellschraube bekannterweise wieder auf die Nulllinie adjustiert.

Nun erfolgte eine Wartezeit von 20 Minuten, in der sich das Organ an sein neues umgebenes Milieu gewöhnen konnte. War diese Zeitspanne abgelaufen, wurde die Tyrodelösung aus dem Organbad mittels Öffnen der Klemme durch den Abflussschlauch zügig abgelassen. Unmittelbar nach der Entleerung nahm man die wie bereits in Kapitel 3.2.2.2 erwähnte Kaliumchloridlösung zur Hand und füllte damit das Organbad je nach Fassungsvermögen mit dem entsprechenden Volumen auf. Damit bezweckte man eine Kontraktion der Arterie, die vom Schreiber – ausgehend von der Nulllinie – durch eine Linkswanderung des Stiftes erkennbar wurde.

Es folgte wieder eine Wartezeit von mindestens 45 Minuten, in der sich eine konstante Plateauphase einstellen sollte. War dies der Fall – erkennbar durch eine vertikale Wanderung des Stiftes mindestens eine Zeitspanne von 2 Kästchen – konnte die kumulative Zugabe mit der Testsubstanz angefangen werden, beginnend mit 1µl. Dieser Zeitpunkt galt als Referenzwert und über den Abstand zwischen Nulllinie und der Kurve wurde später die Änderung der Kontraktion des Organs eruiert.

### **3.6.3. Musculus papillaris**

Nachdem der Papillarmuskel in den Silberdraht eingehängt und so eingeklemmt wurde, dass nur mehr  $\frac{2}{3}$  des Organs herausragten, senkte man die Organhalterung mittels Stativ in die Muskelkammer herab, bis sich der Muskel mindestens 1 cm unter der Flüssigkeitsoberfläche befand. Die Vorspannung betrug 3,92 mN. Zusätzlich setzte man ein dazwischen geschaltetes Reizgerät, den Accupilser A310 in Betrieb, dessen Aufgabe es war, mittels Rechteckimpulsen und einer Frequenz von einem Hertz, das Organ aufgrund der fehlenden Schrittmacherfunktion zu stimulieren. Die Stromstärke wurde

ausgehend von Null langsam erhöht bis der Muskel erste Zuckungen zeigte. Diesen Zeitpunkt bezeichnete man als sogenannten Schwellenwert. Man erhöhte jedoch die Stromstärke noch um weitere 10 – 15 Prozent, um kontinuierliche Kontraktionen sicherzustellen. Eine zu niedrige Einstellung der Stromstärke könnte zu einer unvollständigen Reizung des Muskels führen und infolgedessen das Ausfallen von Kontraktionen und somit Unregelmäßigkeiten begünstigen. Andersrum war es aber auch wichtig, die Stromstärke so gering wie möglich zu wählen, um einen vorzeitigen Aufbrauch des Katecholaminspeichers zu verhindern, was eine signifikante Abnahme der Amplitude zur Folge hätte.

Nun erfolgte – ähnlich wie beim Vorhof – eine Kontrollphase von 45 Minuten, in der man alle 5 Minuten den Schreiber 6 Amplituden auf Millimeterpapier aufzeichnen ließ. Zeigten die letzten 3 Blöcke von Amplituden eine konstante Inotropie auf und hatten eine Länge von mindestens 1 cm, brachte man einen letzten Block von 6 Amplituden allerdings mit Speed 20 auf Papier.

Schlussendlich konnte die 5 malige Wirkstoffzugabe nach dem üblichen Schema stattfinden.

#### ***3.6.4. Aorta descendes***

Aus einer isolierten Aorta erhielt man im Durchschnitt 7 Ringe, die sich als Versuchspräparate eigneten. Die Versuchsanordnung der Aorta descendes glich bis auf einen Unterschied in der Einstellung der Vorspannung exakt dem Ablauf der Arteria pulmonalis. Hier war zu Beginn auf 10 mV einzustellen und erst vor der Zugabe der gleichen Kaliumchloridlösung wie bei der Lungenarterie durfte auf 5 mV zurückgeschaltet werden. Nach der eingeleiteten Kontraktion war erneut das Erreichen der Plateauphase abzuwarten, um mit der Einspritzung der Testsubstanz vorschriftsmäßig starten zu können.

#### ***3.6.5. Ileum terminalis***

Der empfindliche Darm wurde mit dem jejunalem Ende nach oben gerichtet in die Organhalterung festgebunden und möglichst schnell in die begaste Elektrolytlösung eingeführt. Die Vorspannung betrug 5 cm, das entspricht 4,92 mN. Es folgte eine



Gewöhnungsphase von 20 Minuten, die durch das Einleiten der Kontraktion mittels der in Kapitel 3.2.2.1 angeführten Kaliumchloridlösung endete. Diese Lösung musste eine Konzentration von 60 mmol aufweisen und unterschied sich somit hinsichtlich der Konzentration von der Kaliumchlorid-Zubereitung, die für die Versuche an der Aorta descendes und der Arteria pulmonalis herangezogen wurde.

Nach Vorliegen einer konstanten Kontraktionskurve durfte die zu prüfende Substanz, beginnend mit 1  $\mu$ l, in das Organbad pipettiert werden.

## **3.7. Auswertung und Statistik**

### ***3.7.1. Auswertung vom rechten Vorhof***

Am rechten Vorhof untersuchte man die Wirkungen der Testsubstanzen SWS 73 und SWS 80 im Hinblick auf die Chronotropie (Schlagfrequenz des Herzens). Wie in Kapitel 3.6.1. erläutert, wurden die einzelnen Herzschläge kontinuierlich über 6 Kästchen lang aufgezeichnet. Das entsprach einer Zeitspanne von 12 Sekunden. Man addierte alle Zacken der 6 Kästchen und multiplizierte den erhaltenen Wert mit dem Faktor 5, um die Schlagfrequenz des Herzens pro Minute zu erhalten. Der in der Kontrollphase erhaltene Wert galt als Referenzwert. Durch die Substanzzugabe wurde möglicherweise eine Änderung der Schlagfrequenz ausgelöst und diese galt es zu ermitteln. Es war sowohl eine Erhöhung als auch eine Erniedrigung der Schlaghäufigkeit möglich. Handelte es sich um eine Erhöhung der Schlagfrequenz spricht man von positiver Chronotropie und umgekehrt von einer negativen Chronotropie.

### ***3.7.2. Auswertung vom Papillarmuskel***

Bei den Präparaten des Papillarmuskels wurde das Verhalten der Inotropie, das heißt, die Kontraktionskraft nach der Zugabe der beiden Testsubstanzen getestet. Für die Auswertung benötigte man ein Lineal, mit dessen Hilfe man die einzelnen Amplituden abmessen konnte. Die eruierte Länge in cm wurde bei einer Einstellung von 5 mV mit dem Faktor 0,98 und bei 2 mV mit 0,4 multipliziert.

### ***3.7.3. Auswertung von den Organen der glatten Muskulatur***

An den Organen Aorta descendes und Arteria pulmonalis untersuchte man mögliche vasodilatierende Effekte der Wirkstoffe, währenddessen beim Ileum terminalis die spasmolytische Aktivität im Vordergrund stand. Um diese Veränderungen zu erkennen, mussten die Präparate mit der entsprechenden Kaliumchloridlösung vorkontrahiert werden. Der Zeitpunkt der ersten Substanzzugabe von 1 µl galt als Referenzwert und wurde wie alle weiteren Injektionen der Testlösung in das Organbad am

Millimeterpapier markiert. Durch die Änderung des Abstandes der Kurve zur Nulllinie konnte eine auftretende vasodilatierende Wirkung erkannt und berechnet werden. Beim Versuchsablauf mit 5 mV war der Abstand in cm mit dem Eichfaktor 0,98 zu multiplizieren.

#### **3.7.4. Statistik**

Zum Schluss konnten alle erhaltenen Messergebnisse der Testsubstanzen SWS 73 und SWS 80 in ein Programm namens Sigma Plot 9.0 eingetragen werden. Dieses diente zur automatischen Berechnung der Mittelwerte, Standardabweichungen sowie der  $EC_{50}$  und somit zu einer besseren Veranschaulichung der Untersuchungsergebnisse. Beim  $EC_{50}$ -Wert handelt es sich um jene Konzentration in  $\mu\text{mol/l}$  bei der die Kontraktion um die Hälfte des Kontrollwertes gesunken ist.

Zusätzlich eruierte man noch mittels des Student-t Tests die Irrtumswahrscheinlichkeit, die kleiner 5 Prozent und kleiner 1 Prozent signifikant und unter 0,1 Prozent sogar hochsignifikant war.

## 4. ERGEBNISSE

Wie schon in den vorangegangenen Kapiteln erwähnt, wurden für die Versuchsreihen als Organe der rechte Vorhof, der Papillarmuskel, die Lungenarterie, die Aorta und der Darm herangezogen, wobei im Durchschnitt pro Organ und pro Testsubstanz 5 Versuche gemacht wurden.

In diesem Kapitel werden nun die einzelnen Ergebnisse der Testsubstanzen SWS 73 HCl und SWS 80 HCl an den jeweiligen Organen vorgeführt und näher erläutert.

### 4.1. Ergebnisse der Testsubstanz SWS 73 HCl

#### 4.1.1. Atrium cordis dexter

Bei den Versuchen am rechtem Vorhof erhoffte man sich eine zunehmende negative chronotrope Wirkung durch die kumulative Testsubstanzzugabe von SWS 73 HCl. Dieser Effekt blieb jedoch aus und somit wurde kein EC<sub>50</sub>-Wert erreicht.

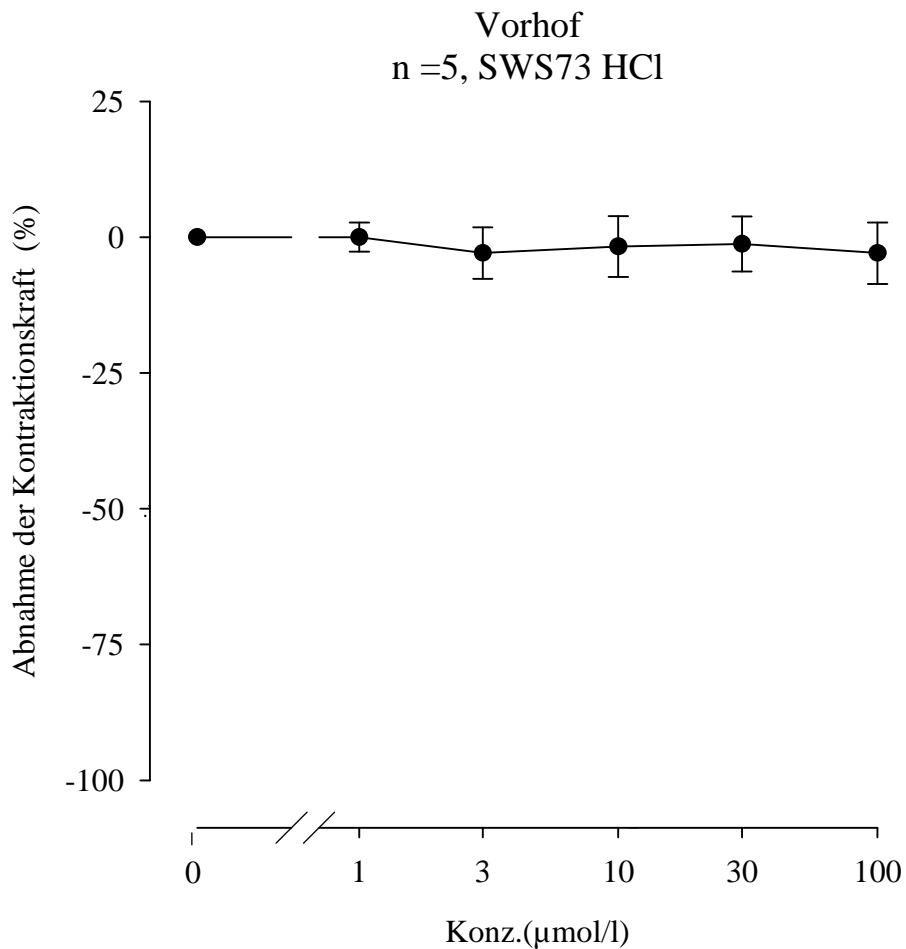
Tabelle 4: Ergebnisse von SWS 73 HCl am rechten Vorhof

SWS 73 HCl ( $\mu\text{mol/l}$ )	f $\pm$ SEM (x/min)	f $\pm$ SEM (%)	Versuchsanzahl (n)	Irrtums= Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	240 $\pm$ 3,54	0 $\pm$ 0	5	-
1	240 $\pm$ 6,89	0 $\pm$ 2,67	5	n.s
3	233 $\pm$ 12,10	-2,93 $\pm$ 4,74	5	n.s
10	236 $\pm$ 14,44	-1,74 $\pm$ 5,60	5	n.s
30	237 $\pm$ 12,71	-1,26 $\pm$ 5,06	5	n.s
100	233 $\pm$ 14,11	-2,94 $\pm$ 5,66	5	n.s

f..... Schlagfrequenz

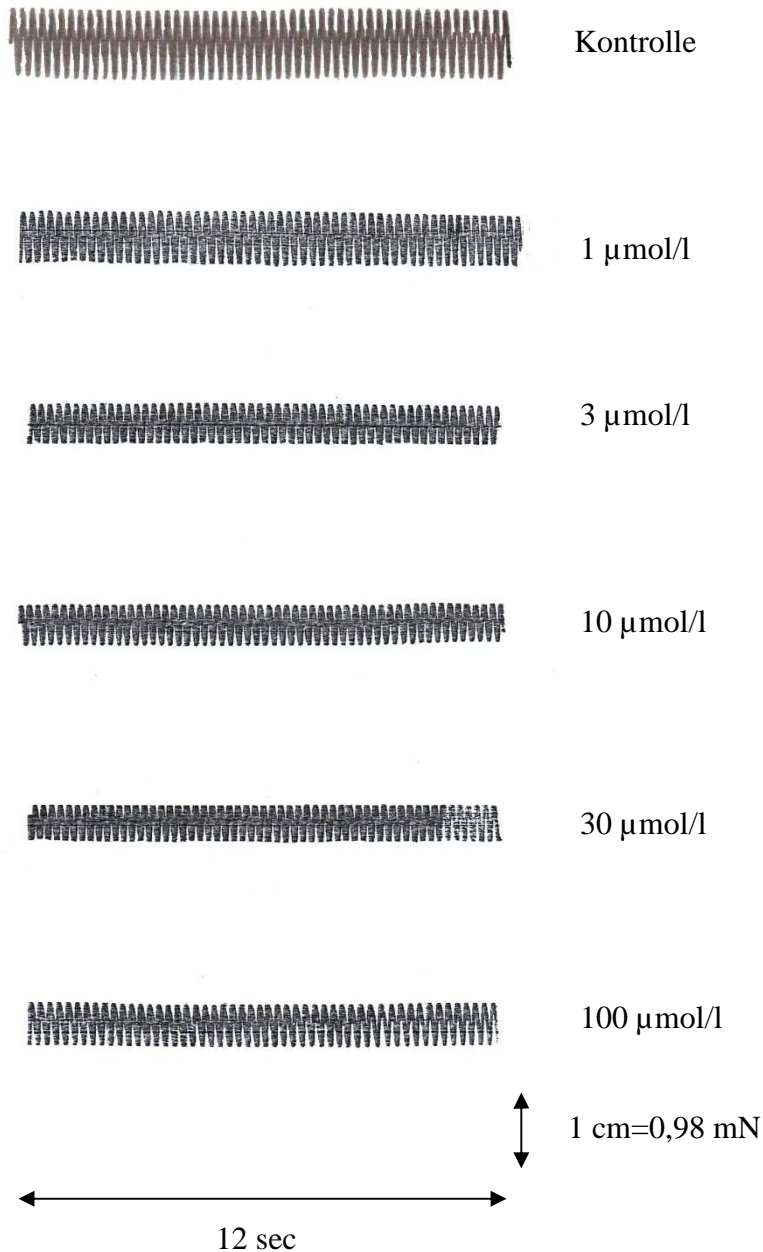
SEM.... Standardabweichung

Diagramm 1: Dosis-Wirkungskurve von SWS 73 HCl am rechten Vorhof



Das Diagramm 1 gibt die Wirkung auf die Chronotropie der Testsubstanz SWS 73 HCl graphisch wieder. Um diese Wirkungskurve zu erhalten, wurden auf der x-Achse die einzelnen Konzentrationen in µmol/l eingetragen und auf der y-Achse die Änderung der Schlagfrequenz in Prozent. Die Mittelwerte der entsprechenden Konzentrationen werden durch die Punkte dargestellt und die darauf abstehenden Balken symbolisieren die Größe der dazugehörigen Standardabweichung.

Abbildung 20: Originalaufzeichnung der chronotropen Wirkung der Testsubstanz SWS 73 HCl auf den rechten Vorhof.



Legende zu Abbildung 20:

Die Abbildung zeigt die Anzahl der Herzschläge in 12 Sekunden bei den jeweiligen Konzentrationen. Durch Multiplikation mit dem Faktor 5 erhielt man die Schlagfrequenz/Minute.

### 4.1.2. Arteria pulmonalis

An der Arteria pulmonalis, ein Organ der glatten Muskulatur, erwartete man sich eine vasodilatierende Wirkung. Es wurden wieder 5 Versuche durchgeführt und zum jeweiligen Referenzwert das Verhältnis berechnet. Der gewünschte Effekt trat nicht ein und eine EC<sub>50</sub> konnte bei weitem nicht erreicht werden.

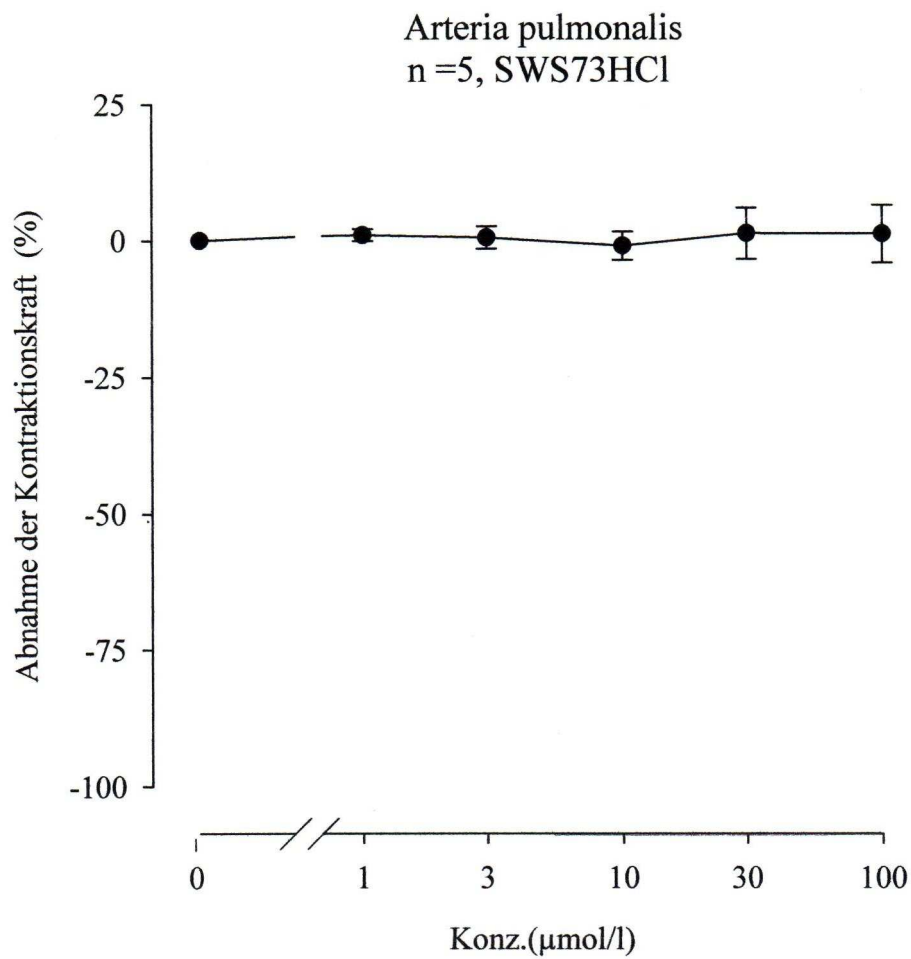
Tabelle 5: Ergebnisse von SWS 73 HCl an der Arteria pulmonalis

SWS 73 HCl ( $\mu\text{mol/l}$ )	fc $\pm$ SEM (m/N)	fc $\pm$ SEM (%)	Versuchsanzahl (n)	Irrtums= Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	10,41 $\pm$ 2,91	0 $\pm$ 0	5	-
1	10,48 $\pm$ 2,85	1,00 $\pm$ 1,09	5	n.s
3	10,32 $\pm$ 2,68	0,55 $\pm$ 2,03	5	n.s
10	10,19 $\pm$ 2,64	-0,96 $\pm$ 2,57	5	n.s
30	10,27 $\pm$ 2,52	1,31 $\pm$ 4,68	5	n.s
100	10,21 $\pm$ 2,46	1,24 $\pm$ 5,25	5	n.s

fc..... Kontraktionskraft

SEM.... Standardabweichung

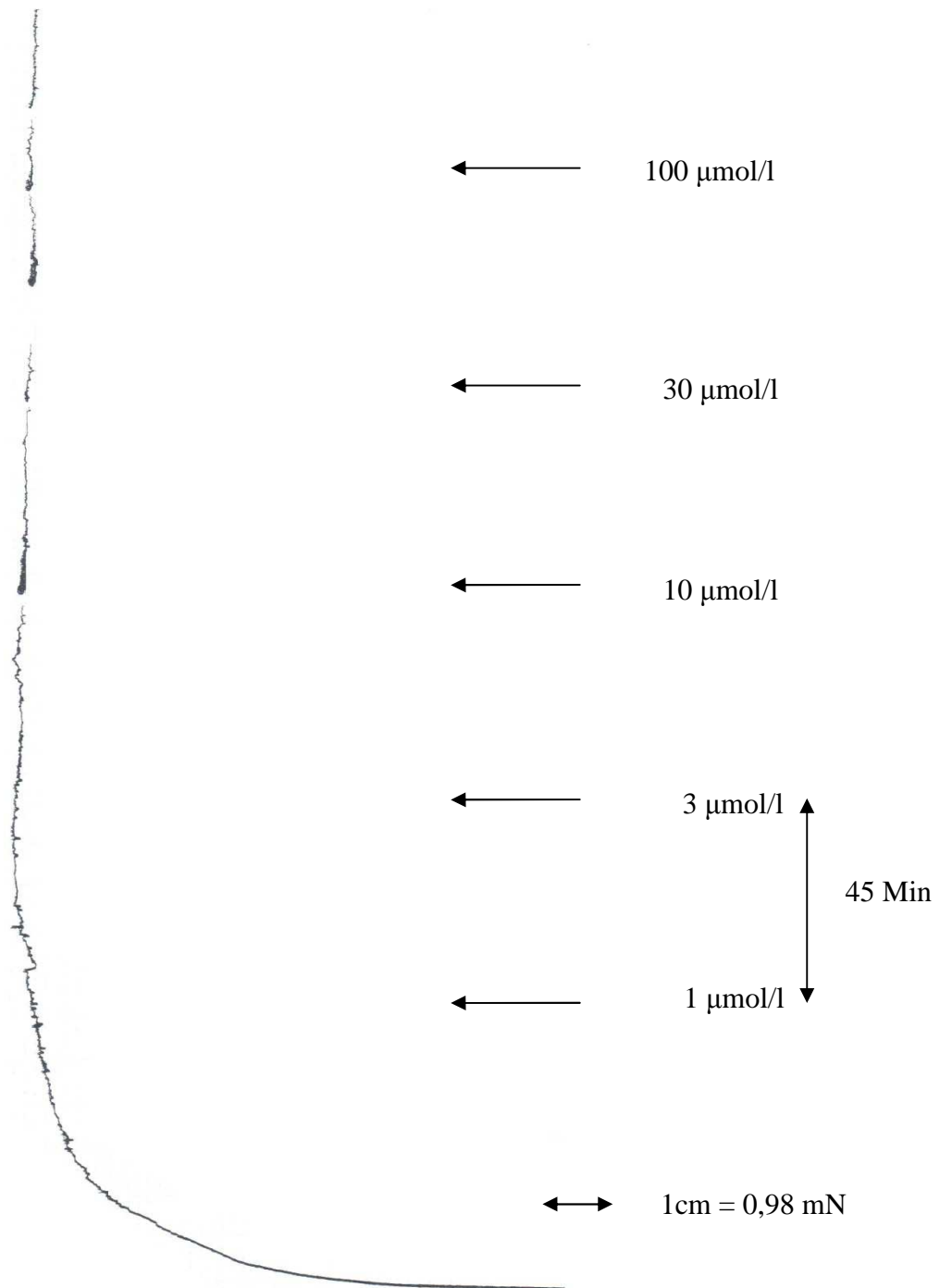
Diagramm 2: Dosis-Wirkungskurve von SWS 73 HCl an der Arteria pulmonalis



Das Diagramm 2 widerspiegelt die Wirkung der Testsubstanz SWS 73 HCl auf die Arteria pulmonalis. Die x-Achse stellt die Konzentration in  $\mu\text{mol/l}$  dar, während die y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent wiedergibt.



Abbildung 21: Originalaufzeichnung der Wirkung der Testsubstanz SWS 73 HCl auf die Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 21:

Durch die Pfeile in Abbildung 21 sind die Zeitpunkte der Injektion der Testsubstanz erkennbar, die stets in einem Intervall von 45 Minuten erfolgte.

### 4.1.3. *Musculus papillaris*

In den Versuchsreihen des Papillarmuskels wurden mögliche Veränderungen der Inotropie durch die stetige Substanzzugabe von SWS 73 HCl untersucht.

Es erfolgten 4 Versuche und als Kontrollwert wurde  $2,03 \pm 0,28$  mN ermittelt.

De facto konnte eine schwache negative inotrope Wirkung gefunden werden, allerdings weit entfernt von einer relevanten  $EC_{50}$ .

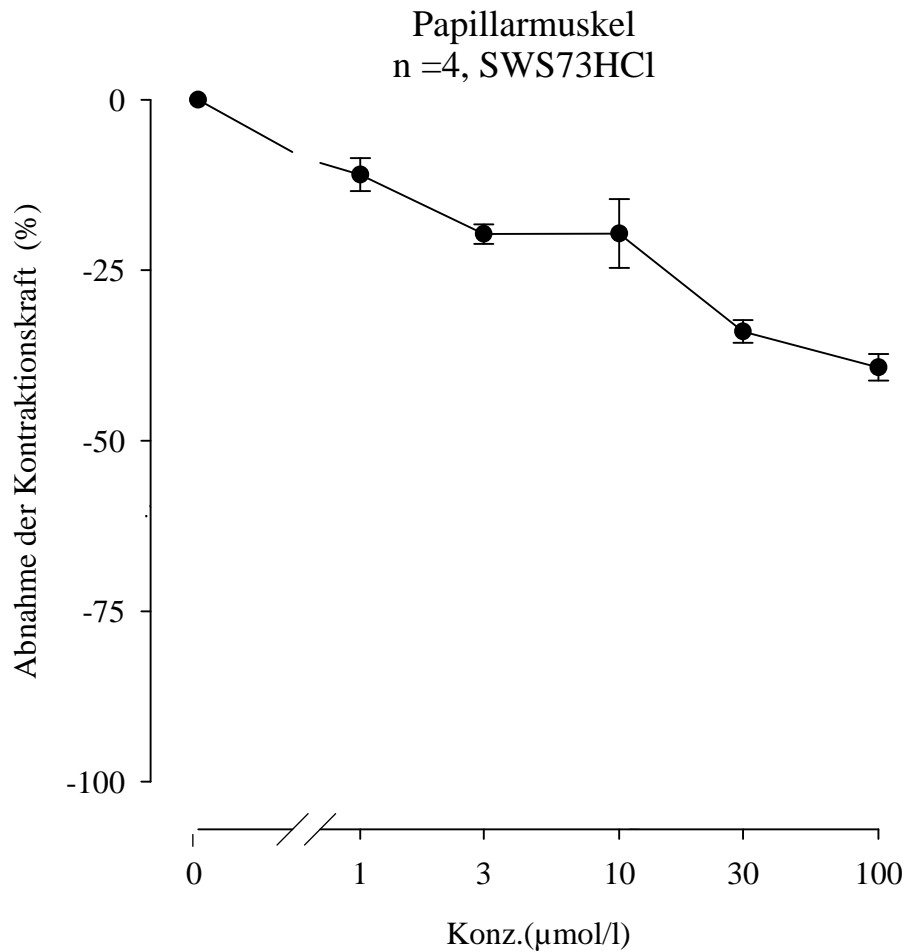
Tabelle 6: Ergebnisse von SWS 73 HCl auf den Papillarmuskel

SWS 73 HCl ( $\mu\text{mol/l}$ )	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Versuchsanzahl (n)	Irrtums= Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$2,03 \pm 0,28$	$0 \pm 0$	4	-
1	$1,81 \pm 0,26$	$-10,97 \pm 2,41$	4	n.s
3	$1,64 \pm 0,25$	$-19,69 \pm 1,45$	4	n.s
10	$1,49 \pm 0,24$	$-19,6 \pm 5,06$	4	n.s
30	$1,35 \pm 0,20$	$-33,96 \pm 1,67$	4	n.s
100	$1,23 \pm 0,15$	$-39,25 \pm 1,96$	4	n.s

fc..... Kontraktionskraft

SEM.... Standardabweichung

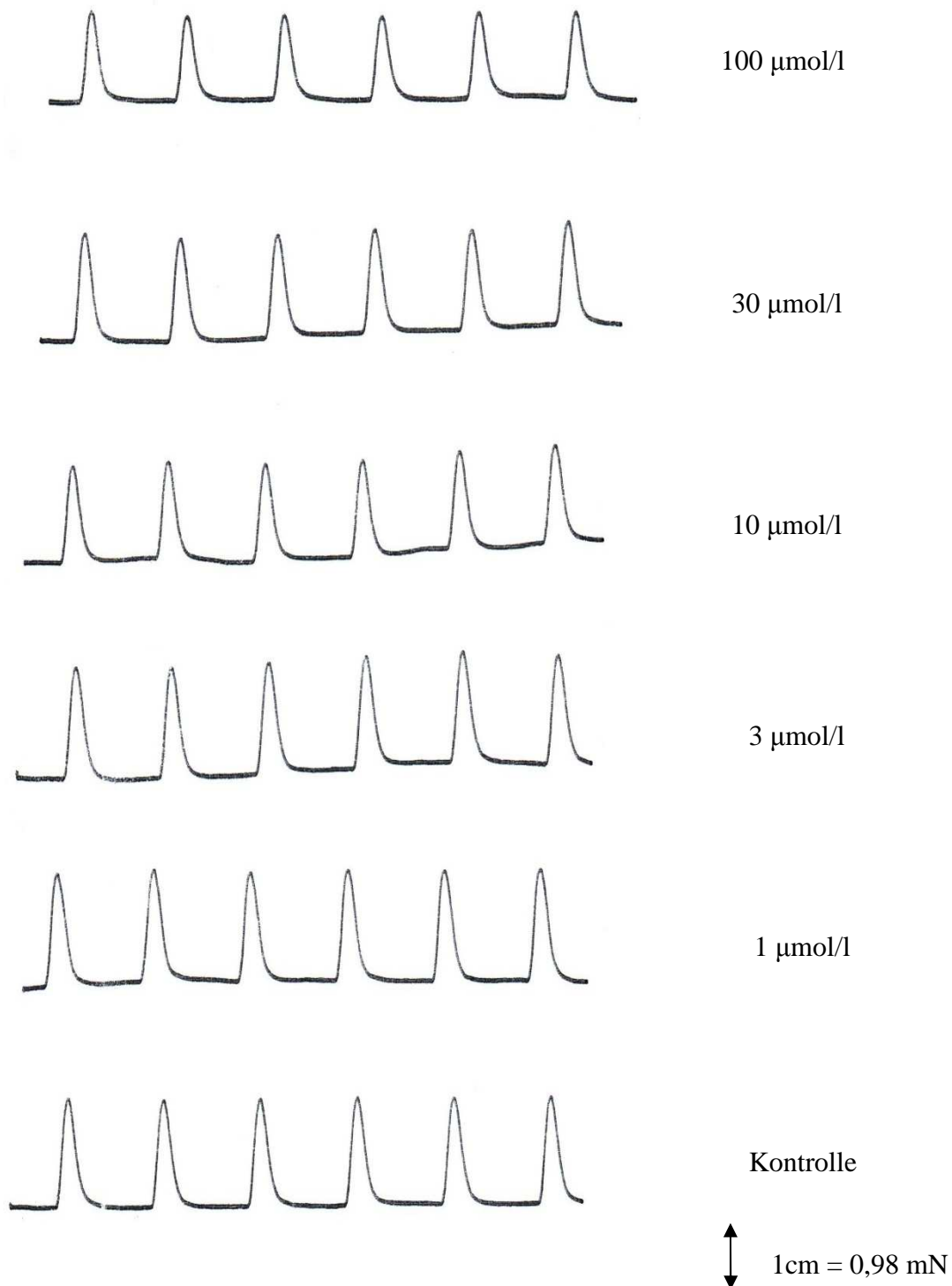
Diagramm 3: Dosis-Wirkungskurve von SWS 73 HCl auf den Papillarmuskel



Das Diagramm 3 veranschaulicht graphisch die inotrope Wirkung der Substanz SWS 73 HCl als Dosis-Wirkungskurve. Auf der x-Achse ist die Konzentration in  $\mu\text{mol/l}$  aufgetragen und die y-Achse symbolisiert die dazugehörige Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent.

Von Beginn an erkennt man eine leichte negative inotrope Tendenz, die jedoch bei der Konzentration von  $3 \mu\text{mol}$  kurz zu erliegen kommt und erst ab einer Konzentration von  $10 \mu\text{mol}$  erneut, diesmal etwas stärker ausgeprägt, zu einer weiteren Abnahme der Kontraktionskraft führt.

Abbildung 22: Originalaufzeichnung der inotropen Wirkung der Testsubstanz SWS 73 HCl auf den Papillarmuskel



Legende zu Abbildung 22:

Die Abbildung 22 veranschaulicht die Amplituden des Papillarmuskels, die mittels Lineal vermessen wurden, um anschließend eine mögliche Veränderung der Inotropie durch den Einfluss der Testsubstanz berechnen zu können.

#### 4.1.4. Aorta descendes

Die Aorta descendes, ein weiteres Organ der glatten Muskulatur, wurde ebenfalls für die Versuche herangezogen, um eine mögliche dilatierende Wirkung durch SWS 73 HCl zu untersuchen. Es wurden 5 Versuche durchgeführt, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

Für dessen Auswertung wurden die arithmetischen Mittelwerte bestimmt und ein Kontrollwert von  $8,35 \pm 1,83$  mN ermittelt.

Die Substanz zeigte eine geringe Dilatation auf die Gefäße der Aorta, allerdings in zu schwacher Ausprägung. Infolgedessen konnte erneut keine  $EC_{50}$  erreicht werden.

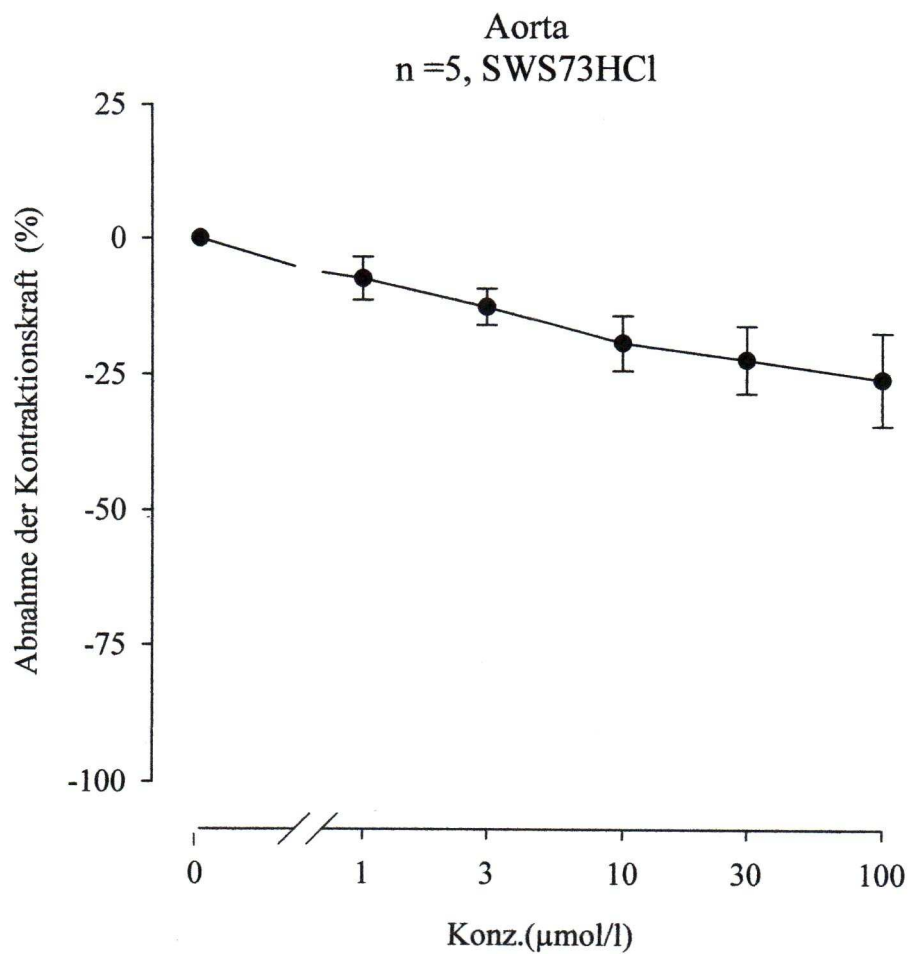
Tabelle 7: Ergebnisse von SWS 73 HCl an der Aorta descendes

SWS 73 HCl ( $\mu\text{mol/l}$ )	fc $\pm$ SEM (m/N)	fc $\pm$ SEM (%)	Versuchsanzahl (n)	Irrtums= Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$8,35 \pm 1,83$	$0 \pm 0$	5	-
1	$7,94 \pm 2,01$	$-7,38 \pm 3,92$	5	n.s
3	$7,54 \pm 2,03$	$-12,62 \pm 3,39$	5	n.s
10	$7,08 \pm 2,09$	$-19,34 \pm 5,09$	5	n.s
30	$6,88 \pm 2,15$	$-22,44 \pm 6,18$	5	n.s
100	$6,62 \pm 2,19$	$-26,11 \pm 8,55$	5	n.s

fc..... Kontraktionskraft

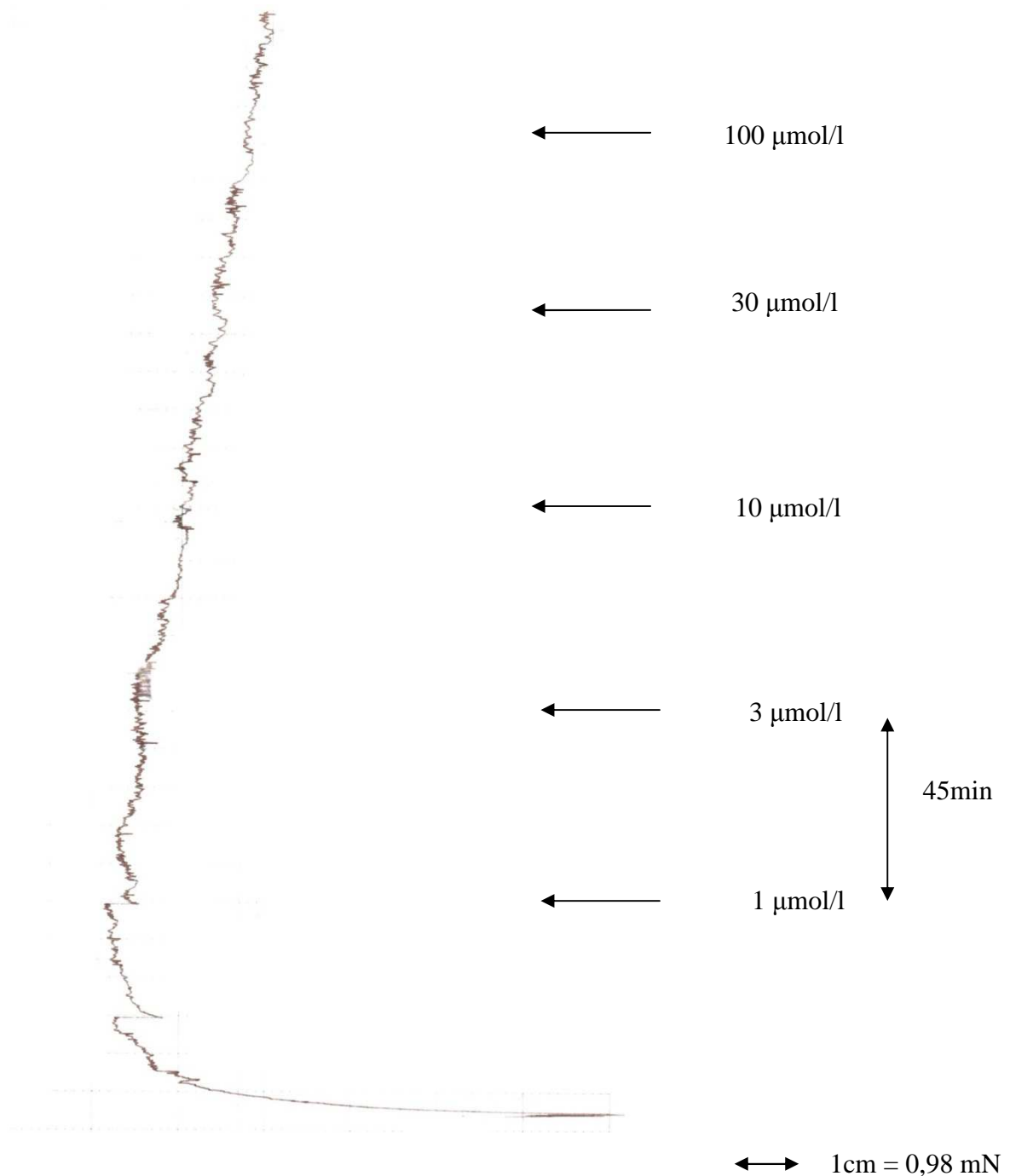
SEM.... Standardabweichung

Diagramm 4: Dosis-Wirkungskurve von SWS 73 HCl an der Aorta descendes



Das Diagramm 4 präsentiert den Einfluss der Testsubstanz SWS 73 HCl auf die Aorta descendes in Form einer Graphik. Die Abnahme der Kontraktionskraft (%) durch die Zunahme der Konzentration (µmol/l) ist augenfällig und widerspiegelt die schwach ausgeprägte vasodilatierende Eigenschaft der Substanz.

Abbildung 23: Originalaufzeichnung der Wirkung der Testsubstanz SWS 73 HCl auf die Aorta descendes.



Legende zu Abbildung 23:

Die Pfeile in Abbildung 23 kennzeichnen die Zeitpunkte der Einspritzungen der Substanz SWS 73. Das zeitliche Intervall betrug 45 Minuten.

### 4.1.5. Ileum terminalis

Hier wurde das Augenmerk auf eine potentielle spasmolytische Aktivität der Substanz gelegt. Innerhalb der 4 durchgeführten Untersuchungen konnte keine signifikante Wirkung festgestellt werden. Die Ermittlung des EC<sub>50</sub>- Wertes fiel daher aus.

Tabelle 8: Ergebnisse von SWS 73 HCl am terminalen Ileum

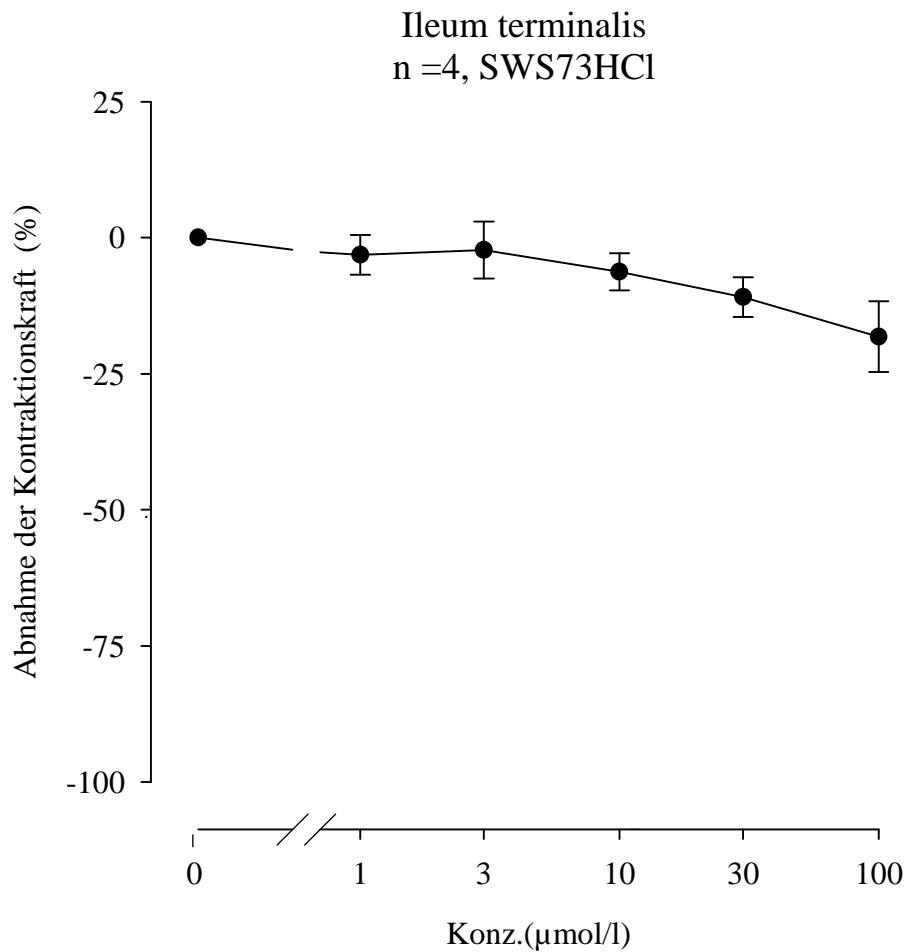
SWS 73 HCl ( $\mu\text{mol/l}$ )	fc $\pm$ SEM (m/N)	fc $\pm$ SEM (%)	Versuchsanzahl (n)	Irrtums= Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	6,25 $\pm$ 0,96	0 $\pm$ 0	4	-
1	6,10 $\pm$ 1,04	-3,18 $\pm$ 3,64	4	n.s
3	6,17 $\pm$ 1,09	-2,28 $\pm$ 5,25	4	n.s
10	5,93 $\pm$ 1,06	-6,29 $\pm$ 3,39	4	n.s
30	5,66 $\pm$ 1,12	-10,91 $\pm$ 3,66	4	n.s
100	5,22 $\pm$ 1,18	-18,19 $\pm$ 6,51	4	n.s

fc..... Kontraktionskraft

SEM.... Standardabweichung



Diagramm 5: Dosis-Wirkungskurve von SWS 73 HCl am terminalen Ileum

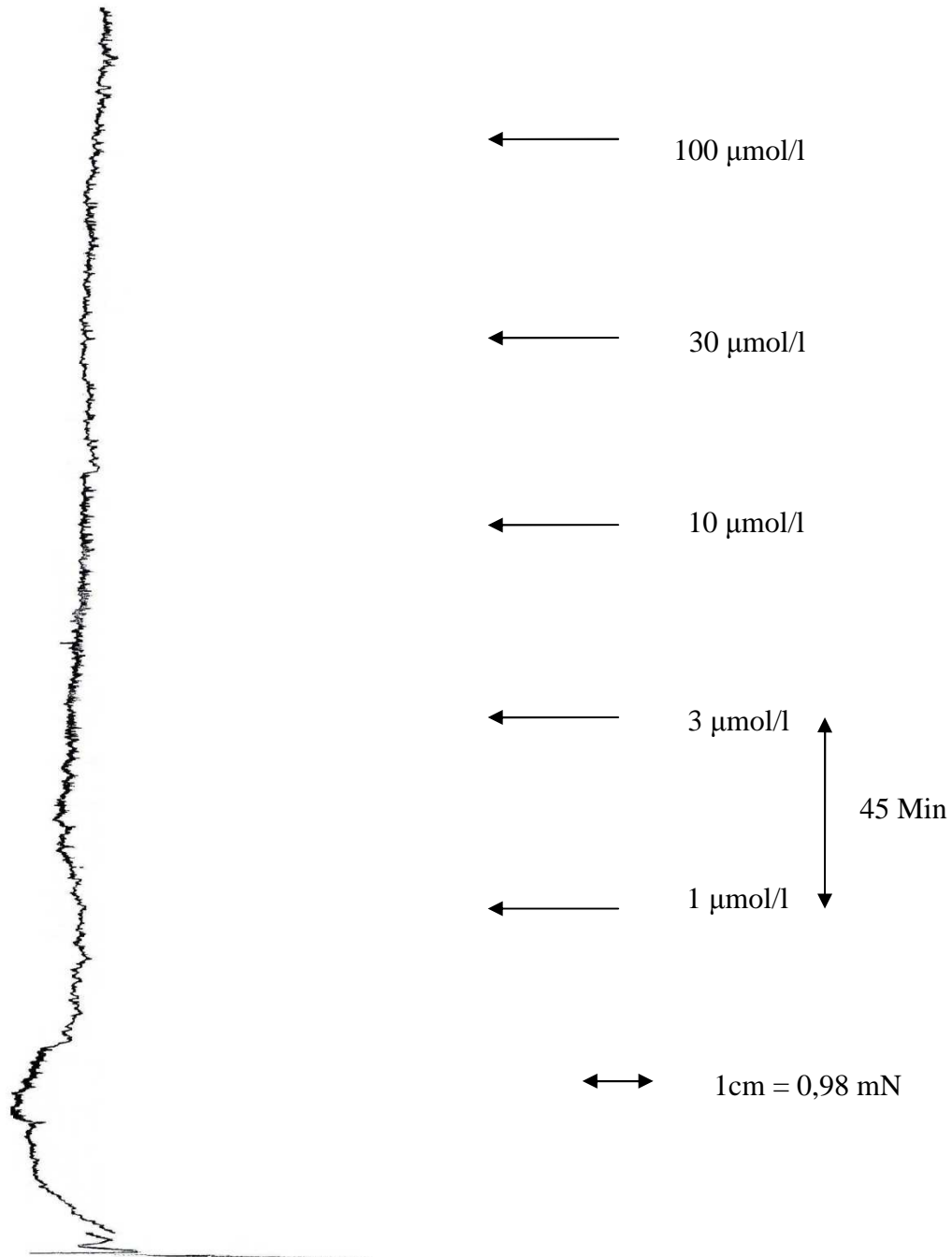


In Diagramm 5 lässt sich die spasmolytische Wirkung anhand der beiden Achsen ablesen.

Während die x-Achse die zunehmende Konzentration angibt, stellt die y-Achse die dazugehörige Abnahme der Kontraktionskraft des Darms dar.

Eine geringfügige zunehmende Spasmolyse ist zu beobachten, allerdings in einer zu schwach ausgeprägten Form, sodass dieser keine Bedeutung zugeordnet werden kann.

Abbildung 24: Originalaufzeichnung der Wirkung der Testsubstanz SWS 73 HCl auf den terminalen Ileum.



Legende zu Abbildung 24:

Die Pfeile kennzeichnen wiederum die Zeitpunkte der Substanzzugabe. Die Abstände zwischen den einzelnen Injektionen betragen jeweils 45 Minuten.

## 4.2. Ergebnisse der Testsubstanz SWS 80 HCl

### 4.2.1. Atrium dexter

Die Wirkung der Testsubstanz SWS 80 HCl wurde innerhalb von 5 Versuchen getestet. Man erhielt im Durchschnitt einen Kontrollwert von  $247 \pm 8$  Schlägen pro Minute. Die kumulative Substanzzugabe von SWS 80 HCl zeigte ähnlich wie die zuvor untersuchte Testsubstanz SWS 73 HCl kaum einen Einfluss auf die Chronotropie.

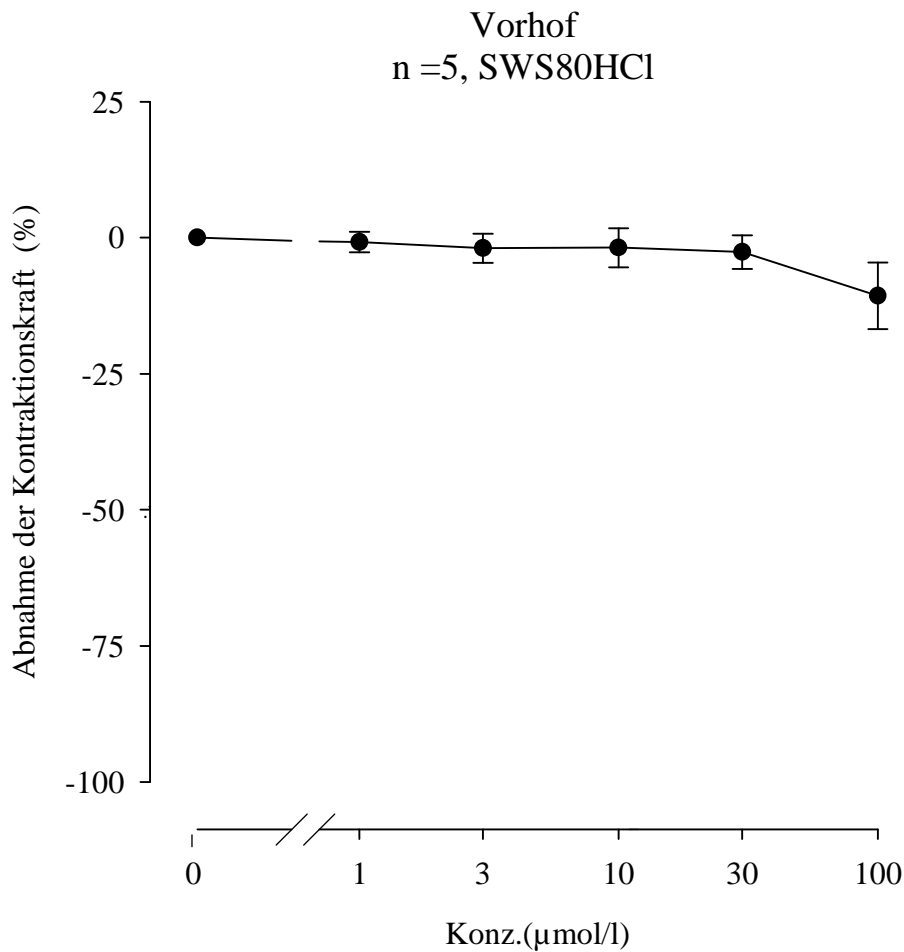
Tabelle 9: Ergebnisse von SWS 80 HCl am rechten Vorhof

SWS 80 HCl ( $\mu\text{mol/l}$ )	f $\pm$ SEM (x/min)	f $\pm$ SEM (%)	Versuchsanzahl (n)	Irrtums= Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$247 \pm 8$	$0 \pm 0$	5	-
1	$245 \pm 8,80$	$-0,81 \pm 1,86$	5	n.s
3	$242 \pm 8,75$	$-1,94 \pm 2,70$	5	n.s
10	$242 \pm 9,30$	$-1,84 \pm 3,59$	5	n.s
30	$240 \pm 8,22$	$-2,66 \pm 3,08$	5	n.s
100	$221 \pm 17,42$	$-10,69 \pm 6,14$	5	n.s

f..... Schlagfrequenz

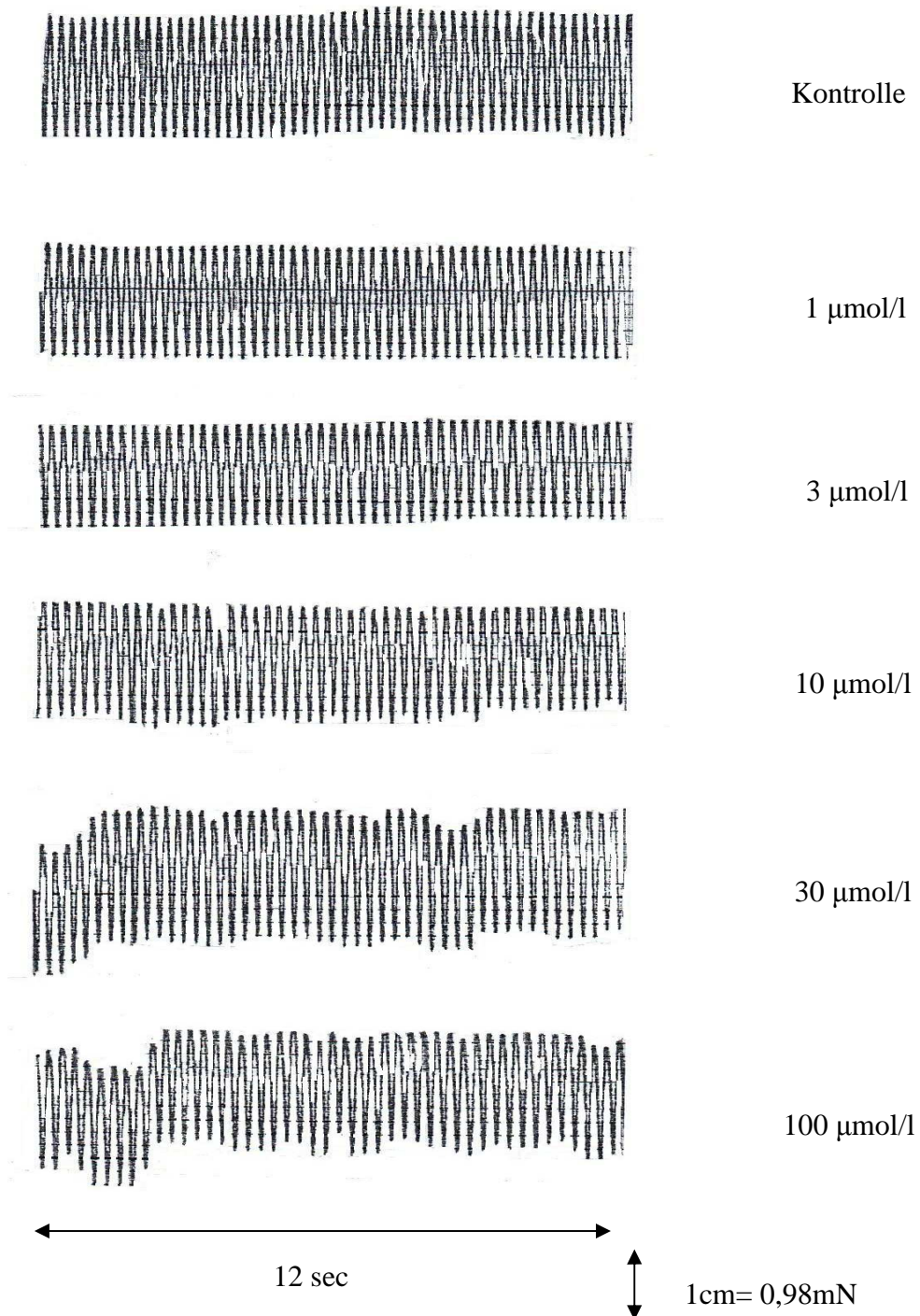
SEM.... Standardabweichung

Diagramm 6: Dosis-Wirkungskurve von SWS 80 HCl am rechten Vorhof



Das Diagramm 6 verdeutlicht die fehlende chronotrope Wirkung der Testsubstanz SWS 80 am rechten Vorhof. Lediglich ab einer Konzentration von 30µmol/l ist eine leichte Abnahme der Schlagfrequenz zu beobachten, die jedoch im Vergleich zu den anderen Mittelwerten durch eine größere Standardabweichung gekennzeichnet ist. Daraus könnte man auf einen möglichen Verlust der Qualität des Organs über die Dauer der Untersuchungen schließen.

Abbildung 25: Originalaufzeichnung der chronotropen Wirkung der Testsubstanz SWS 80 HCl auf den rechten Vorhof.



Legende zu Abbildung 25:

Alle 5 Minuten wurden die Herzschläge 12 Sekunden lang aufgezeichnet, wodurch schlussendlich ein möglicher Einfluss der Testsubstanz auf die Chronotropie berechnet werden konnte.

### 4.2.2. Arteria pulmonalis

Um den Effekt der Substanz SWS 80 HCl auf die Arteria pulmonalis zu ermitteln, machte man 4 Versuche. Dabei erhielt man einen Kontrollwert von  $11,44 \pm 1,21$ .

In allen 4 Versuchsreihen konnten allerdings keine Änderungen in Bezug auf die Dilatation der Lungenarterienringe durch die kumulative Substanzzugabe sichtbar gemacht werden.

Aufgrund dessen wurde ein  $EC_{50}$ -Wert nicht einmal annähernd erreicht.

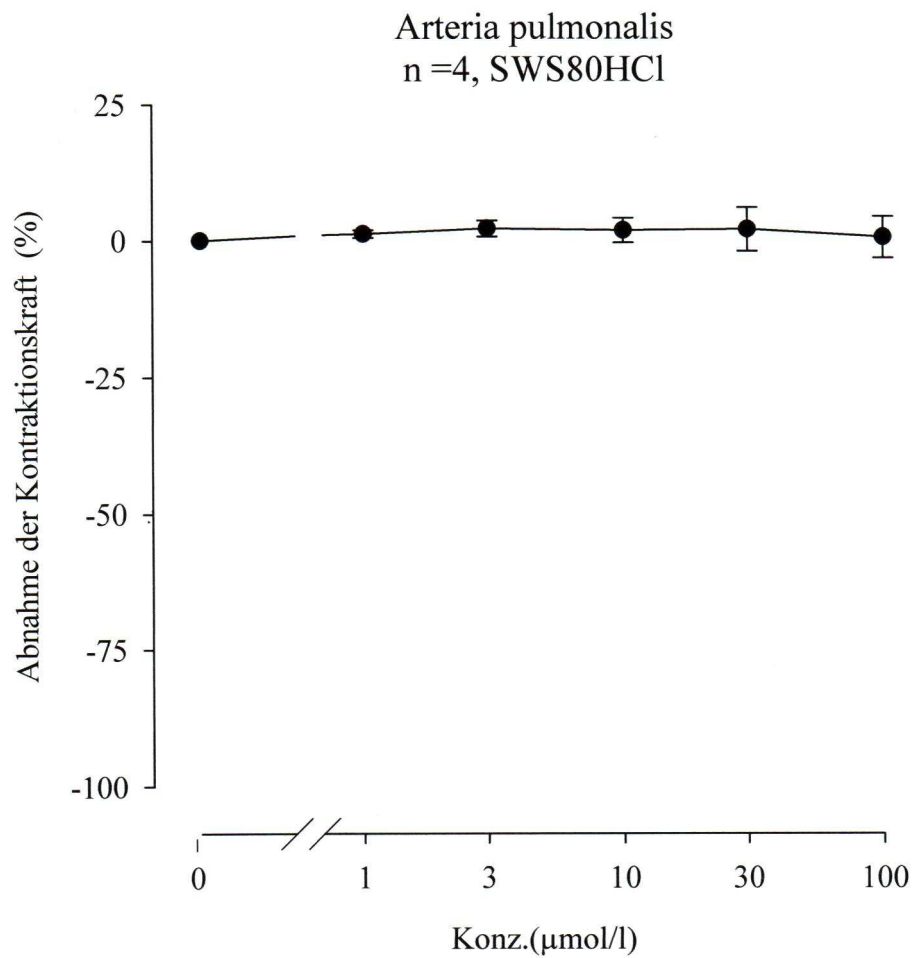
Tabelle 10: Ergebnisse von SWS 80 HCl an der Arteria pulmonalis

SWS 80 HCl ( $\mu\text{mol/l}$ )	fc $\pm$ SEM (m/N)	fc $\pm$ SEM (%)	Versuchszahl (n)	Irrtums= Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$11,44 \pm 1,21$	$0 \pm 0$	4	-
1	$11,59 \pm 1,28$	$1,16 \pm 0,69$	4	n.s
3	$11,69 \pm 1,25$	$2,12 \pm 1,46$	4	n.s
10	$11,64 \pm 1,31$	$1,80 \pm 2,26$	4	n.s
30	$11,69 \pm 1,34$	$1,99 \pm 3,98$	4	n.s
100	$11,54 \pm 1,38$	$0,54 \pm 3,78$	4	n.s

fc..... Kontraktionskraft

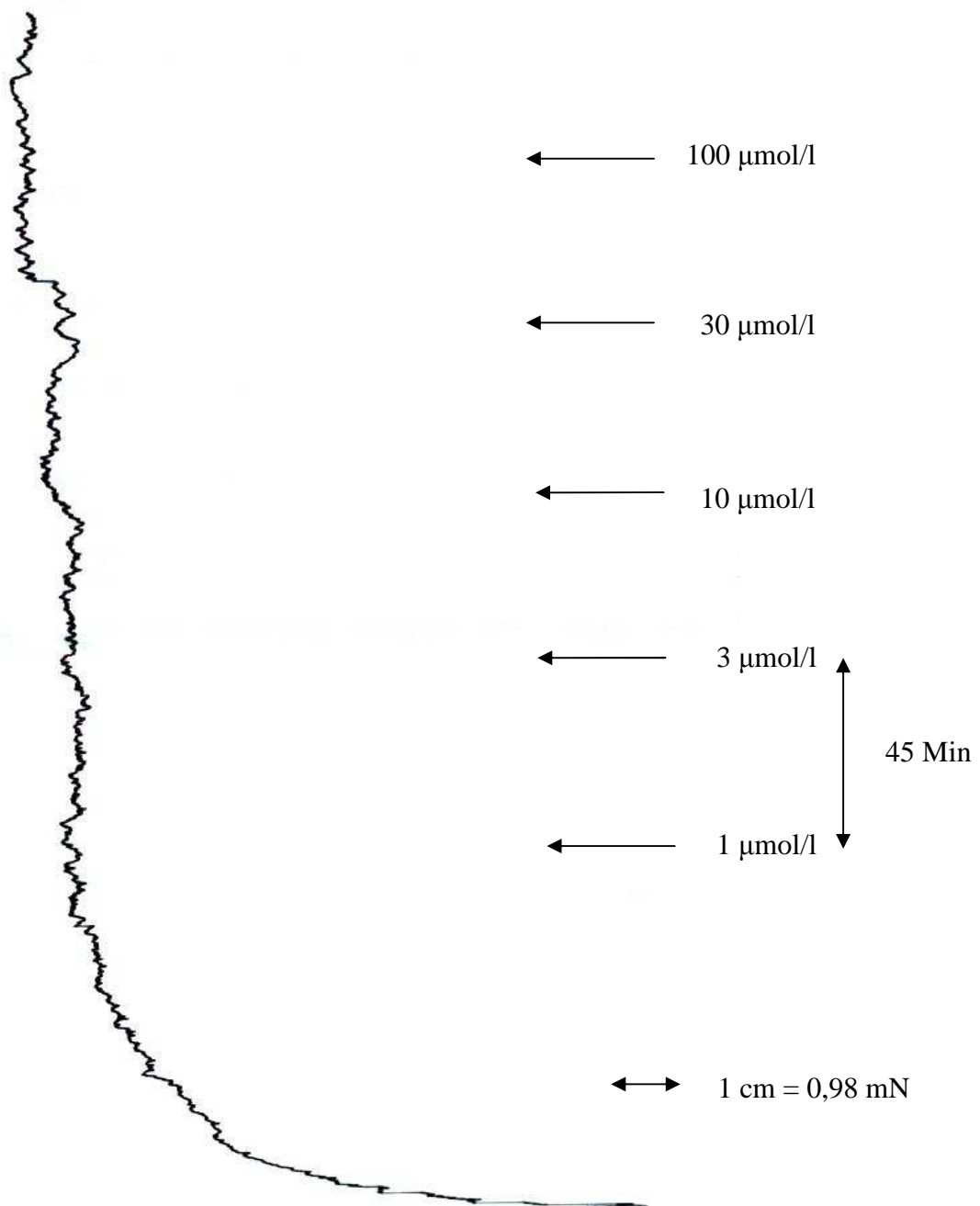
SEM.... Standardabweichung

Diagramm 7: Dosis-Wirkungskurve von SWS 80 HCl an der Arteria pulmonalis



Das Diagramm 7 zeigt deutlich den fehlenden Einfluss der Substanz SWS 80 HCl auf die Arteria pulmonalis. Auch nach Injektion der Höchstkonzentration von 70 µmol/l, um die Endkonzentration von 100 µmol/l zu erreichen, trat die gewünschte Dilatation der Lungenarterie nicht ein.

Abbildung 26: Originalaufzeichnung der Wirkung der Testsubstanz SWS 80 HCl auf die Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 26:

Die Abbildung 26 symbolisiert die zeitlichen Abstände der Testsubstanzapplikation, welche durch die Pfeile markiert sind.



### 4.2.3. *Musculus papillaris*

An den Präparaten des Papillarmuskels wurde der Einfluss der Substanz SWS 80 HCl auf die Inotropie überprüft. Nach 4 erfolgreich durchgeführten Versuchen, erhielt man einen Kontrollwert von  $1,98 \pm 0,24$ .

Zunächst zeigte die Substanz kaum eine Wirkung, allerdings ab einer Wirkstoffkonzentration von  $3 \mu\text{mol/l}$  fiel die Kontraktionskraft abrupt ab. Dieser Wert pendelte sich wenig oberhalb des EC50-Wertes ein, der, wenn auch nur ganz knapp, nicht erreicht wurde.

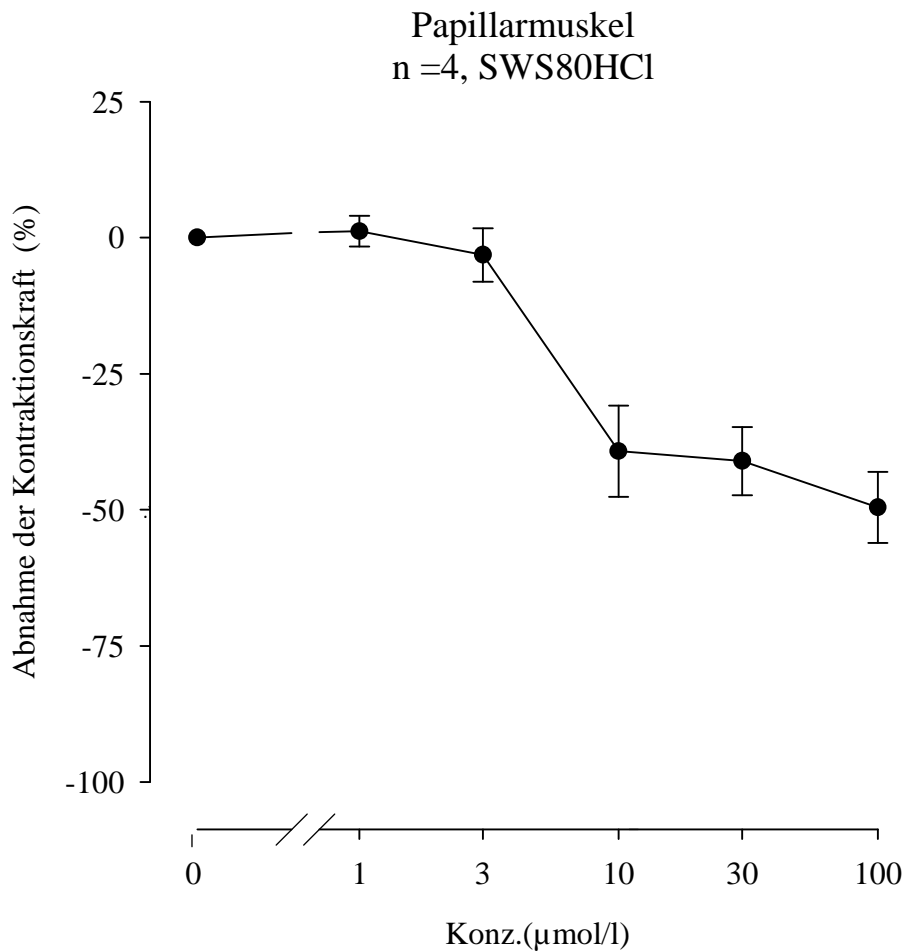
Tabelle 11: Ergebnisse von SWS 80 HCl auf den Papillarmuskel

SWS 80 HCl ( $\mu\text{mol/l}$ )	fc $\pm$ SEM (mN)	fc $\pm$ SEM (%)	Versuchsanzahl (n)	Irrtums= Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$1,98 \pm 0,24$	$0 \pm 0$	4	-
1	$2,01 \pm 0,25$	$1,19 \pm 2,83$	4	n.s
3	$1,89 \pm 0,23$	$-3,16 \pm 4,90$	4	n.s
10	$1,15 \pm 0,07$	$-39,23 \pm 8,36$	4	n.s
30	$1,13 \pm 0,06$	$-41,05 \pm 6,27$	4	n.s
100	$0,96 \pm 0,04$	$-49,55 \pm 6,53$	4	n.s

fc..... Kontraktionskraft

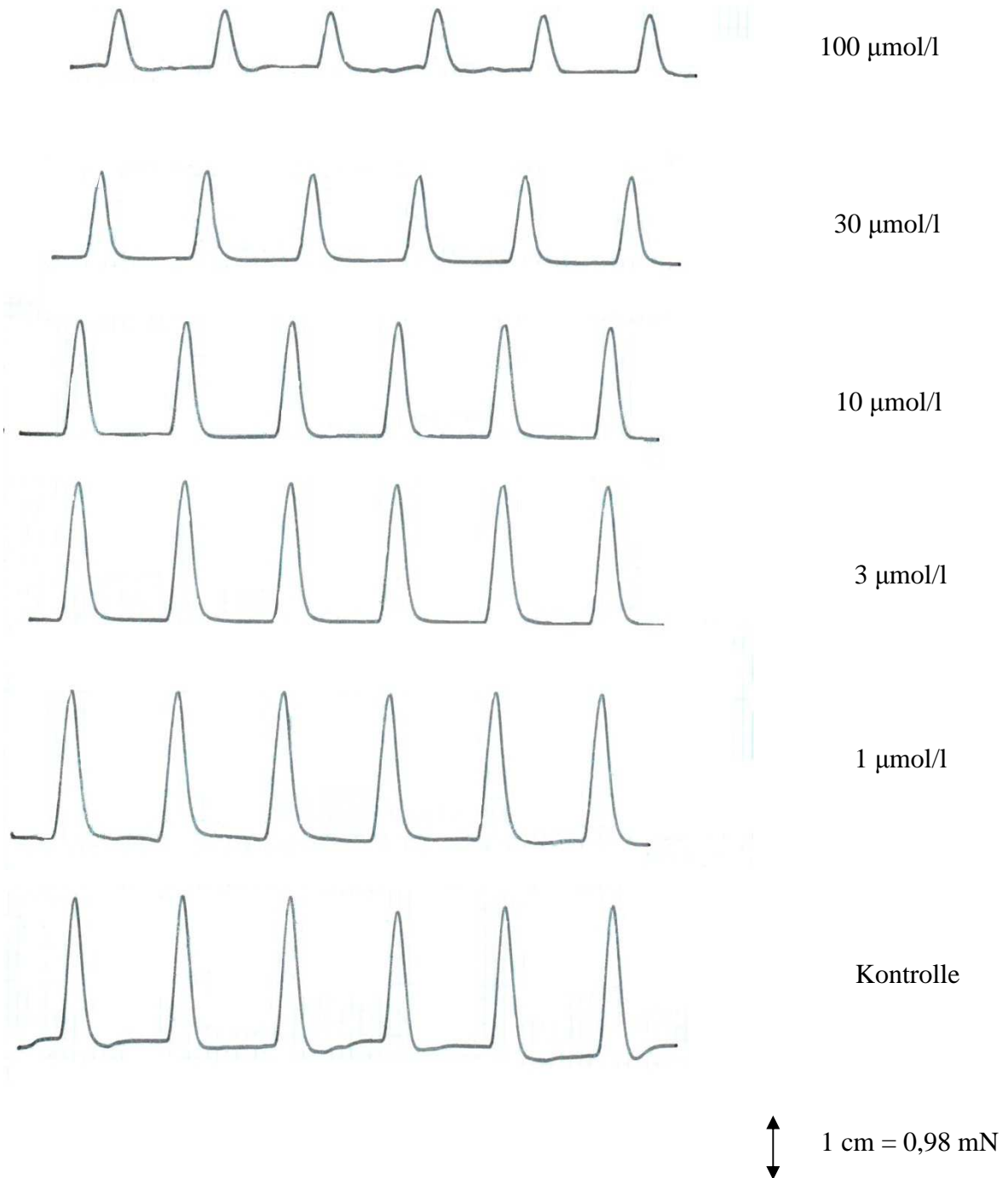
SEM.... Standardabweichung

Diagramm 8: Dosis-Wirkungskurve von SWS 80 HCl auf den Papillarmuskel



Das Diagramm 8 veranschaulicht sehr gut den plötzlichen Kontraktionsabfall durch die Substanz SWS 80 HCl am Papillarmuskel. Die negative inotrope Wirkung setzte nicht sofort ein. Erst bei der Wirkstoffkonzentration von 3 µmol/l kam es zu einer signifikanten Abnahme der Amplitude. Allerdings löste die weitere kumulative Wirkstoffzugabe keinen weiteren verstärkenden Effekt auf die Inotropie des Muskels aus. Die Amplitude nahm ab der Konzentration von 10 µmol/l einen weiteren nahezu konstant linearen Verlauf und verpasste knapp den EC<sub>50</sub>-Wert.

Abbildung 27: Originalaufzeichnung der inotropen Wirkung der Testsubstanz SWS 80 HCl auf den Papillarmuskel



Legende zu Abbildung 27:

In der Abbildung 27 sind die Amplituden des Papillarmuskels original dargestellt, die bei zunehmender Konzentration der Substanz SWS 80 HCl auf eine Abnahme der Kontraktionskraft hinweisen.

#### 4.2.4. Aorta descendes

Die gewünschte vasodilatierende Wirkung wurde durch die Testsubstanz SWS 80 HCl näher untersucht, indem man 4 Versuchsreihen durchführte.

Dabei bemerkte man nur eine sehr geringe Aktivität der Substanz im Bezug auf die Gefäße. Ein EC<sub>50</sub> –Wert konnte keineswegs erreicht werden.

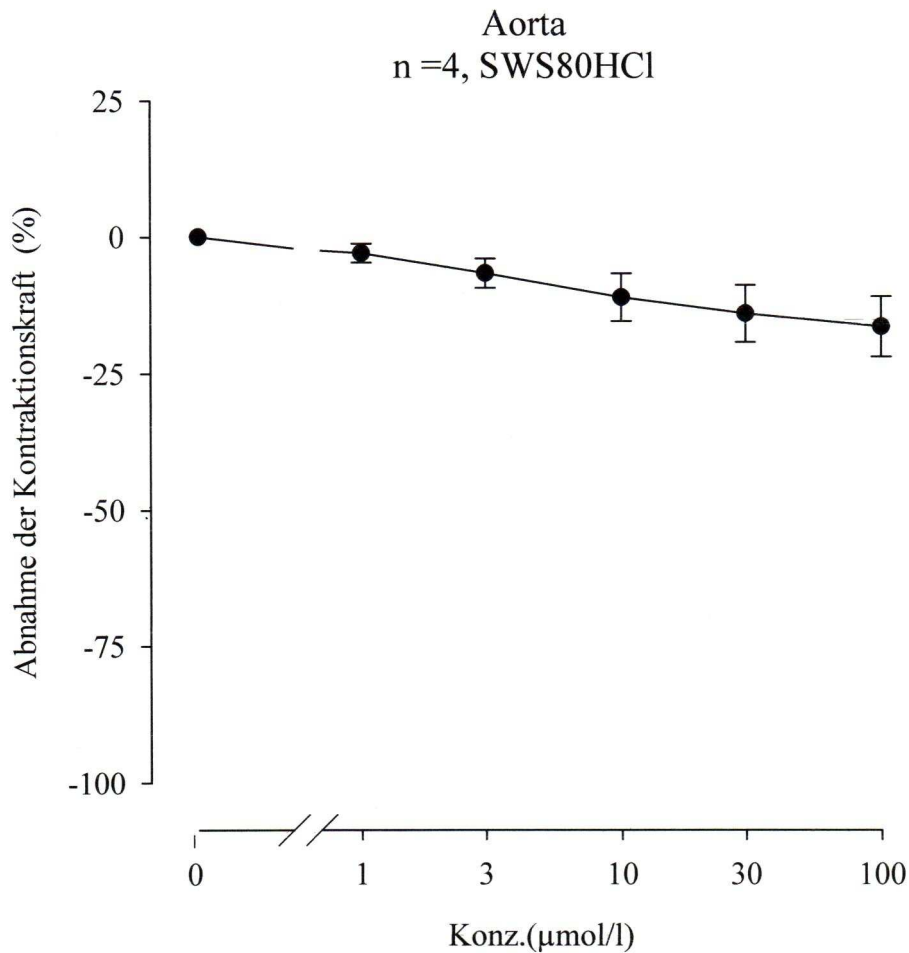
Tabelle 12: Ergebnisse von SWS 80 HCl an der Aorta descendes

SWS 80 HCl ( $\mu\text{mol/l}$ )	fc $\pm$ SEM (m/N)	fc $\pm$ SEM (%)	Versuchsanzahl (n)	Irrtums= Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	14,04 $\pm$ 4,93	0 $\pm$ 0	4	-
1	13,82 $\pm$ 5,02	-2,96 $\pm$ 1,74	4	n.s
3	13,38 $\pm$ 4,92	-6,64 $\pm$ 2,66	4	n.s
10	12,96 $\pm$ 4,94	-11,04 $\pm$ 4,38	4	n.s
30	12,67 $\pm$ 4,96	-14,02 $\pm$ 5,24	4	n.s
100	12,40 $\pm$ 4,91	-16,39 $\pm$ 5,52	4	n.s

fc..... Kontraktionskraft

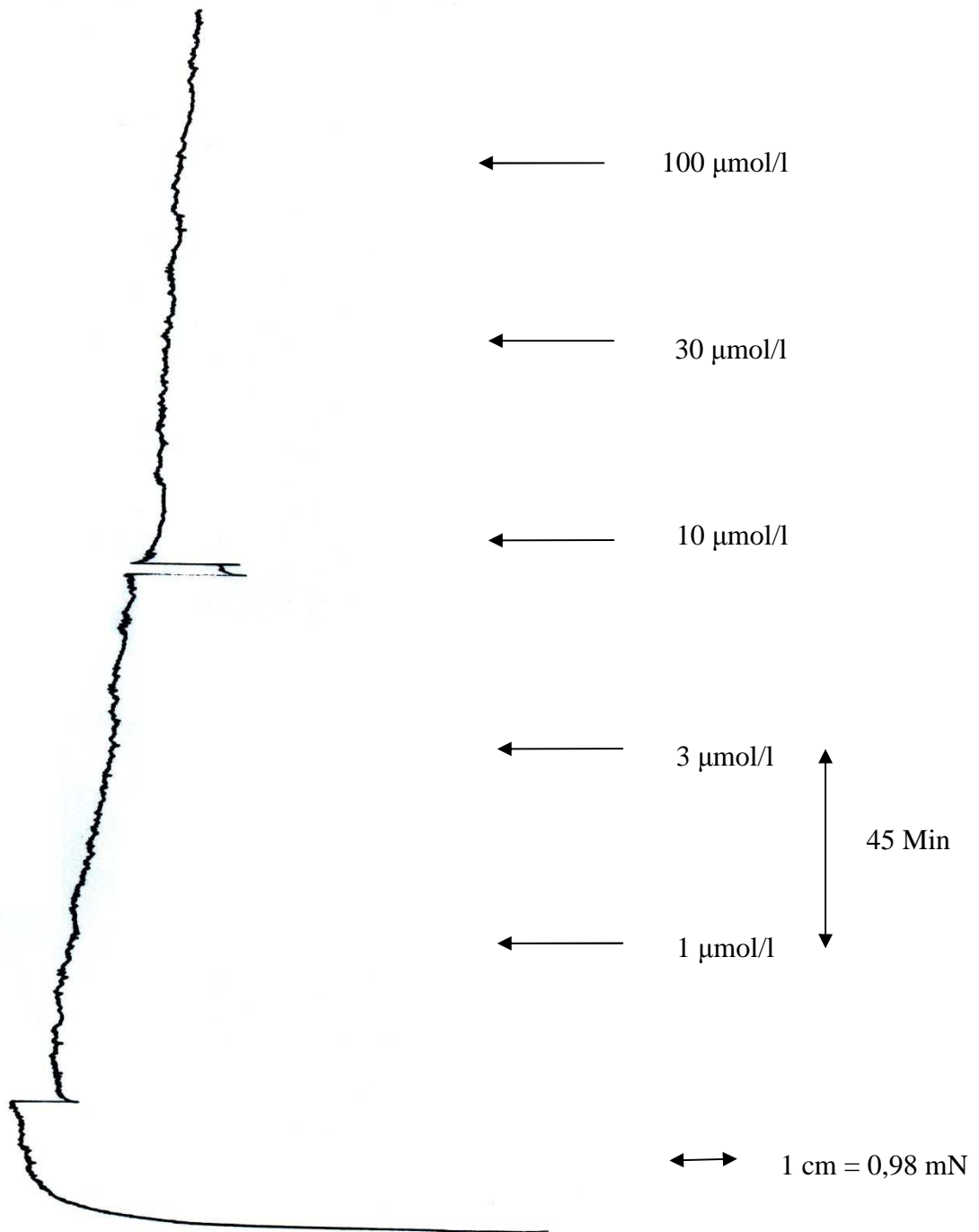
SEM.... Standardabweichung

Diagramm 9: Dosis-Wirkungskurve von SWS 80 HCl an der Aorta descendes



In Diagramm 9 ist die Abnahme der Kontraktionskraft wieder auf der Abszisse aufgetragen. Mit zunehmender Konzentration der Testsubstanz SWS 80 HCl wird ein schwacher Trend Richtung Dilatation der Gefäße sichtbar. Dieser Abfall reichte jedoch für die Ermittlung eines  $EC_{50}$ -Wertes nicht aus.

Abbildung 28: Originalaufzeichnung der dilatierenden Wirkung der Testsubstanz SWS 80 HCl auf die Aorta descendes



Legende zu Abbildung 28:

Die Abbildung 28 präsentiert den Verlauf der Kontraktionskurve der Aorta descendes bei der kumulativen Substanzzugabe im Intervall von 45 Minuten.

#### 4.2.5. *Ileum terminalis*

Um einen spasmolytischen Effekt der Testsubstanz SWS 80 HCl auf den Ileum terminalis eruieren zu können, waren 4 Versuche erforderlich.

Der ermittelte Kontrollwert lag bei  $4,75 \pm 0,05$  mN. Im Zuge der kumulativen Substanzzugabe kam es lediglich zu einer äußerst gering ausgeprägten Spasmolyse.

Folglich gab es keinen EC<sub>50</sub>-Wert.

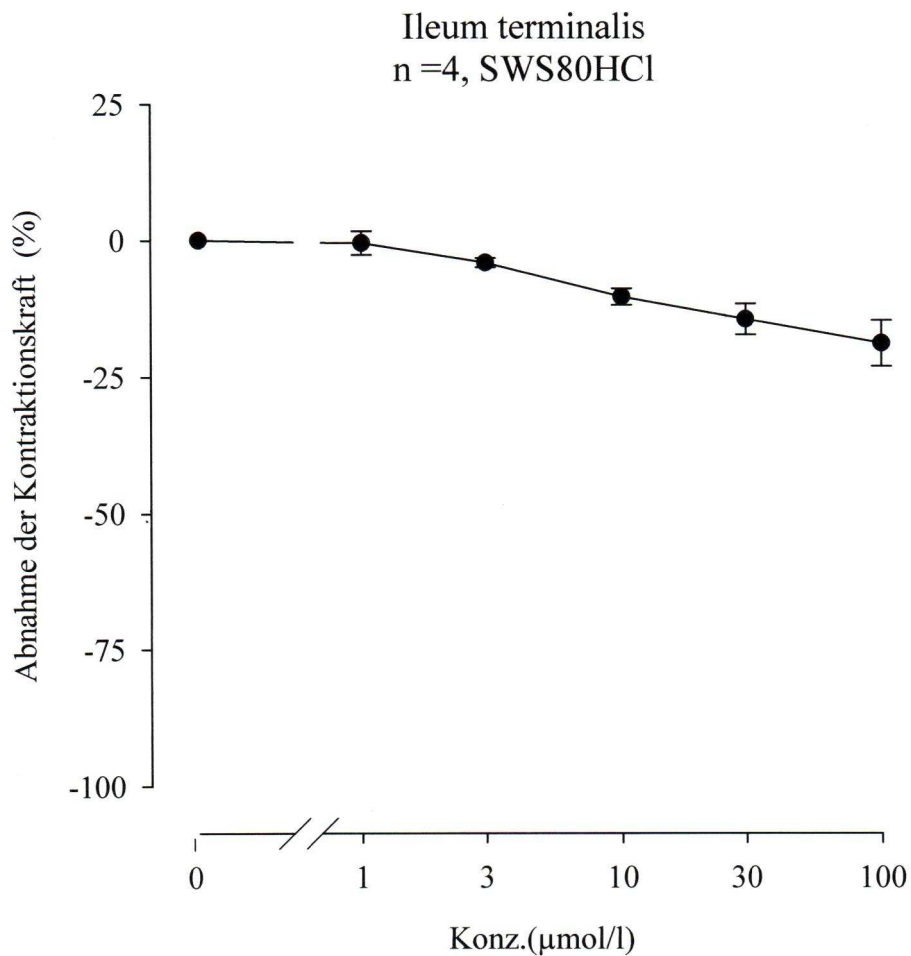
Tabelle 13: Ergebnisse von SWS 80 HCl am terminalen Ileum

SWS 80 HCl ( $\mu\text{mol/l}$ )	fc $\pm$ SEM (m/N)	fc $\pm$ SEM (%)	Versuchszahl (n)	Irrtums= Wahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$4,75 \pm 0,05$	$0 \pm 0$	4	-
1	$4,73 \pm 0,12$	$-0,52 \pm 2,15$	4	n.s
3	$4,56 \pm 0,06$	$-4,13 \pm 0,85$	4	n.s
10	$4,26 \pm 0,10$	$-10,33 \pm 1,51$	4	n.s
30	$4,07 \pm 0,15$	$-14,46 \pm 2,85$	4	n.s
100	$3,86 \pm 0,22$	$-18,88 \pm 4,19$	4	n.s

fc..... Kontraktionskraft

SEM.... Standardabweichung

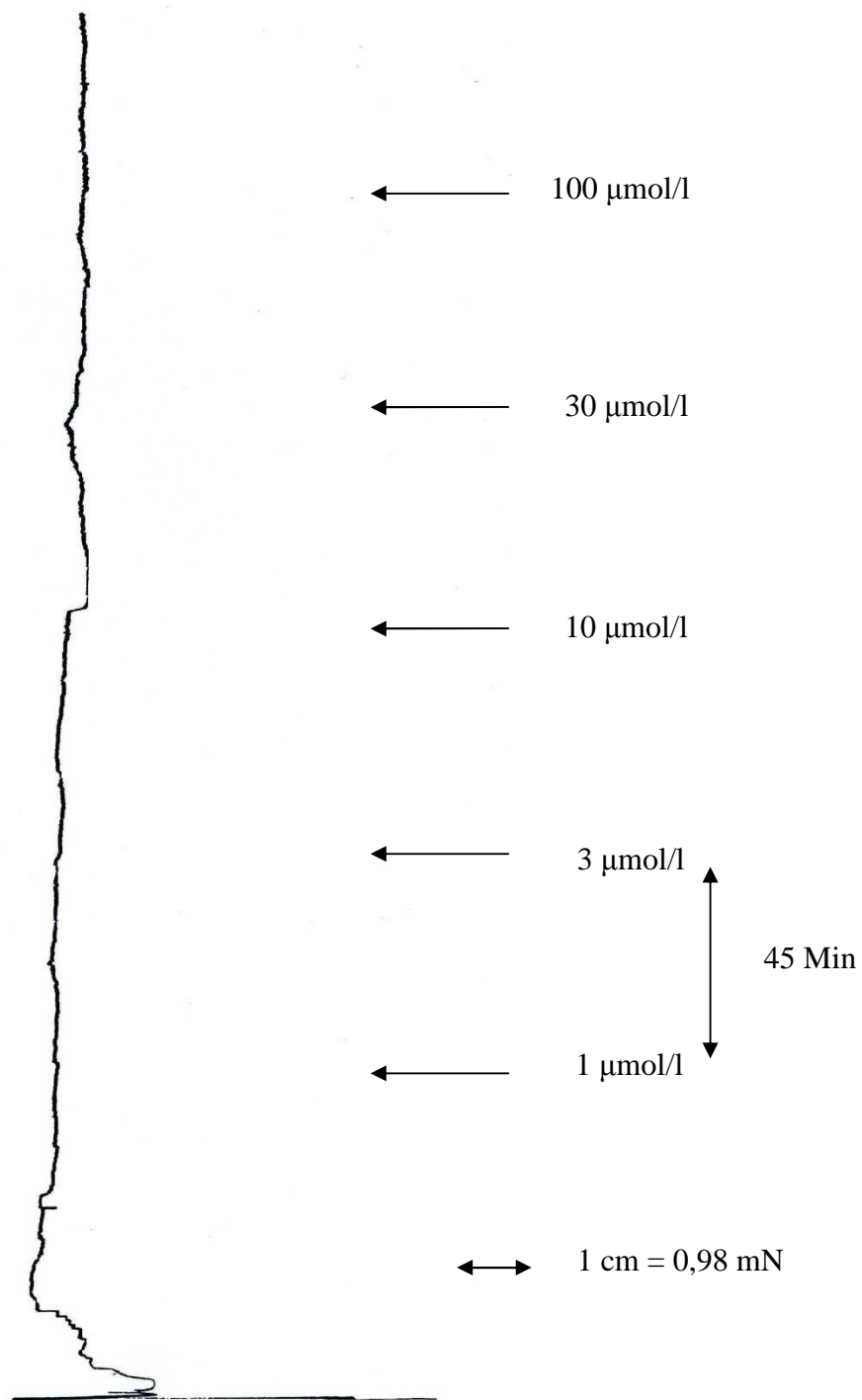
Diagramm 10: Dosis-Wirkungskurve von SWS 80 HCl am terminalen Ileum



Das Diagramm 10 stellt den Effekt der Substanz SWS 80 HCl auf den Ileum terminalis graphisch dar. Auf der x-Achse sind die Konzentrationen in  $\mu\text{mol/l}$  aufgetragen und auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent. Erkennbar ist eine leichte Spasmolyse, die allerdings eher auf einen Qualitätsverlust der empfindlichen Darmpräparate hindeutet.



Abbildung 29: Originalaufzeichnung der Wirkung der Testsubstanz SWS 80 HCl auf den terminalen Ileum.



Legende zu Abbildung 29:

Die Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der Substanzzugabe. Die Abstände zwischen den einzelnen Injektionen betragen jeweils 45 Minuten.

## 5. DISKUSSION

Diese Diplomarbeit befasst sich mit der Untersuchung der Wirkung von den beiden neu synthetisierten Testsubstanzen SWS 73 HCl und SWS 80 HCl an isolierten Meerschweinchenorganen.

Die Versuche wurden wie in Kapitel 3 beschrieben durchgeführt und deren Ergebnisse im darauffolgenden Kapitel 4 präsentiert. In diesem Kapitel sollen nun die Ergebnisse diskutiert und näher besprochen werden.

Dabei unterscheidet man grundsätzlich die Wirkung der Substanzen auf die glatte Muskulatur, wie Aorta, Darm und Lungenarterie von der Wirkung auf die quergestreifte Muskulatur des Herzens.

Allgemein betrachtet, zeigten beide Testsubstanzen eine äußerst geringe Aktivität auf alle 5 isolierten Organe, wobei zumindest die Substanz SWS 80 HCl eine negative inotrope Wirkung auf den Papillarmuskel ausübte, sodass diese nur knapp das Erreichen eines  $EC_{50}$ -Werts verfehlte. Dieser Effekt kann jedoch auch auf eine mangelnde Funktionstüchtigkeit des Präparates über die Dauer der Versuche hindeuten, welcher dann als negative inotrope Wirkung leicht missgedeutet wird.

Um die Ergebnisse der beiden Testsubstanzen besser zu veranschaulichen, sollen die folgenden Tabellen 14 und 15 einen vergleichenden Überblick über die Effekte geben.

### 5.1. Wirkung auf glattemuskuläre Organe

Tabelle 14: Wirkung der Substanzen SWS 73 und SWS 80 auf die glatte Muskulatur

Organpräparat	SWS 73 HCl fc (%) $\pm$ SEM bei 100 $\mu$ mol/l	$EC_{50}$ ( $\mu$ mol/l)	SWS 80 HCl fc (%) $\pm$ SEM bei 100 $\mu$ mol/l	$EC_{50}$ ( $\mu$ mol/l)
Arteria pulmonalis	1,24 $\pm$ 5,25	-	0,54 $\pm$ 3,78	-
Aorta descendens	-26,11 $\pm$ 8,55	-	- 16,39 $\pm$ 5,52	-
Ileum terminalis	-18,19 $\pm$ 6,51	-	- 18,88 $\pm$ 4,19	-

## 5.2. Wirkung auf die Herzmuskulatur

Tabelle 15: Wirkung der Substanzen SWS 73 und SWS 80 auf die Herzmuskulatur

Organpräparat	SWS 73 HCl fc (%) ± SEM bei 100 µmol/l	EC <sub>50</sub> (µmol/l)	SWS 80 HCl fc (%) ± SEM bei 100 µmol/l	EC <sub>50</sub> (µmol/l)
Atrium dexter	-2,94 ± 5,66	-	-10,69 ± 6,14	-
Musculus papillaris	-39,25 ± 1,96	-	- 49,55 ± 6,53	-

Anhand dieser tabellarischen Auflistung wird die fehlende Wirkung der verwendeten SWS-Verbindungen ersichtlich.

Nun stellt sich die Frage, warum die gewünschten Wirkungen der beiden Substanzen ausblieben.

Durch hydrolytische Spaltung sollte H<sub>2</sub>S aus der Verbindung freigesetzt werden, dessen potentielle Wirkung bereits in der Einleitung durch zahlreiche Studien diskutiert wurde. Anscheinend fand jedoch dieser entscheidende Schritt in den Versuchen nicht statt und dessen Ursachen gilt es hier nun zu klären.

Die Antwort darauf findet man möglicherweise im Aufbau der Strukturen, welche im Kapitel 3.1.1 für die Substanz SWS 73 HCl und in Kapitel 3.1.2. für die Substanz SWS 80 HCl mit ihren chemischen Formeln genau dargestellt werden.

Bei beiden Testsubstanzen handelt es sich um Verbindungen mit einem Schwefelatom. Dieser ist über eine Doppelbindung mit einem Kohlenstoffatom verbunden, der wiederum beidseitig mit jeweils einem Sauerstoffatom verankert ist. Diese als Carbothionat bezeichnete Gruppe besitzt eine Bindungsenergie von 335 kJ/mol, welche als eine relativ starke Bindungskraft angesehen werden kann.

Im Vergleich dazu konnte man bei SWS-Verbindungen, die anstelle des Sauerstoffes einen Stickstoff substituiert hatten, eine H<sub>2</sub>S-Freisetzung und in weiterer Folge eine Wirkung an den Organen beobachten. Solche Verbindungen besitzen durch den Austausch eine deutlich geringere Bindungsenergie von 293 kJ/mol.

Diese Tatsache verdeutlicht somit, dass die beiden Testsubstanzen SWS 73 HCl und SWS 80 HCl eine wesentlich schlechtere Ausgangssituation hatten, welche möglicherweise entscheidend für die erhoffte Wirkung gewesen wäre.

Ein weiterer Faktor für die fehlende Wirkung stellt die Vermutung dar, dass H<sub>2</sub>S nicht alleine für die dilatierende Wirkung verantwortlich ist. Über die Beteiligung von anderen Systemen wie zum Beispiel das NO-System ist man sich zwar einig, aber inwiefern dies ausschlaggebend ist, ist man sich noch im Unklaren. (Elsley et al. 2010)

Als weiteren Grund für die Wirkungslosigkeit der beiden SWS-Verbindungen kann die Art der Abspaltung besprochen werden. Da es sich bei beiden Substanzen um wasserlösliche Verbindungen handelt, sollte die H<sub>2</sub>S-Freisetzung problemlos hydrolytisch erfolgen können. Allerdings wird nun vermutet, dass auch Enzyme, die sogenannten Esterasen, eine wesentliche Rolle beim Zerfall der Wirkstoffe spielen könnten. Da aber diese Esterasen nur in unseren Körpern vorkommen und nicht Teil der Versuchsanordnung waren, könnte das Fehlen dieses Enzyms eine weitere Erklärung für die unzureichende Wirkung der beiden Testsubstanzen darstellen.

Um dieser Theorie genauer nachzugehen, wurden bereits Versuche mit einer Acetylcholinesterase durchgeführt. Dieses Enzym ist in der Lage H<sub>2</sub>S aus der Verbindung abzuspalten, wodurch dieses nun freigesetzte Gas seine Wirkung an einem eingespannten Aortenstück hätte entfalten können. Dieser Effekt blieb jedoch aus und der Versuch diese Theorie zu untermauern erfolglos.

Allerdings gibt es auch hier wieder einige Ansatzpunkte, warum dieses Experiment mit dem Enzym missglückt ist.

Zu allererst muss erwähnt werden, dass die Acetylcholinesterase ein sehr empfindliches Enzym darstellt.

Das bedeutet, dass sie einerseits eine optimale pH-Wert Einstellung während des Versuches benötigt, um ihre Wirkung tatsächlich entfalten zu können. Diese möglicherweise entscheidende Simulation von physiologischen Bedingungen war eventuell nicht geglückt.

Des Weiteren hat die Acetylcholinesterase nur eine sehr kurze Wirkdauer (Müller-Esterl 2004). Da aber bei den Versuchen zuerst das Enzym in das Organbad zugefügt wurde und erst 45 Minuten später die Testsubstanz, war das Enzym voraussichtlich schon längst wieder wirkungslos.

All diese angeführten denkbaren Fehlerquellen sollten als Gedankenanstoß für zukünftige Experimente dienen. Ein Lösungsansatz wäre, Untersuchungen mit anderen Esterasen, die vor allem Spezies spezifisch sind, durchzuführen. Das bedeutet, dass Enzyme generell in dem Organismus am besten wirken, indem sie auch physiologisch synthetisiert worden sind.

Eine weitere Option wäre auch der Einsatz eines Serums, indem sich eine große Menge an Esterasen befindet. Dieses würde die Chance auf eine Wirkung erhöhen und dadurch wären eventuell bessere Ergebnisse absehbar.

Zusammenfassend muss man feststellen, dass weder die Testsubstanz SWS 73 HCl noch die Testsubstanz SWS 80 HCl eine signifikante Wirkung ergeben haben.

Trotzdem können Schwefelwasserstoff-Verbindungen als Hoffnungsträger für die Zukunft angesehen werden, da etliche andere untersuchte SWS-Verbindungen Potential zeigten und zum Teil starke Wirkungen an den isolierten Organen der Meerschweinchen ausübten.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Diplomarbeit wurden die Testsubstanzen SWS 73 HCl und SWS 80 HCl auf ihre Wirksamkeit am Meerschweinchen geprüft.

Dafür wurde täglich ein Versuchstier des TRIK-Stammes getötet, um dessen Organe entnehmen zu können.

Zum einem benötigte man Versuchsorgane der quergestreiften Muskulatur, wozu der Atrium dexter und der Musculus papillaris zählten. Am rechten Vorhof galt es die chronotropen Effekte der Testsubstanzen zu untersuchen, währenddessen am Papillarmuskel die Beobachtung der inotropen Wirkung im Vordergrund stand.

Für die Versuche an der glatten Muskulatur war die Isolierung der Arteria pulmonalis, der Aorta descendes und des Ileum terminalis von Nöten. Hier war auf eine mögliche vasodilatierende Wirkung der Testsubstanzen zu achten.

Nach erfolgreicher Entnahme dieser fünf Organe präparierte man diese in einer mit Nährlösung befüllten Petrischale unter ständiger Begasung, um sie anschließend in die Versuchsapparatur einspannen zu können.

Die ständige Aufbewahrung der Präparate in der Tyrodelösung unter Carbogenzufuhr war für die Aufrechterhaltung der Funktionstüchtigkeit der Organe unerlässlich.

Des Weiteren war bei den Versuchsorganen der glatten Muskulatur eine Vorkontraktion mittels einer KCl-Lösung erforderlich, um eine durch die Wirksubstanz ausgelöste Vasodilatation überhaupt sichtbar machen zu können.

Danach erfolgte nach einem festgelegten Pipettierschema die kumulative Testsubstanzzugabe mittels Finnpipette. Durch die Substanz ausgelöste Veränderungen wurden mittels eines Kraftwandlers über einen Verstärker registriert und schlussendlich mit Hilfe eines Schreibers aufgezeichnet.

Die dadurch erhaltenen Messwerte dienten zur Ermittlung des  $EC_{50}$ -Wertes, der schlussendlich die Wirksamkeit der Substanz widerspiegelte.

Zusammengefasst konnte bei keiner der beiden Substanzen eine signifikante Wirkung festgestellt werden.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

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

Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke (2009) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 10.Auflage, Elsevier München

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

Benavides GA, Squadrito GL, Mills RW, Patel HD, Isbell TS, Patel RP, Darley-Usmar VM, Doeller JE, Kraus DW (2007) Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:17977-82

Burger A, Wachter H (1997) *Hunnius - Pharmazeutisches Wörterbuch*, 8. Auflage

Elsley DJ, Fowkes RC, Baxter GF (2010) Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S). *Cell Biochem Funct* 28:95-106

Erickson PF, Maxwell IH, Su LJ, Baumann M, Glode LM (1990) Sequence of cDNA for rat cystathionine  $\gamma$ -lyase and comparison of deduced amino acid sequence with related *Escherichia coli* enzymes. *Biochem J* 269: 335-340

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

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

Huang XL, Zhou XH, Wei P, Zhang XJ, Meng XY, Xian XH (2008) Role of endogenous hydrogen sulfide in pulmonary hypertension induced by lipopolysaccharide. *Sheng Li Xue Bao* 60:211-215

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

Kamoun P (2004) Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino Acids* 26:243-254

Koch-Weser J (1963) Influence of osmolarity of perfusate on contractility of mammalian myocardium, *Am J Physiol* 204:957-962

Koenitzer JR, Isbell TS, Patel HD, Benavides GA, Dickinson DA, Patel RP, Darley-Usmar VM, Lancaster JR Jr, Doeller, JE, Kraus DW (2007) Hydrogen sulfide mediates vasoactivity in an O<sub>2</sub>-dependent manner. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:1953-60

Kubo S, Doe I, Kurokawa Y, Nishikawa H, Kawabata A (2007) Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: contribution to dual modulation of vascular tension. *Toxicology* 232:138-146

Lee SW, Cheng Y, Moore PK, Bian JS (2007) Hydrogen sulphide regulates intracellular pH in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res Commun* 358:1142-1147

Müller-Esterl W (2004) *Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag, 1.Auflage

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M, (2001) *Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 9.Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

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) Mutschler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 9. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Oberdisse E, Hackenthal E, Kuschinsky K (2001) Pharmakologie und Toxikologie, 3.Auflage, Springer Berlin

Reiter M (1997) Die Wertbestimmung inotrop wirkender Arzneimittel an isolierten Papillarmuskeln, *Arzneim Forsch* 17:1249-1253

Seino S, Miki T (2003) Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K<sup>\*</sup> channels, *Progress in Biophysics and molecular Biology* 81:133-176

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

Szabo C (2007) Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature reviews* 6:917-935

Wang R (2002) Two`s company, Three`s a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* 16:1792-1798

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

## 8. LEBENS LAUF

### **Persönliche Daten:**

Name: Claudia Köberl

Wohnort: 1180 Wien

Nationalität: Österreich

Geburtsdatum: 27.12.1984

Eltern: Dr. Herwig Köberl

Bettina Köberl

Geschwister: Stefan Köberl

### **Ausbildung:**

1991- 1995 Volksschule Scheibenbergstrasse

1995- 2003 Gymnasium Haizingergasse

2003: Beginn des Diplomstudiums Pharmazie

2010: Beginn der Diplomarbeit im Fachbereich Pharmakologie und Toxikologie

### **Berufserfahrung:**

Sommer 2002, 2003: Ferialpraxis Lesen im Park

2003, 2004 MC-Marketing

2002- 2008 Pep Promotion

2006-2009 Wanek

SS 2008, WS 2008/2009: Tutorin Arzneimittelanalytik