



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Pharmakologisches Profil einer neu synthetisierten
Verbindung (MAH 27 HCl) an isolierten Organen von
Meerschweinchen

Verfasser

Ahmed El-Gamal

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag. pharm)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Pharmazie

Betreuerin / Betreuer: Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

WIDMUNG und DANKSAGUNG

Diese Diplomarbeit ist meiner Familie, vor allem meinem Vater Rashad El-Gamal und meiner Mutter Hemat Agour, gewidmet. Ihre stets moralische und finanzielle Unterstützung während meines gesamten Studiums waren die Grundpfeiler für meinen Studienerfolg- und Abschluss. Dafür will ich mich von ganzem Herzen bei Ihnen bedanken!

Außerdem möchte ich mich noch herzlichst bei meinen Geschwistern Mohamed, Dena und Mahmoud El-gamal für ihre Unterstützung danken. Vor allem Mohamed hat mich immer motiviert und geholfen meinen Weg weiterzuverfolgen.

Hinter jedem Erfolg steht eine Frau. Auch bei meinem Erfolg, war mir meine Frau Leila Zahraa immer mein Fels in der Brandung. Ihr und meinen wunderbaren Töchtern, Shahd, Ayah und Sama, will ich außerordentlich danken, da sie mir in der Studienzeit aber auch vor allem während meiner Diplomarbeit, meine Kraftspender waren, auf die ich mich immer und jederzeit verlassen konnte.

Insbesondere will ich mich beim Herrn Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik bedanken, den ich bereits während meiner Studienzeit immer als Vorbild sah, der mich auch während meiner Diplomarbeit sowohl mit seinem unendlichen Wissen als auch mental immer unterstützt hat. Seine stets professionelle und doch menschliche Betreuung waren eine große Unterstützung, die mich immer vorangetrieben hat.

Mein besonderer Dank gilt auch all jenen Menschen die ich in meiner Zeit an der Universität getroffen habe und die mich durch die Höhen und Tiefen des Studiums begleitet haben. Viele davon, besonders Franziska Misliwetz, darf ich heute nicht nur als Kollegen sondern als Freunde bezeichnen.

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
1.1. Zielsetzung.....	1
1.2. Schwefelwasserstoff.....	1
2. Material und Methoden	4
2.1. Versuchstiere	4
2.2. Herstellung von Tyrode	5
2.3. Präparate	6
➤ 2.3.1. Isolierung des rechten Vorhofs (Atrium cordis dexter).....	8
➤ 2.3.2. Isolierung vom Papillarmuskel (Musculus Papillaris).....	9
➤ 2.3.3. Isolierung des Darms (Ileum terminalis).....	10
➤ 2.3.4. Isolierung der Aorta (Aorta descendes)	11
➤ 2.3.5. Isolierung der Lungenarterie (Arteria pulmonalis)	13
2.4. Testsubstanz.....	14
2.5. Versuchsanordnung	15
➤ 2.5.1. Versuchsanordnung A.....	16
➤ 2.5.2. Versuchsanordnung B.....	18
➤ 2.5.3. Gaszufuhr.....	20
➤ 2.5.4. Kraftwandler, Verstärker, Reizgerät, Schreiber.....	20
2.6. Versuchsablauf.....	22
➤ 2.6.1. Versuchsablauf beim rechten Vorhof (Atrium cordis dexter)	22
➤ 2.6.2. Versuchsablauf bei Papillarmuskel (Musculus papillaris)	24
➤ 2.6.3. Versuchsablauf bei Ileum terminales	25
➤ 2.6.4. Versuchsablauf bei Aorta	26
➤ 2.6.5. Versuchsablauf bei Arteria pulmonalis.....	26

2.7. Bereitung der Stammlösungen.....	27
➤ 2.7.1. Stammlösung der Testsubstanz	27
2.8. Statistik.....	27
3. Ergebnisse.....	30
3.1. Wirkung von MAH 27 HCl auf das terminale Ileum	30
3.2. Wirkung von MAH 27 HCl auf die Aorta.....	34
3.3. Wirkung von MAH 27 HCl auf die Arteria pulmonalis.....	37
3.4. Wirkung von MAH 27 HCl auf den Papillarmuskel	40
3.5. Wirkung von MAH 27 HCl auf den Vorhof.....	43
3.6. Resultate der Untersuchung mit Glibenclamid	46
➤ 3.6.1. Resultate der Versuche mit 30 µmol/l Glibenclamid.....	47
➤ 3.6.2. Resultate der Versuche mit 100 µmol/l Glibenclamid.....	50
4. Diskussion	53
4.1. Versuchsreihen am quergestreiften Herzmuskel	53
4.2. Versuchsreihen an glattmuskulären Organen.....	55
4.3. Versuchsreihen mit MAH 27 HCl in Kombination mit Glibenclamid.....	56
➤ 4.3.1. Versuch mit MAH 27 HCl in Kombination mit 30 µmol/l Glibenclamid	56
➤ 4.3.2. Versuch mit MAH 27 HCl in Kombination mit 100 µmol/l Glibenclamid	57
5. Zusammenfassung.....	58
6. Literaturverzeichnis	60
7. Curriculum Vitae.....	62

1. Einleitung

1.1. Zielsetzung

Das Ziel meiner Diplomarbeit war es, die Wirkung der am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie hergestellten Substanz MAH 27 HCL, auf 5 isolierte Organe des Meerschweinchens zu untersuchen. Die Wirkung wurde an der glatten Muskulatur der Aorta, am Ileum terminales und an der Pulmonalarterie untersucht. Die Inotropie wurde an der quergestreiften Muskulatur des Papillarmuskels beobachtet, während die Chronotropie am rechten Vorhof genauer angeschaut wurde.

An dem Organ, an welchem die Testsubstanz die stärkste Wirkung erzielt hatte, sollte auch ein möglicher Wirkmechanismus genauer untersucht werden, was bei der untersuchenden Substanz das Ileum terminales war. Hierbei handelt es sich um Glibenclamid, welches zu den Sulfonylharnstoffen gehört und den ATP-abhängigen Kaliumkanal blockiert.

1.2. Schwefelwasserstoff

Schwefelwasserstoff ($=\text{H}_2\text{S}$; Molekulargewicht 34,08 g/mol) ist in niedriger Konzentration ein stark nach faulen Eiern riechendes Gas (Geruchschwelle bei $0,025\text{ml/m}^3$), während es bei höherer Konzentration eher süßlich riecht. Es entsteht bei der Einwirkung von Säuren auf Schwermetallsulfide oder bei der reduktiven Zersetzung von Eiweiß (Forth et al 2009).

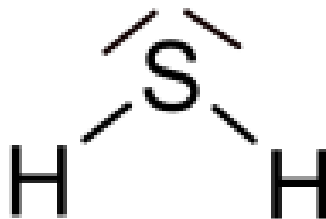
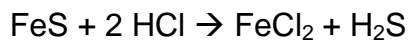


Abbildung 1: Struktur Schwefelwasserstoff

Im Labormaßstab entsteht aus Eisen(II)-sulfid und Salzsäure das Eisen(II)-chlorid und Schwefelwasserstoff.



Bei einer akuten Schwefelwasserstoffvergiftung sind vor allem das zentrale Nervensystem und der Atemtrakt betroffen. Bei einer Inhalation von einer hohen H_2S -Konzentration kann es zu Bewusstseinsverlust und zentraler Atemlähmung kommen.

Das Auftreten der zentralen Atemlähmung kann nach wenigen Atemzügen geschehen (apoplektiforme Vergiftung) und geringe H_2S -Konzentrationen verursachen unter anderem Hyperpnoe, Schwäche und Krämpfe sowie Reizerscheinungen im Atemtrakt und teilweise auch Lungenödeme. Spätfolgen sind dann Pneumonie und Herzmuskeldegeneration (Forth et al 2009). Jedoch ist der genaue Wirkmechanismus einer H_2S -Vergiftung noch nicht komplett aufgeklärt.

Das wichtigste bei der Therapie einer akuten Vergiftung ist die gezielte Beatmung. Versuchsweise kann man aber auch Diethylaminophenol (=4-DMAP) ohne nachfolgende Gabe von Natriumthiosulfat einsetzen (Oberdisse et al. 2002).

Im Organ wird aus Schwefelwasserstoff das Hydrogensulfidion gebildet und sowohl das, als auch H_2S blockieren in höheren Konzentrationen die eisenhaltigen Atmungsenzyme. Das im Organismus durch Protonierung entstandene Hydrogensulfidion inhibiert das 3-wertige Eisen der Cytochromoxidase und blockiert genauso wie das Cyanid die Enzyme der oxidativen Phosphorylierung (Estler und Schmidt 2007).

Dazu wird noch angenommen, dass Schwefelwasserstoff zu einer Störung des Zellstoffwechsels mit konsekutiver Hypoxie führt (Mutschler et al. 2008).

H_2S ist zwar ein gasförmiger ATP-abhängiger Kaliumkanalöffner, doch hat es keine Kanalspezifität gezeigt und daher könnte es auch möglicherweise einige Effekte auf die Insulin-Sekretion haben (Pathel 2010).

Die ATP-abhängige Kaliumkanäle werden durch Adenosintriphosphat (=ATP) gesteuert. Bei einem ATP-Anstieg kommt es zu einer Schließung der Kanäle (Mutschler et al. 2008).

Schwefelwasserstoff ist ebenso ein biologisches Gas, welches im Organismus endogen beim Cystein-Metabolismus entsteht (Stipanuk und Beck 1982, Hosoki et al. 1997).

Man kam letztendlich zu der Überzeugung, dass H₂S neben seiner Toxizität auch eine physiologische Rolle in der kardiovaskulären Regulation spielen könnte. Daher beschäftigten sich viele Studien damit, zum Beispiel zeigte Hosoki et al. (1997), dass H₂S bei Ratten in vitro die Aorta relaxierte. Nun wurde daran gearbeitet den genauen Wirkungsmechanismus aufzuklären. Hierfür wurde ein Zusammenhang mit den bekannten Regulationsmechanismen der vaskulären, glatten Muskulatur, Kohlenstoffmonoxid (=CO), Stickstoffmonoxid (=NO) und K_{ATP} Kanäle in Betracht gezogen. Eine Studie an pulmonalen Rattenaorten zeigte den Zusammenhang zwischen Stickstoffmonoxid und Schwefelwasserstoff (Wang et al. 2008).

Durch in vitro Versuche bei Ratten wurde gezeigt, dass H₂S durch den Angriff am ATP abhängigen Kaliumkanal die Aortengewebe relaxiert und bei isolierten glatten Muskelzellen ermöglicht es eine direkte Öffnung der ATP abhängigen Kaliumkanäle. Dadurch führt es zu einer Hyperpolarisation der Membran. Die Expression der Enzyme, die für die Bildung von Schwefelwasserstoff verantwortlich sind, wurden nicht im Endothel, dafür aber in vaskulären glatten Muskelzellen identifiziert (Zhao et al. 2001).

Der ATP-abhängige Kaliumkanal besteht strukturell aus 4 Untereinheiten, welche aus den vier Untereinheiten des KIR6.1 oder KIR6.2 zusammen mit 4 Sulfonylharnstoffrezeptoruntereinheiten (SUR) bestehen, und stellt ein Octamer dar (Manna et al. 2009).

Es wurde auch mittels einer Studie der Zusammenhang zwischen Schwefelwasserstoff und dem intrazellulären pH, der ebenfalls an der vaskulären Regulation beteiligt ist, gezeigt (Lee et al. 2007).

Diese verschiedenen Studien zeigen, dass die K_{ATP} Kanäle nicht alleine für die physiologische Wirkung von H₂S verantwortlich sind.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Bei den isolierten Organen, die wir für die Versuche verwendet haben, handelte es sich um die Organe männlicher und weiblicher Meeresschweinchen mit einem Körpergewicht von ungefähr 250-600g. Es wurden deswegen Meerschweinchen für die Versuche verwendet, da deren Ionenkanäle ähnlich aufgebaut sind wie bei den Menschen. Außerdem wurde an jedem Versuchstag immer nur ein Tier verwendet.

Nach der Tötung durch Genickschlag (für einen raschen und schmerzlosen Tod des Tieres) wurde der Thorax und das Abdomen behutsam geöffnet.

Zu aller erst wurde mit der Schere und Pinzette das noch schlagende Herz und die Lunge entnommen, danach ein Stück des Dünndarms, das an einem Ende mit einem Faden abgebunden wurde. Zuletzt wurde die Aorta vorsichtig herausgeschnitten.

Damit die isolierten Organe ex vivo auch überleben konnten, wurden sie sofort in eine davor bereitgestellte, physiologische Nährlösung (Tyrode) gegeben und mittels Oxy mix, welches aus Kohlendioxid (5%) und Sauerstoff (95%) besteht, begast. Dadurch wurden Hypoxie und die Gerinnung des Blutes verhindert.

Die Präparationen vom Papillarmuskel und der Arteria pulmonalis erfolgte immer unter dem Mikroskop.



Abbildung 2: Versuchstier (Meerschweinchen)

2.2. Herstellung von Tyrode

Diese physiologische Nährlösung enthält alle erforderlichen Elektrolyte um die isolierten Organe für mindestens 7 Stunden weiter am Leben zu erhalten.

An jedem Tag, wo wir Versuche durchgeführt haben, wurden 2 Liter frisch zubereitet. Die genaue Zusammensetzung der Nährstofflösung:

Substanz	Molekulargewicht	Stocklösung	ml/Stocklösung/ Tyrode	mmol/l
CaCl ₂	110,980 g/mol	34,00 g/250 ml	3,20	3,92
NaHCO ₃	84,010 g/mol	125,00 g/5l	83,70	24,91
KCl	74,550 g/mol	50,33 g/5l	35,00	4,73
NaCl	58,442g/mol	1000,25g/5l	33,60	115,01
KH ₂ PO ₄	136,090 g/mol	62,00 g/250 ml	1,18	2,15
MgSO ₄	120,370 g/mol	147,02 g/5l	1,18	0,29
Glucose	180,160 g/mol	Reinsubstanz	1,98	-

Abbildung 3: Tabelle Nährstoffzusammensetzung

Zuerst wurden NaCl, KCl, NaHCO₃, MgSO₄, KH₂PO₄ und Glucose in einen Messkolben gegeben. Dann wurde der Messkolben mit Aqua bidestillata bis auf ³/₄ des Volumens aufgefüllt und mehrmals geschüttelt, bis die Zusammensetzung homogen wurde. Danach folgte 20 Minuten lang die Begasung mittels Oxymix.

Nach 10 Minuten wurde das CaCl_2 langsam und tropfenweise mit der elektrischen Pipette dazugegeben, ansonsten würden schwerlösliche Calciumsalze ausfallen und die Nährstofflösung trüb werden, wodurch die Zusammensetzung nicht mehr intakt gewesen wäre.

Nachdem das CaCl_2 hinzupipettiert wurde und die 20 Minuten vorüber waren, wurde der Messkolben bis zur Eichgerade mit Aqua bidestillata aufgefüllt und ordentlich geschwenkt.

Die Begasung der Tyrode hatte den Sinn, dass der pH-Wert in einem konstanten, physiologischen Bereich bleibt und um eine ausreichende Sauerstoffversorgung der isolierten Organe zu ermöglichen.

2.3. Präparate

Nach der Begasung der isolierten Organe wurden sie für die Versuche präpariert.

Eine Petrischale wurde zuerst mit Tyrode befüllt und dann die Organe mit einer Pinzette einzeln dahin überführt. Außerdem befand sich in der Petrischale eine Korkscheibe, die durch einen Gummischlauch fixiert wurde. Auf diesem Korkboden wurden die einzelnen Organe jeweils mit einer Präpariernadeln befestigt. Um leichter zu präparieren wurde ein Stereomikroskop verwendet.



Abbildung 4: Lichtmikroskop und Werkzeug zum Präparieren

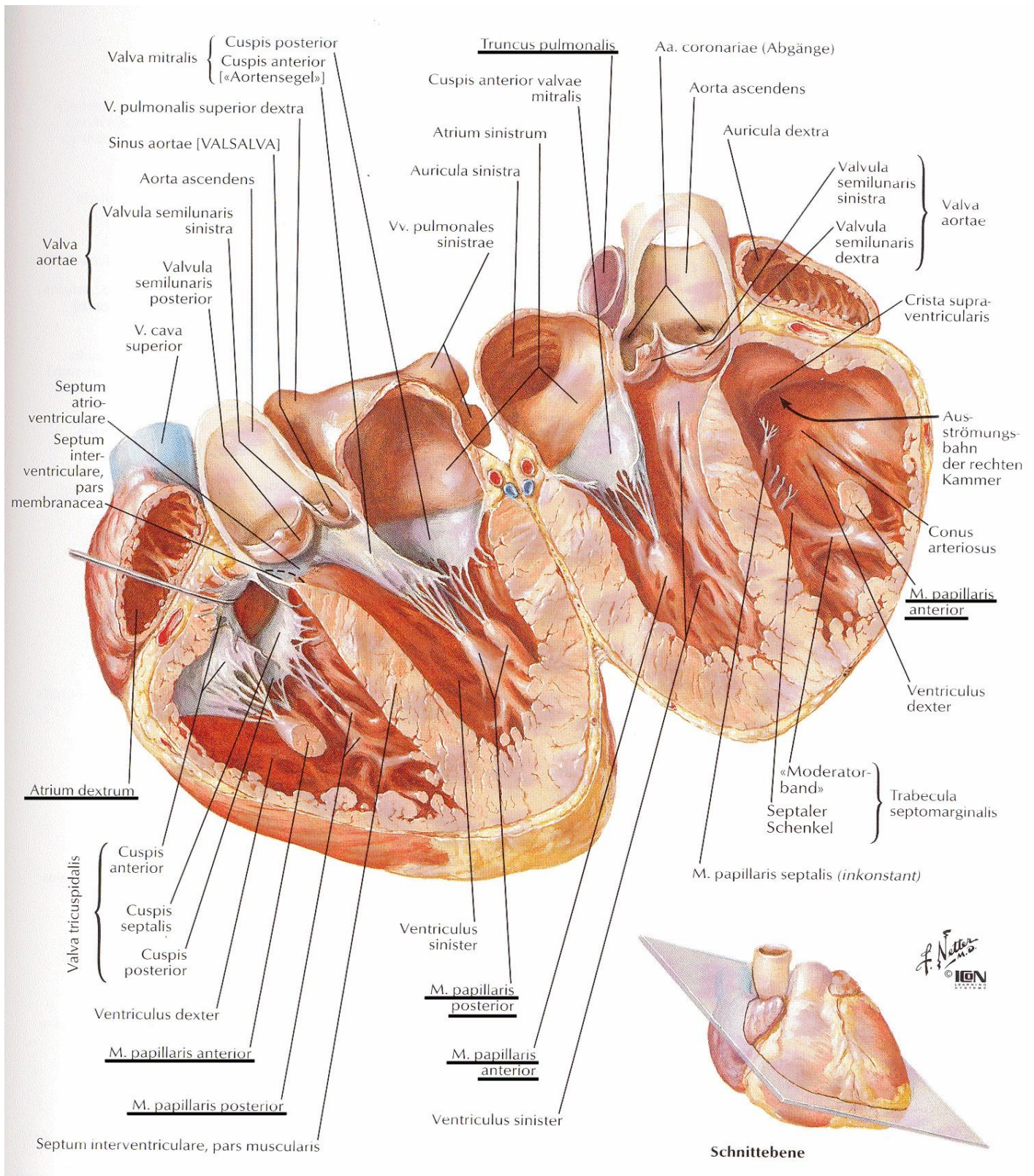


Abbildung 5: Anatomie des Herzens für das bessere Verständnis der Präparation

2.3.1. Isolierung des rechten Vorhofs (Atrium cordis dexter)

Das Herz wurde mit zwei Präpariernadeln am Korkboden in der Petrischale befestigt. Danach wurden das Lungengewebe und das überflüssige Fett unter dem Lichtmikroskop abgeschnitten.

Es wurde sehr vorsichtig gearbeitet, da der Sinusknoten, welcher der primäre Impulsgeber ist, schwer zu lokalisieren war und wir das Organ nicht beschädigen wollten. Denn die autonome Schlagtätigkeit des Herzens war für erfolgreiche Versuche von essentieller Bedeutung.

Es wurde mit Hilfe von zwei Präpariernadeln und zwei Fäden am Vorhof die Spitzen abgebunden. Um das Präparat in der Versuchsapparatur befestigen zu können, wurde ein Silberhäkchen durch einen Knoten gemacht. Danach wurde es von beiden Seiten an die Apparatur, welche mit 25 ml Tyrode befüllt und begast ist, angehängt.



Abbildung 6: fertiges Vorhofpräparat

2.3.2. Isolierung vom Papillarmuskel(Musculus papillaris)

Die Papillarmuskeln befinden sich in der rechten und linken Herzkammer. Nach der Entfernung des rechten Vorhofes, wurde ein feiner Schnitt entlang des Septums der rechten Kammer bis zur Herzspitze gemacht. Dadurch konnten die Papillarmuskeln erst sichtbar gemacht werden. Danach wurde versucht die Purkinjefasern zu entfernen. Sie sind der letzte Abschnitt der Erregungsleitungssystems des Herzens und können ebenfalls spontan depolarisieren und somit auch zur Erregungsbildung führen.

Durch diese Spontanaktivität hätten die Ergebnisse verfälscht werden können und daher wurden die Purkinjefasern entfernt. Es wurde ein Faden mit Silberhäkchen am Ansatz der Muskelsehne gebunden und dann die Sehne durchtrennt, wodurch danach vorsichtig der Muskel herausgeschnitten werden konnte. Die Präparate wurden in die begaste, mit Tyrode gefüllte Apparatur eingespannt.



Abbildung 7: fertiges Papillarmuskelpräparat

2.3.3. Isolierung des Darms (Ileum terminales)

Der Darm wird anatomisch in drei Abschnitte gegliedert und zwar in den Zwölffingerdarm (lat. Duodenum), Leerdarm (lat. Jejunum) und Dünndarm (lat. Ileum).

Für unsere Versuche wurde das terminale Ileum verwendet. Dafür wurde ein ca. 20 cm langes Stück herausgezogen und mit einem Faden abgebunden.

Dann wurde der Darm abgeschnitten und in die Nährstofflösung, die begast wird, gelegt. Für die Präparation wurde ein 0.5 cm langer Abschnitt schräg abgeschnitten und die Spitzen an der Petrischale mittels Präpariernadeln befestigt.

Es ist besonders wichtig, dass die Öffnungen des Darms offen bleiben, damit der Wirkstoff im Organbad durch die Öffnungen strömen kann. Wie bei dem Vorhof wurden bei dem Darm die Häkchen durch den Faden angebracht.



Abbildung 8: fertiges Darmpräparat

2.3.4. Isolierung der Aorta (Aorta descendens)

Die Aorta wurde am oberen Ende mit einer Pinzette erfasst und entlang der Wirbelsäule ein ungefähr 3 cm großes Stück herausgeschnitten.

Danach wurde die Aorta in einer Petrischale mit zwei Präpariernadeln befestigt und das umgebende Fett mit einer Federschere präzise herausgeschnitten, weil sich sonst lipophile Substanzen an das Fett angelagert hätten und die Ergebnisse verfälscht gewesen wären.



Abbildung 9: Aortaringe, die bereit zum Präparieren sind

Außerdem musste genau darauf geachtet werden, dass die Aorta nicht überdehnt wird.

Anschließend wurde die Aorta in kleine Stücke (0.3 cm) zerschnitten und in einer begasten Nährlösung aufbewahrt. Von diesen Stücken wird dann eines für den Versuch in die Apparatur, die begast und mit Nährstofflösung befüllt ist, ohne Einsatz von Präparierhäkchen eingespannt.

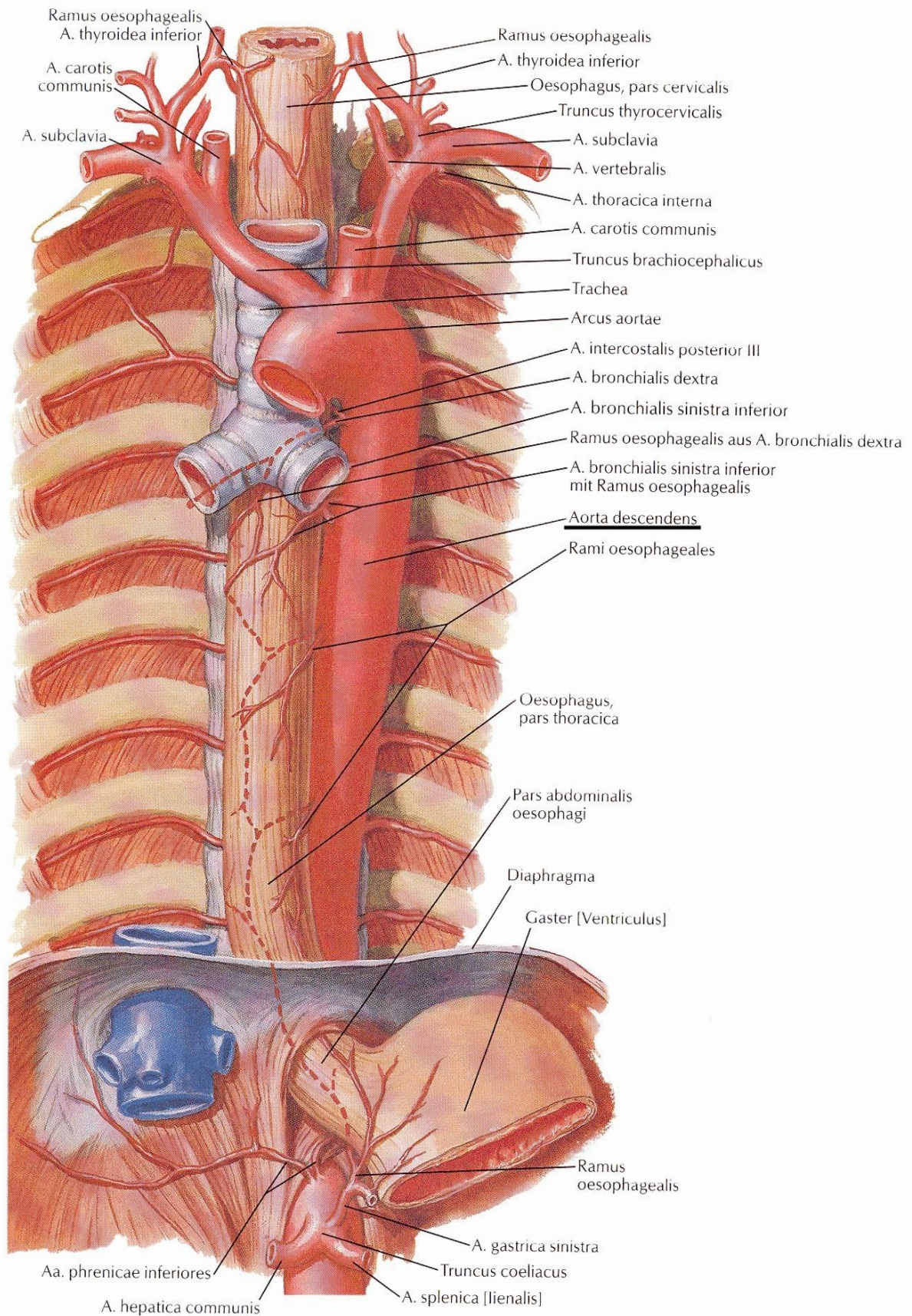


Abbildung 10: Anatomie der Aorta

2.3.5. Isolierung der Lungenarterie (Arteria pulmonalis)

Hier wurde für die Versuche der Truncus pulmonalis verwendet, der aus der rechten Herzkammer hervorgeht. Die Arteria pulmonalis sollte so nahe wie möglich vom Herz entnommen werden.

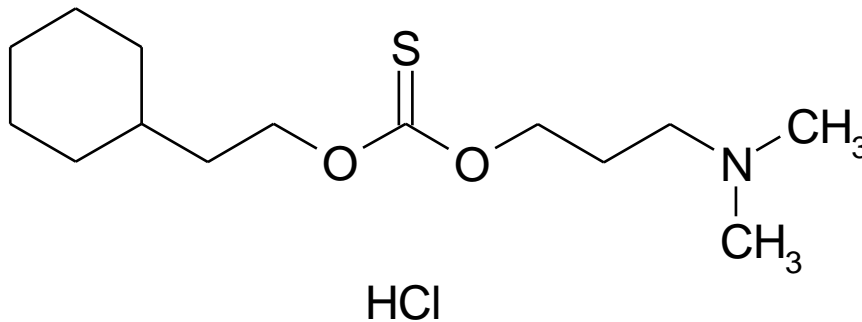
Es wurden pro Tag maximal zwei Präparate hergestellt, welche als kleine, ungefähr 0.3 cm große Ringe direkt ohne Silberhäkchen an die begaste, mit Tyrode befüllter Apparatur eingespannt werden konnten.



Abbildung 11: Fertige Arteria pulmonalis zum Präparieren bereit

2.4. Testsubstanz

Bei der ersten genauer untersuchten Substanz meiner Diplomarbeit handelt es sich um das vom Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie hergestellte Substanz MAH 27 HCL (MG: 309.9 g/mol).



2-Cyclohexylethyl (3'-dimethylaminopropoxy)methanthioat

Abbildung 12: chemische Struktur von MAH 27 HCl

Im zweiten Teil meiner Diplomarbeit wurde der Wirkungsmechanismus vom Glibenclamid am Ileum terminales genauer untersucht.

Glibenclamid zählt zu den Sulfonylharnstoffen und blockiert den ATP-abhängigen Kaliumkanal.

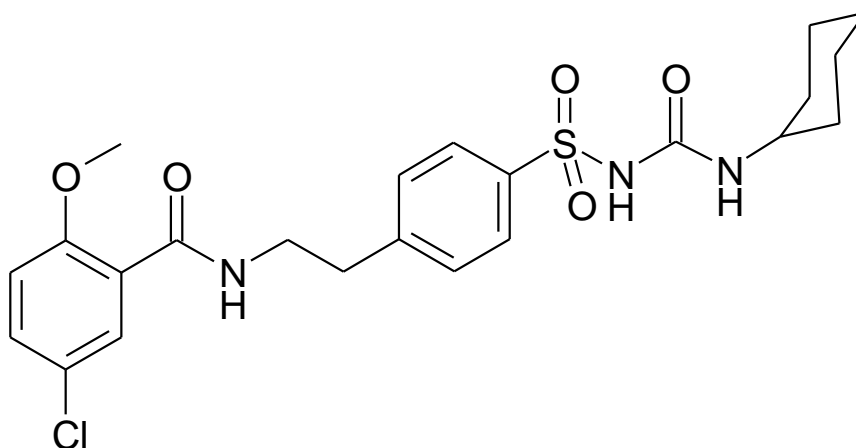


Abbildung 13: chemische Struktur vom Glibenclamid

2.5. Versuchsanordnung

Um den Erfolg der Versuche sicher zu stellen, wurden so gut es geht physiologische Umstände für die isolierten Organe geschaffen und zwar bezüglich der Temperatur, der Sauerstoffversorgung und dem pH- Wert.

Es gab für die Durchführung der Versuche zwei verschiedene Apparaturen.

Für die Versuche am Papillarmuskel wurde die Apparatur A verwendet, während für die anderen verwendeten Organe die Apparatur B herangezogen wurde.

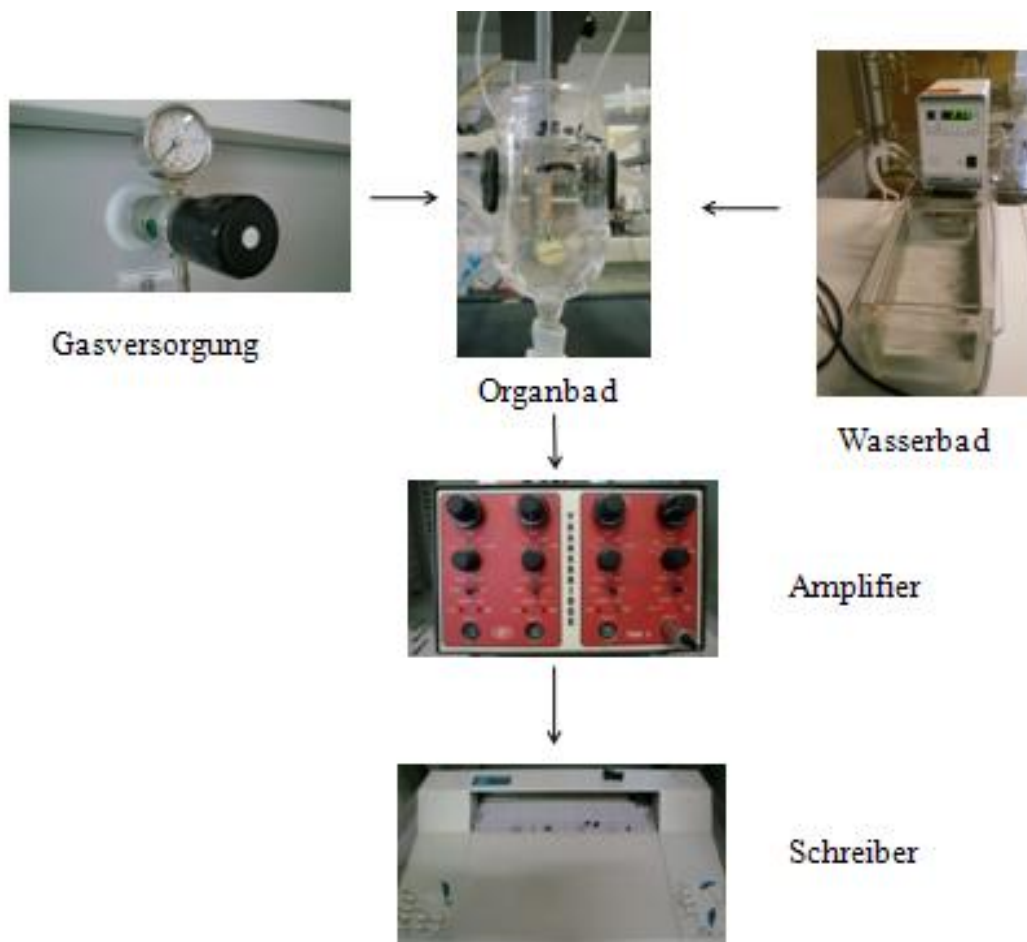


Abbildung 14: Aufbau der Apparaturen

2.5.1. Versuchsapparatur A

Die Apparatur A besteht aus einem Wasserbad und wurde für die Messung der Kontraktionskraft des Papillarmuskels verwendet. Die Temperatur vom Wasserbad wurde durch eine Heizspirale und durch einen Thermostat kontrolliert. Für die Versuche musste die Temperatur des Wasserbads bei ungefähr 35°C liegen.

Das Organbad wurde mithilfe einer Kunststoffspritze gereinigt, was bedeutet, dass die Nährlösung des Bades ausgetauscht worden ist.

Die Organhalterung aus Kunststoff war auf einem Stativ.

Das eigentliche Messinstrument war der „Kraftwandler“, der sich auch am Stativ befand.

Für die Durchführung des Versuches wurde der isolierte Papillarmuskel mit dem davor angebrachten Silberhäkchen an einem Silberdraht gehängt. Der Draht war die Verbindung zum Kraftwandler. Das freie Ende wurde danach durch ein kleines Metallplättchen mit einer Silber–Silberchloriddraht-Kathode verbunden und zwar durch einen Schraubmechanismus. Bei diesem Schritt war es sehr wichtig schnell zu arbeiten, dass es nicht zum Absterben der Organe durch zu wenig Sauerstoff kommen sollte.

Dazu musste noch darauf geachtet werden, dass der Papillarmuskel beim Einspannen nicht überdehnt wurde, da sonst die Resultate verfälscht werden konnten.

Danach konnte die ganze Apparatur ins Organbad gelassen werden. Hierbei musste man darauf schauen, dass das gesamte Organ in die Nährlösung getaucht wurde.

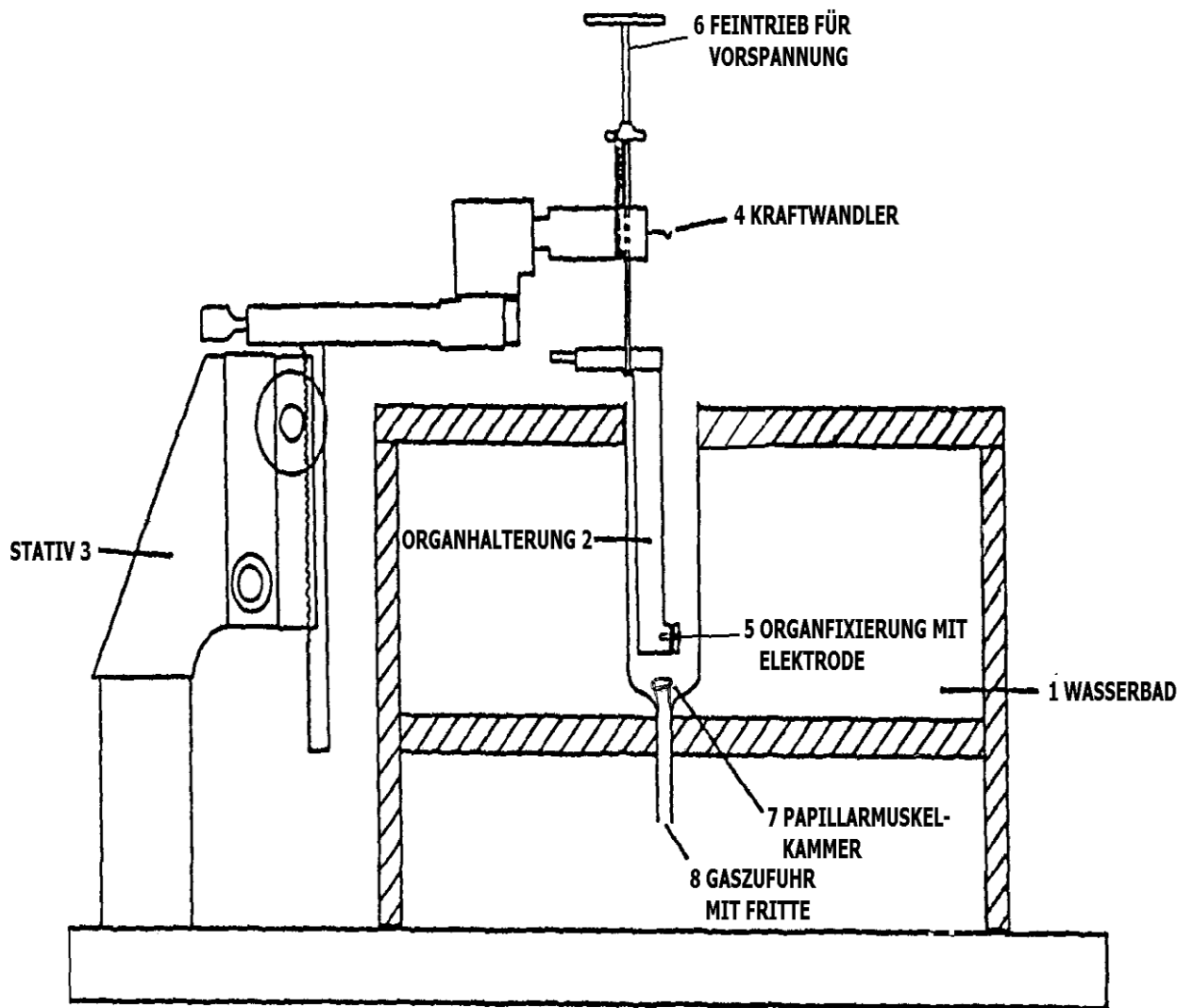


Abbildung 15a: Versuchsapparatur A schematisch

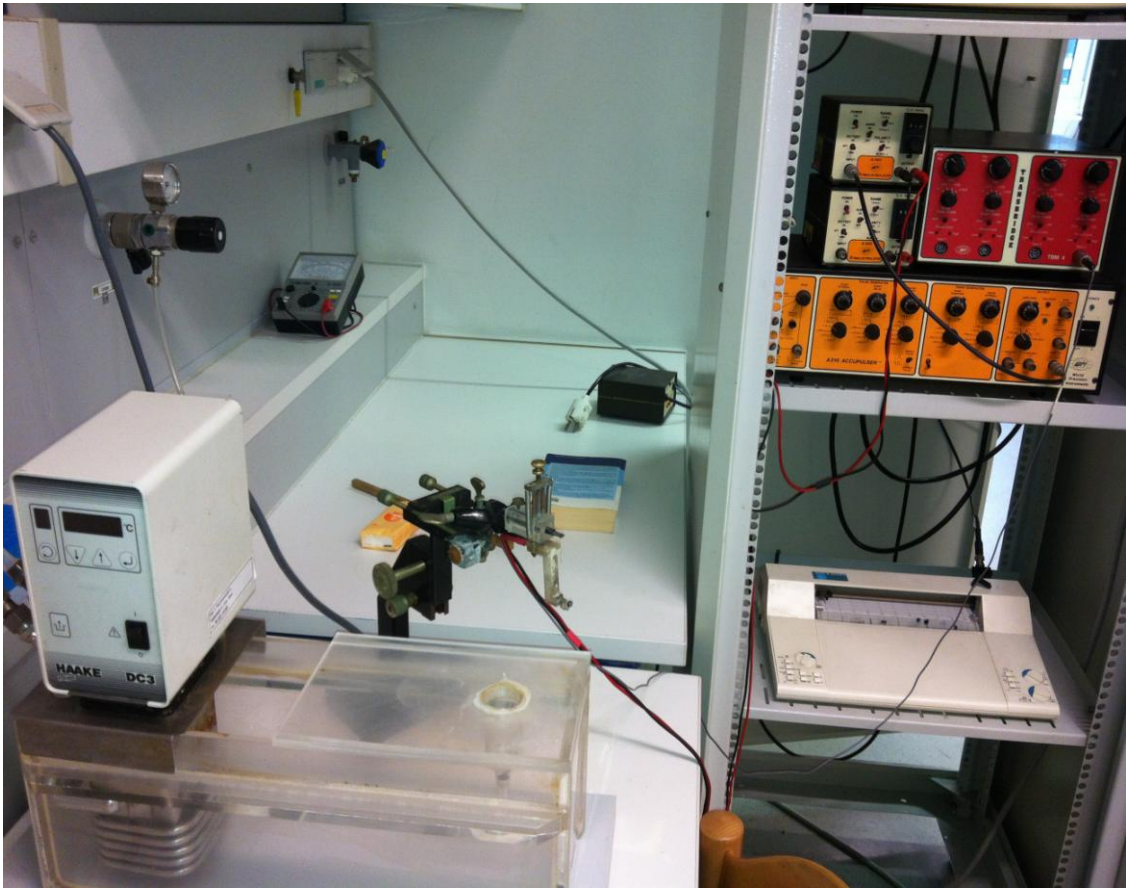


Abbildung 15b: Versuchsapparatur A

2.5.2. Versuchsapparatur B

Die Apparatur B besteht ebenfalls aus einem Organbad und wurde für die Testung von Vorhof, Aorta, Pulmonalarterie und Darm verwendet. Dieses Organbad besteht aus einem doppelwandigen Glaskörper, der für die Temperaturregulation wichtig ist. Außerdem unterscheidet sich die Apparatur B durch die Fixierungsmöglichkeit der Organe an der Organhalterung. Zur Befestigung wurden hier zwei Silberdrähte gebraucht. Einer davon war am Steg und der Zweite befand sich an der Aufhängevorrichtung des Kraftwandlers. Für die Reinigung vom Organbad, also für das Ablassen der Nährlösung, befand sich am Boden des Glaskörpers ein Abwasserschlauch.

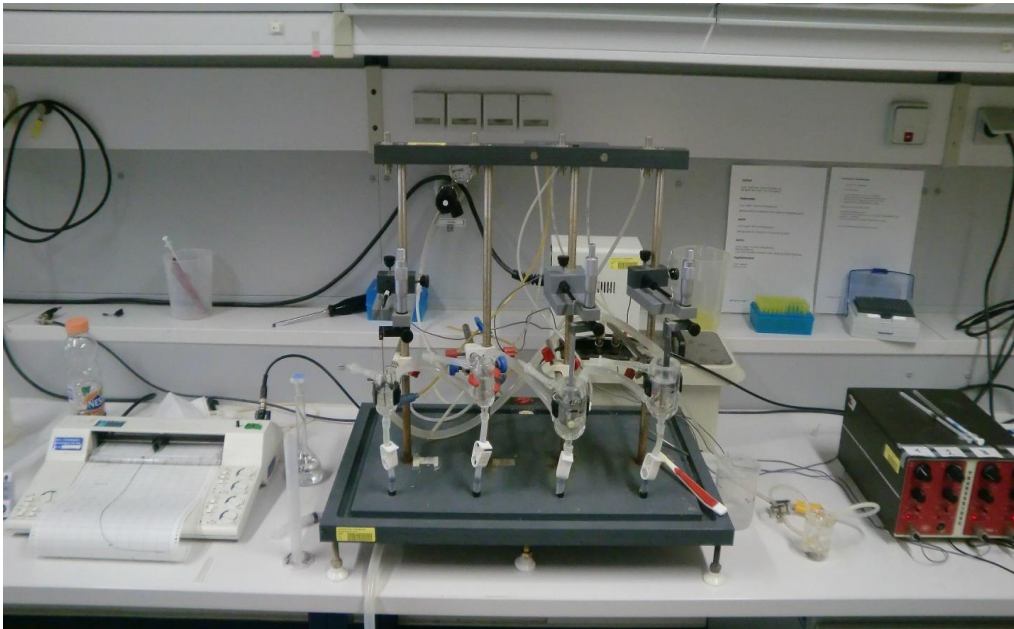
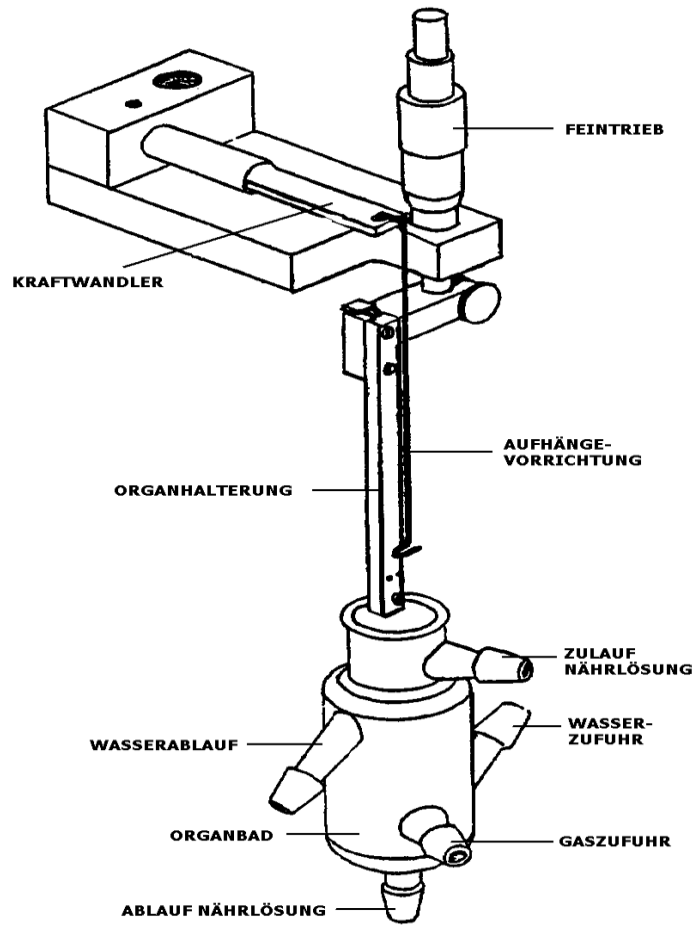


Abbildung 16: Apparatur B

2.5.3. Gaszufuhr

Die Gasversorgung der Apparaturen erfolgte durch Hilfe einer zentralen Gasflasche. Sie war wichtig vom Beginn der Herstellung der Tyrode bis zum Ende der Versuche. Die Gasversorgung ist wichtig für eine ausreichende Sauerstoffversorgung der isolierten Organe, für einen konstanten physiologischen pH-Wert und für eine homogene Verteilung der Testsubstanz in der Tyrode. Das Gas kam dann über Schläuche in die Apparaturen. Die Zufuhr des Gases wurde mithilfe von Schraubklemmen reguliert. Die Schraubklemmen befanden sich an den Schläuchen und sorgten dafür, dass weder zuviel noch zuwenig Gas vorhanden war. Das Gas wird auch als Oxymix (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid) bezeichnet.



Abbildung 17: Gashahn

2.5.4. Kraftwandler, Verstärker, Reizgerät, Schreiber

In beiden Apparaturen befand sich ein Kraftwandler (Transducer), der es uns ermöglichte, dass die Versuche überhaupt messbar wurden, weil er die mechanische Kraft, also die Kontraktion, in elektrische Impulse umwandelt.

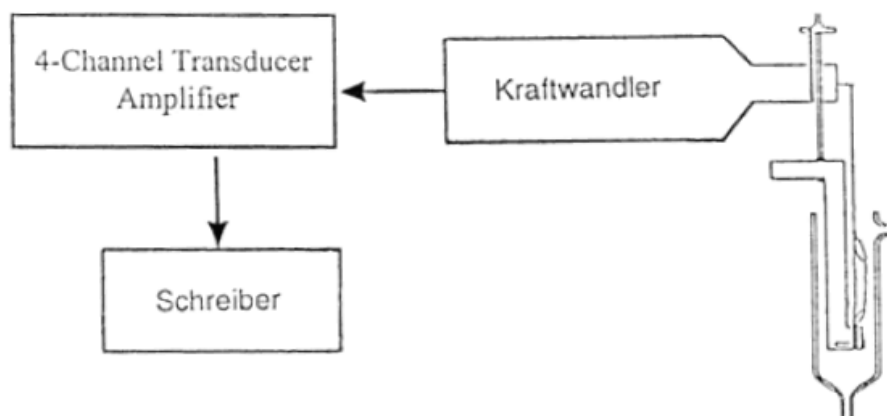


Abbildung 18: Kraftwandler

Der Transducer bestand aus einem Dehnungsstreifen, der bei Dehnung oder Kontraktion seinen elektrischen Widerstand änderte. Durch das Ohm'sche Gesetz ($I = U/R$), ändert sich bei einer gleichbleibenden Spannung die Stromstärke proportional zum Widerstand.

Durch einen Verstärker, dem Amplifier (4-Channel Transducer Amplifier; World Precisions Instruments), wurde die Änderung des Stromflusses, also das elektrische Signal, verstärkt.

Das sogenannte Reizgerät Accupulser A 310 (World Precision Instruments) war deshalb wichtig, da der Papillarmuskel im Gegensatz zum Vorhof nicht zur Spontanaktivität fähig ist. Daher musste er durch elektrische Reize zur Kontraktion angeregt werden.

Um die richtige Reizstärke herauszufinden, wurde die Frequenz so lange gesteigert, bis das verwendete Organ anfang eine Kontraktion zu anzuzeigen.

Für die Reproduzierbarkeit der Resultate wurde sichergestellt, dass der Muskel eine Kontraktion pro Sekunde durchführte.

Den letzten Schritt im Versuchsablauf, stellte der Schreiber (Flatbed Recorder BD-112 Dual Channel) dar. Durch ihn wurde das verstärkte Signal in Form von Kurven auf das Millimeterpapier notiert.

2.6. Versuchsablauf

Es war besonders wichtig darauf zu achten, dass die Apparaturen gesäubert wurden.

Am Vortag wurden die verwendeten Apparaturen mit einer 2%-igen Salzsäure gereinigt, damit Salze, die aus der Nährlösung auskristallisiert wurden, gründlich entfernt werden konnten.

Nach der Salzsäurebehandlung wurden die Apparaturen noch mehrmals mit Aqua bidestillata durchgespült. Zuletzt wurden noch am Anfang eines Versuchstages die Apparaturen mit frisch zubereiteter Tyrode gespült und befüllt. Die notwendige Gaszufuhr wurde durch eine Schraube geregelt.

Die Testsubstanzen wurden danach in folgenden Konzentrationsstufen 3; 10; 30; 100 $\mu\text{mol/l}$ kumulativ hinzugefügt.

2.6.1. Versuchsablauf beim rechten Vorhof (Atrium cordis dexter)

Der präparierte Vorhof wurde mit 2 Silberdrahthäkchen in die Versuchsapparatur B eingehängt und danach in das Organbad eingetaucht.

Es war wichtig, dass das Organ nicht zu fest gedehnt wurde, weil es ja durch den Feintrieb nochmals nachgespannt wurde. Außerdem durfte der Silberdraht nicht die Wände des Gefäßes berühren.



Abbildung 19: Versuchsapparatur mit eingespanntem Vorhof

Danach wurde der Schreiber eingeschaltet und durch das Zero-Drehrad auf die Nulllinie gestellt. Die angelegte Spannung betrug 5 mV und durch den Feintrieb wurde der Vorhof auf 10,4 mN vorgespannt. Durch den Schreiber wurden die am Herzen beobachteten Kontraktionen wesentlich deutlicher dargestellt. Während dem Vorspannen kann es sein, dass sich der Schreibstift von der Nulllinie bewegt und da es aber wichtig war für die Versuche, dass die Vorspannung aufrecht erhalten bleibt, wurde sie mittels Feintrieb auf die Nulllinie nachgestellt. Dadurch wurden für die präparierten Organe gleiche Versuchsbedingungen geschaffen, damit man auch reproduzierbare Ergebnisse erhalten kann. Der Vorhof brauchte ungefähr 45-60 Minuten bis die Schlagfrequenz eine konstante Anzahl an Schlägen pro Zeiteinheit zeigte. Die Ausschläge wurden alle 5 Minuten über eine Länge von 6 cm am Millimeterpapier aufgezeichnet. Als eine konstante Chronotropie herrschte, wurde die Testsubstanz dazugegeben. Die entsprechenden Konzentrationen wurden dann alle 45 Minuten nach einem Pipettierschema hinzugegeben. Durch das Einspritzen startete die Kontrollphase und nun wurde bis zum Versuchsende alle 5 min eine Messung durchgeführt, indem die Ausschläge über eine Länge von 6 cm aufgezeichnet wurden. Das Versuchsende wurde erreicht, wenn entweder der Vorhof nicht mehr schlug oder eine Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ erreicht wurde.



Abbildung 20: Dokumentation der Schlagfrequenz vom Vorhof durch den Schreiber

2.6.2. Versuchsablauf bei Papillarmuskel (Musculus papillaris)

Das isolierte Organ wurde an die Versuchsvorrichtung A angebracht und in das auf 35°C warme Organbad eingetaucht. Die Stromstärke betrug 5 mV (bei Bedarf 2 oder 1 mV) und die Geschwindigkeit war auf 5mm/sec eingestellt. Durch den Feintrieb wurde der Papillarmuskel auf 3.92 mN vorgespannt. Da er im Gegensatz zum Vorhof keine Spontanaktivität besitzt, wurde der Papillarmuskel mittels elektrischer Reizung zur Kontraktion gebracht. Hier war das Nachstellen des Schreibstiftes genauso notwendig wie oben beschrieben. Nach einer Anpassungsphase begann man mit der Kontrolle. Dafür wurden mit dem Schreiber alle 5 Minuten mindestens 6 Kontraktionsamplituden aufgezeichnet.

Sobald diese konstant waren, konnte mit der Zugabe der Testsubstanz begonnen werden. Die Substanz wurde ebenfalls alle 45 Minuten dazugegeben und es wurde auch alle 5 Minuten die Zackenlinien gemessen.

2.6.3. Versuchsablauf bei Ileum terminales

Das bereits präparierte Organ wurde mit den Silberdrahthäkchen an die Apparatur B angebracht und wurde anschließend in die Tyrodelösung eingetaucht. Der Schreiber wurde eingeschaltet und auf den Nullpunkt gedreht. Mittels Feintrieb wurde wieder bei 4.9 mN vorgespannt und die Stromstärke betrug 5 mV.

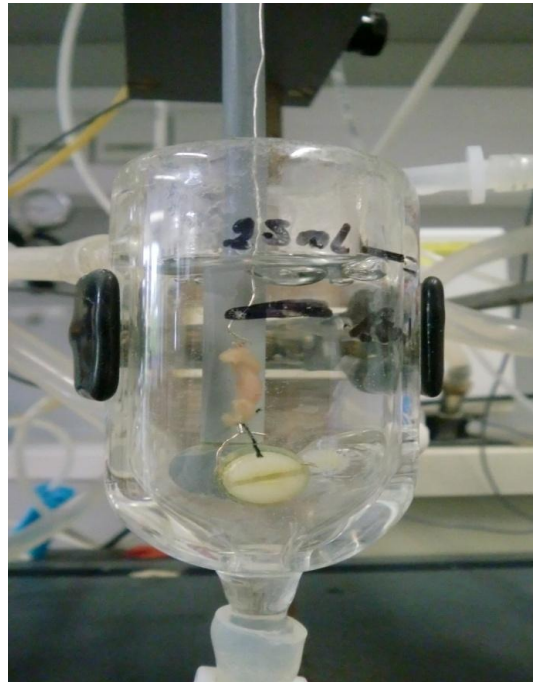


Abbildung 21: Darmpräparat, welches im Organbad befestigt ist

Nach einer 20 minütigen Anpassungsphase wurde die Nulllinie wieder nachjustiert. Danach wurde die Nährlösung abgelassen und durch Kaliumchloridlösung ersetzt. KCl lässt den Darm maximal kontrahieren und die experimentell ermittelte KCl-Konzentration betrug 60 mmol (EW=0.44 g KCl/100 ml Tyrode). Es kam zu einem sofortigen Ausschlag der Kontraktionskurve, die sich aber nach kurzer Zeit wieder langsam erholte. Nach ungefähr einer Stunde stellte sich die Plateauphase ein und nun konnte die in DMSO-gelöste Testsubstanz dazugeben werden.

2.6.4. Versuchsablauf bei Aorta

Der Aortenring wurde direkt in die Apparatur B eingehängt und dann in das mit Tyrode aufgefüllte Organbad eingetaucht. Die Aorta durfte nicht überdehnt werden. Der Schreiber wurde eingeschaltet und die Spannung betrug 10 mV. Danach wurde der Schreiber auf den Nullpunkt gedreht und durch den Feintrieb auf 19.4 mN vorgespannt.

Nach einer Anpassungszeit von 20 min wurde auf 5 mV umgeschaltet und der Schreiber wieder auf den Nullpunkt gestellt. Danach wurde am Schreiber durch „Pen down“ und „Record on“ mit den Aufzeichnungen angefangen. Wie die Pulmonalarterie braucht auch die Aorta eine 90 mmolare Kaliumchloridlösung (EW= 0.67 g KCl/ 100 ml Tyrode) für die maximale Kontraktion.

Daher wurde die Nährlösung abgelassen und eine 90 mmolare KCl-Lösung dazugegeben. Nach dem Erreichen der Plateauphase wurde in einem Intervall von 45 Minuten mit dem Einspritzen der Testlösung angefangen. Eine mögliche Gefäß-dilatierende Wirkung wurde durch das Aufzeichnen der Kontraktionskurve dokumentiert.

2.6.5. Versuchsablauf bei Arteria pulmonalis

Das Präparat wurde zunächst in die Apparatur B eingehängt und danach in das mit Tyrode befüllte und begaste Organbad abgesenkt. Das isolierte Präparat sollte komplett mit Nährlösung bedeckt sein.

Der Schreiber wurde eingeschaltet und seine Spitze auf die Nulllinie gestellt. Danach wurde der Verstärker aktiviert, was den Schreiber wiederum ein bisschen verstellte und man ihn deshalb wieder auf null nachdrehen musste. Durch den Feintrieb wurde auf 9.81 mV vorgespannt und dadurch durfte der Schreiber wieder auf die Nulllinie gebracht werden.

Es erfolgte eine ungefähr 20 Minuten lange Anpassungsphase.

Es wurde hier genauso wie bei der Aorta eine 90 mmolare KCl-Lösung für die maximale Kontraktion gebraucht. Also wurde die Tyrode abgelassen und das Organbad mit KCl-Lösung befüllt. Die darauf resultierende Kontraktion wurde mithilfe vom Schreiber registriert.

Sobald die Plateauphase erreicht wurde, durfte die Testlösung im 45 Minuten-Intervall dazugegeben werden. Der genaue Zeitpunkt der jeweiligen Testsubstanzzugabe wurde mit einem Stift am Millimeterpapier gekennzeichnet.

Es wurde genau darauf geachtet, dass beim Dazugeben der Testsubstanz die Organhalterung nicht berührt wurde, weil sonst der Stift verschoben werden würde.

2.7. *Bereitung der Stammlösungen*

Da die zu untersuchende Testsubstanz wasserlöslich war, wurde sie in Wasser badestillata gelöst.

2.7.1. Stammlösung der Testsubstanz

Die Stammlösung, das aus Wasser und der Testsubstanz bestand, wurde täglich frisch hergestellt. Außerdem musste beim Einwiegen der Substanz darauf geachtet werden, ob der Versuch in einem 8 ml – oder 25 ml-Organbad durchgeführt wurde.

Stammlösung	Organbad	Einwaage der Substanz
MAH 27 HCL	25ml	0,77mg
MAH 27 HCL	8ml	0,24mg

Abbildung 22: Tabelle der Stammlösungen

Das genaue Gewicht der Testsubstanz wurde über die molare Masse ermittelt. Die danach abgewogene Menge wurde in 100 μl Wasser gelöst.

Während den Versuchen wurde die Stammlösung, die unterschiedliche Konzentrationen hatte, mithilfe der Kolbenhubpipette dazugegeben (Pipettierschema).

Das Einspritzen der Testsubstanz geschah immer nach Erreichen des „steady state“ (Plateauphase) im Abstand von 45 Minuten und beim Einspritzen durfte der Kraftwandler nicht berührt werden.

Zugeführtes Volumen	Gesamtkonzentration im Organbad
3 μl	3 $\mu\text{mol/l}$
7 μl	10 $\mu\text{mol/l}$
20 μl	30 $\mu\text{mol/l}$
70 μl	100 $\mu\text{mol/l}$

Abbildung 23: Pipettierschema

2.8. Statistik

Für die genaue Berechnung des Standardfehlers der Mittelwerte und des arithmetischen Mittel haben wir das „Sigma Plot 9.0“-Programm verwendet.

Mithilfe der Konzentrations-Wirkungskurve wurden die Werte als Graph dargestellt, wobei nur bei den stark wirksamen Substanzen ein EC_{50} Wert ermittelt wurde.

Als letztes wurde für gepaarte Beobachtungen ein Signifikanztest („Student-t-Test“) durchgeführt. Die Messergebnisse wurden dann als signifikant bezeichnet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% ($P < 0,05$) oder sogar kleiner als 1% ($P < 0,01$) betrug. Die Ergebnisse, die eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 0,1% ($P < 0,001$) hatten, wurden als hochsignifikant angegeben.

3. Ergebnisse

Die Versuchsergebnisse der jeweiligen Testsubstanzen an den isolierten Organen der Meerschweinchen wurden hier anhand von Tabellen und Konzentrations-Wirkungs-Kurven ausgewertet.

Um ein repräsentatives und reproduzierbares Ergebnis gewährleisten zu können, wurden pro Organ mindestens 4 Versuche durchgeführt.

Für die Überprüfung des Wirkmechanismus (mit Glibenclamid) mussten mindestens 3 Versuche bei den jeweiligen Konzentrationen (30; 100 $\mu\text{mol/l}$) an einem ausgewählten Organ (Ileum terminales) stattfinden.

3.1. Wirkung von MAH 27 HCl auf das terminale Ileum

Insgesamt wurden 4 Versuche durchgeführt und der genaue Ablauf wurde bereits oben erwähnt. Zuerst wurde KCl-Lösung dazugegeben um eine Vorkontraktion zu erzielen. Die Konzentrationen der Testsubstanz betragen 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ und sie wurden in einem Abstand von 45 Minuten dazugegeben.

MAH 27 HCl	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl d.Versuche (N)	Irrtumswahr- scheinlichkeit (P)
0 (Kontrolle)	14,51 ± 0,98	0 ± 0	4	-----
3	12,52 ± 0,78	-13,57 ± 1,99	4	0,05
10	9,60 ± 1,44	-37,02 ± 4,01	4	0,01
30	0,85 ± 0,51	-94,16 ± 3,39	4	0,001

Abbildung 24 : Wirkung von MAH 27 HCl auf das terminale Ileum

Die Tabelle soll die Mittelwerte der Kontraktionskraft (f_c) und deren Standardfehler (SEM) veranschaulichen, wobei der Standardfehler sowohl in Prozent als auch in mN angegeben wurde. Dazu wurden noch die Irrtumswahrscheinlichkeit und die Versuchsanzahl dokumentiert.

Nachdem die erste Konzentration der Testsubstanz dazugegeben wurde, lag der Mittelwert der Kontraktionskraft bei $14,51 \pm 0,98$ mN und dieser Wert entspricht 100%.

Die ersten beiden Konzentrationen ($3\mu\text{mol/l}$; $10\mu\text{mol/l}$) zeigten eine leichte Abnahme der Kontraktionskraft, während es bei der dritten Konzentration ($30\mu\text{mol/l}$) zu einer signifikante Abnahme gekommen ist, die nur noch bei $0,85 \pm 0,51$ mN lag.

Daher wurde die letzte Konzentration ($100\mu\text{mol/l}$) gar nicht mehr dazupipettiert, weil das Ileum schon bei $30\mu\text{mol/l}$ abgestorben war.

TERMINALES ILEUM

$$EC_{50} = 13 \mu\text{mol/l}$$

n = 4, MAH 27 HCL

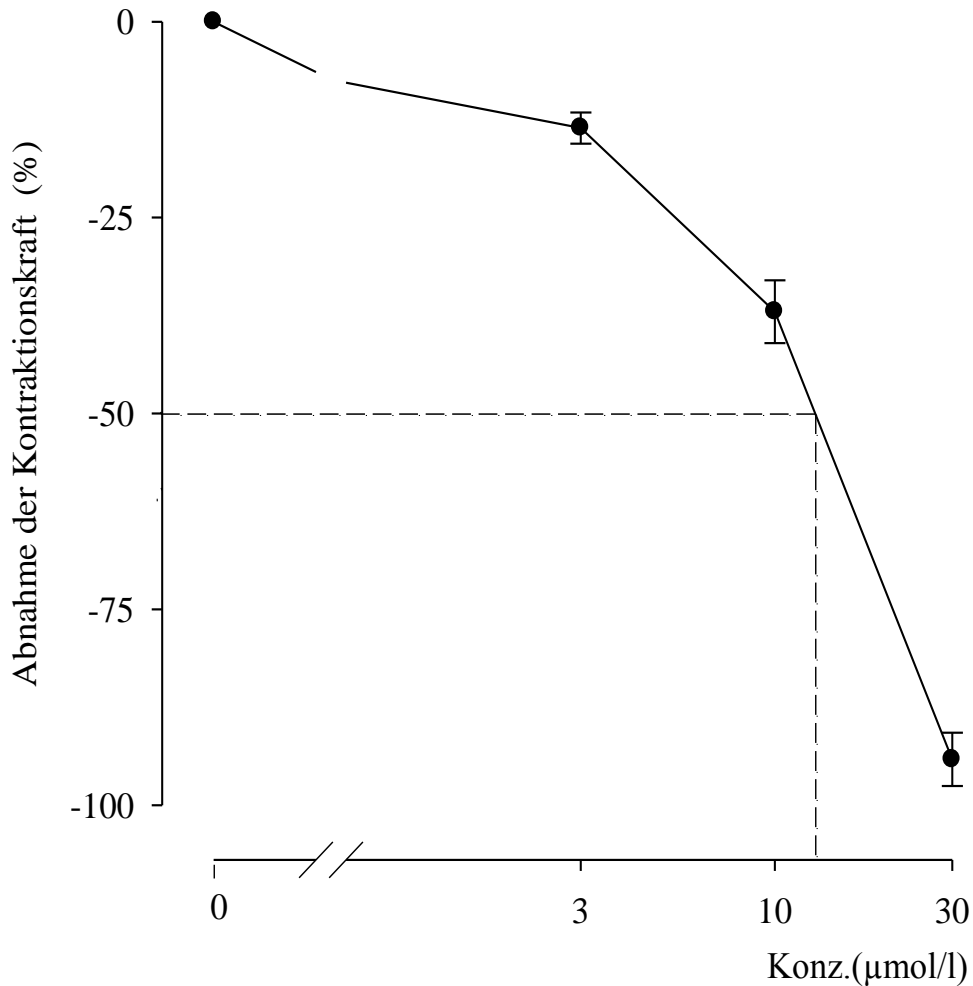


Abbildung 25: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH 27 HCL am terminalen Ileum

Diese Kurve soll die Abnahme der Kontraktionskraft darstellen und zwar bei den unterschiedlichen Konzentrationen vom MAH 27 HCL.

Während auf der Ordinate die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent angegeben ist, steht auf der Abszisse die jeweilige Konzentration in µmol/l.

Anhand der Kurve erkennt man, dass die Abnahme der Kontraktionskraft deutlich zu sehen ist und dass hier der EC_{50} -Wert bei 13 µmol/l liegt. Durch die Länge der Balken werden die Standardfehler gezeigt

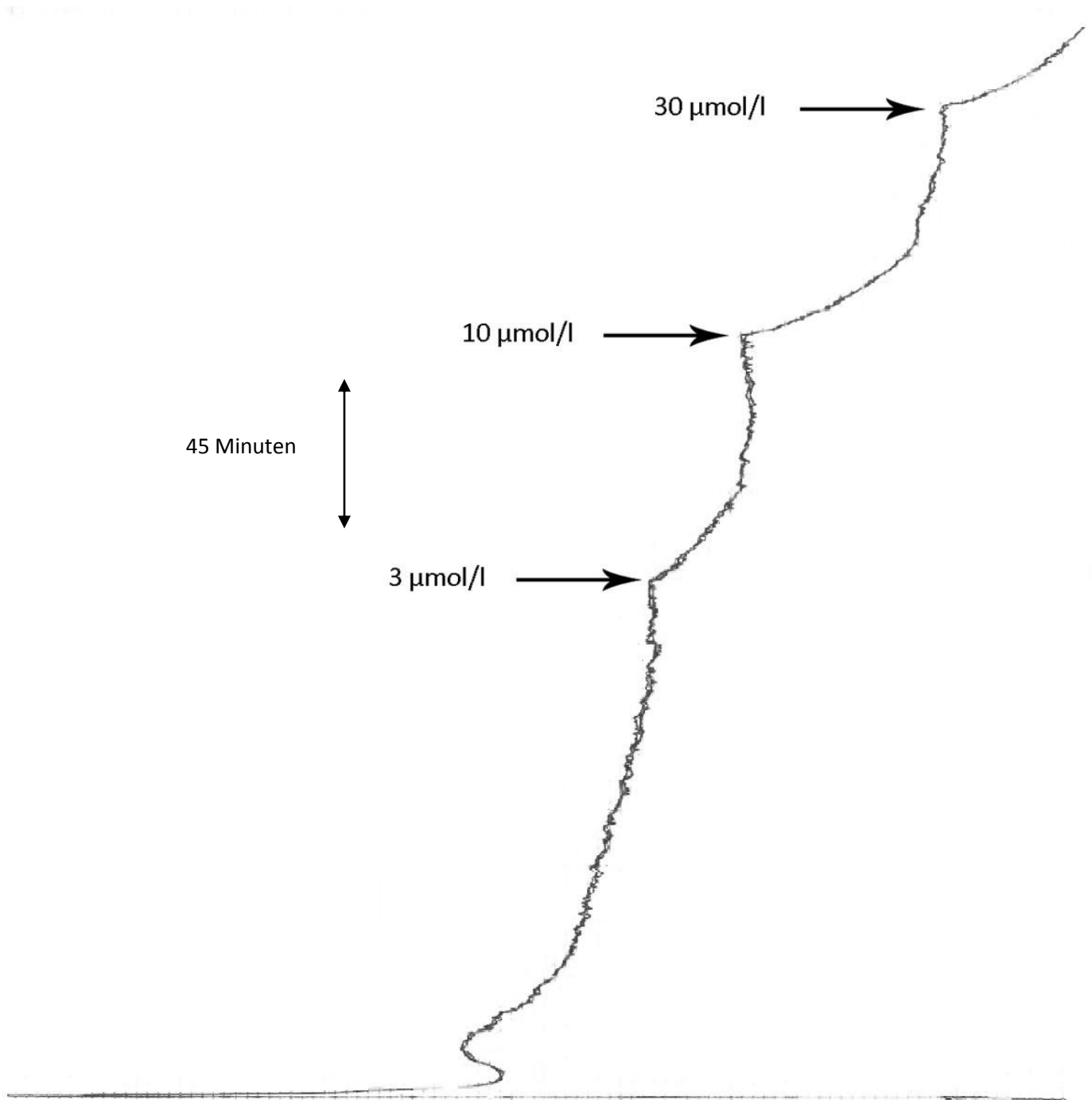


Abbildung 26: Originalaufzeichnung von MAH 27 HCl am terminalen Ileum

Diese Kurve erklärt wie durch das Dazugeben der verschiedenen Konzentrationen die Kontraktionskraft abnimmt, wobei die größte Abnahme bei der Konzentration von 30 μmol/l zu sehen ist.

3.2. Wirkung von MAH 27 HCl auf die Aorta

Für die Untersuchung von MAH 27 HCL auf die Kontraktionskraft der Aorta wurden ebenfalls 4 Versuche durchgeführt. Außerdem wurde wieder wie oben erwähnt eine Vorkontraktion mittels KCl-Lösung angeregt. Nach dem Konstant werden der Vorkontraktion wurden wieder die jeweiligen Konzentrationen (siehe oben) alle 45 Minuten hinzugefügt.

MAH 27 HCL	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl d. Versuche	Irrtumswahr- scheinlichkeit (P)
0(Kontrolle)	8,58 ± 0,81	0 ± 0	4	-----
3	8,16 ± 0,59	-5,22 ± 1,75	4	n.s.
10	7,11 ± 0,51	-16,59 ± 3,10	4	0,05
30	5,20 ± 0,37	-38,43 ± 5,85	4	0,01
100	3,31 ± 0,55	-61,64 ± 5,43	4	0,001

Abbildung 27: Wirkung von MAH 27 HCl auf die Aorta

Die Tabelle zeigt die Testsubstanz mit den verschiedenen Konzentrationen und die Änderung der Kontraktionskraft (in mN und % angegeben). Dazu wurden noch die Irrtumswahrscheinlichkeit und die Anzahl der Versuche abgeführt. Zum Beginn des Versuches, lag die Kontraktionskraft bei 8,58 ± 0,81 mN. Bei der Zugabe der Testsubstanz gab es zu Beginn kaum eine deutliche Veränderung der Kontraktionskraft. Zu einer signifikanteren Abnahme (5,20 ± 0,37 mN) kam es erst bei der Zugabe von 30 µmol/l. Durch die Konzentration von 100 µmol/l wurde dann die stärkste Abnahme beobachtet, wobei der Wert bei 3,31 ± 0,55 mN lag.

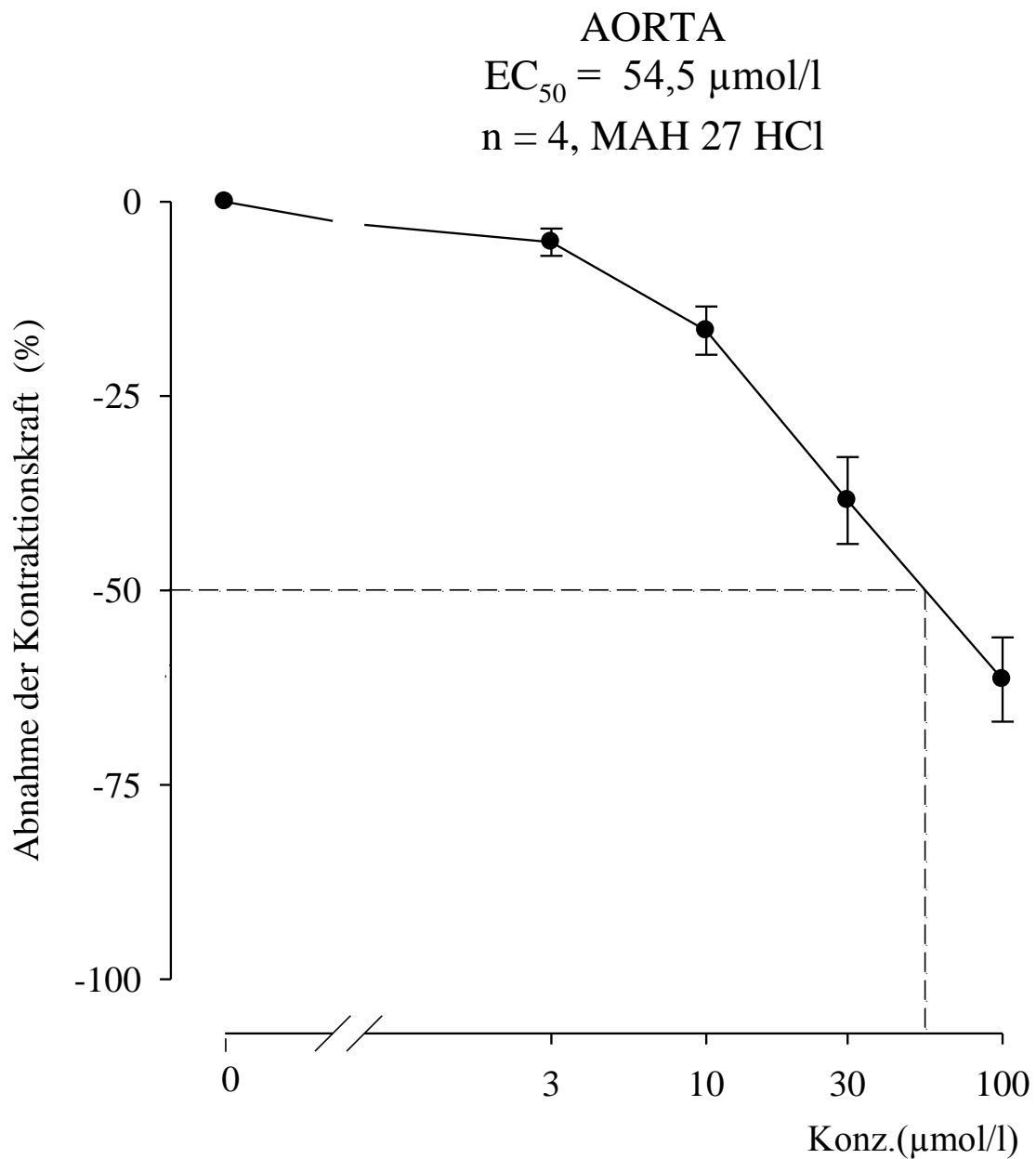


Abbildung 28: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH 27 HCL an der Aorta

Dieser Graph zeigt, dass die Kontraktionskraft am Anfang des Versuches nicht sehr stark abgenommen hat. Erst ab einer Konzentration von $3 \mu\text{mol/l}$ wird eine deutliche Abnahme der Kontraktionskraft bemerkt. Hier beträgt der EC_{50} -Wert $54.5 \mu\text{mol/l}$.

Die senkrechten Balken sollen den Standardfehler zeigen.

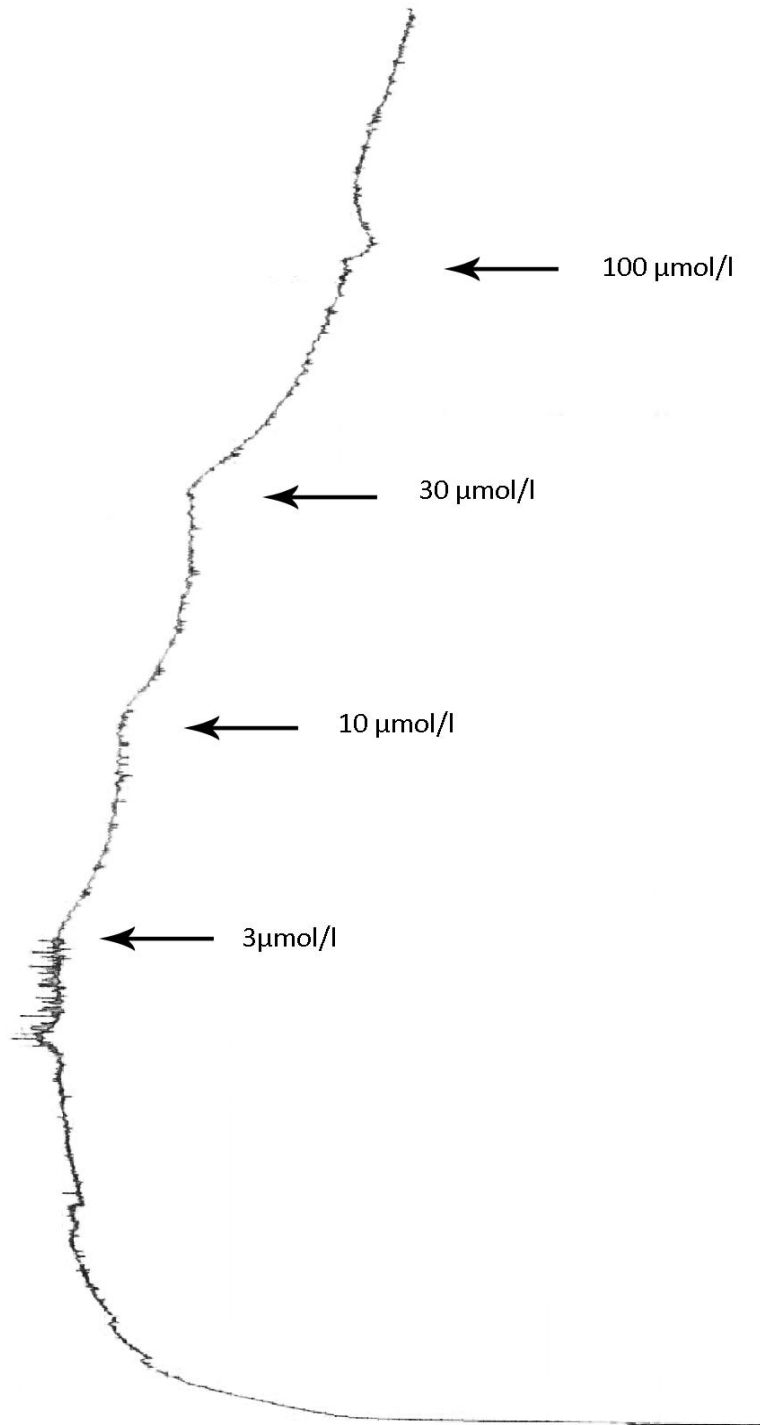


Abbildung 29: Originalaufzeichnung von MAH 27 HCl an der Aorta

Anhand der Kurve sieht man, dass es zuerst zu keiner deutlichen Abnahme gekommen ist und dass es erst durch das Hinzupipettieren von einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ zu einer stärkeren Abnahme kam.

3.3. Wirkung von MAH 27 HCl auf die Arteria pulmonalis

Auch hier wurde für die Untersuchung der Testsubstanz wieder KCl-Lösung für eine Vorkontraktion verwendet (wie oben erwähnt). Außerdem wurde wieder auf die Plateauphase gewartet, um dann die Substanz mit den entsprechenden Konzentrationen (siehe oben) alle 45 Minuten dazu zu geben.

MAH 27 HCL	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl d.Versuche	Irrtumswahr- scheinlichkeit (P)
0(Kontrolle)	13,37 ± 1,74	0 ± 0	4	-----
3	12,06 ± 1,70	-2,55 ± 1,18	4	n.s.
10	11,32 ± 1,76	-9,39 ± 2,44	4	n.s.
30	8,41 ± 1,59	-33,5 ± 6,14	4	0,05
100	5,0 ± 1,17	-60,96 ± 6,45	4	0,01

Abbildung 30 : Wirkung von MAH 27 HCl auf die Arteria pulmonalis

Die Tabelle soll die verwendeten Konzentrationen der Testsubstanz und die Mittelwerte der Kontraktionskraft zeigen. Dazu sind noch die Versuchsanzahl und Irrtumswahrscheinlichkeit angegeben. Am Anfang des Versuches lag die Kontraktionskraft bei 13,37 ± 1,74 mN. Bei den ersten beiden Konzentrationen (3 µmol/l; 10 µmol/l) gab es keine deutliche Abnahme. Erst bei der Konzentration von 30 µmol/l kam es zu einer stärkeren Abnahme (8,41 ± 1,59 mN). Die größte Abnahme der Kontraktionskraft wurde bei der letzten Konzentration von 100 µmol/l beobachtet. Die Kontraktionskraft betrug nun nur noch 5,0 ± 1,17 mN.

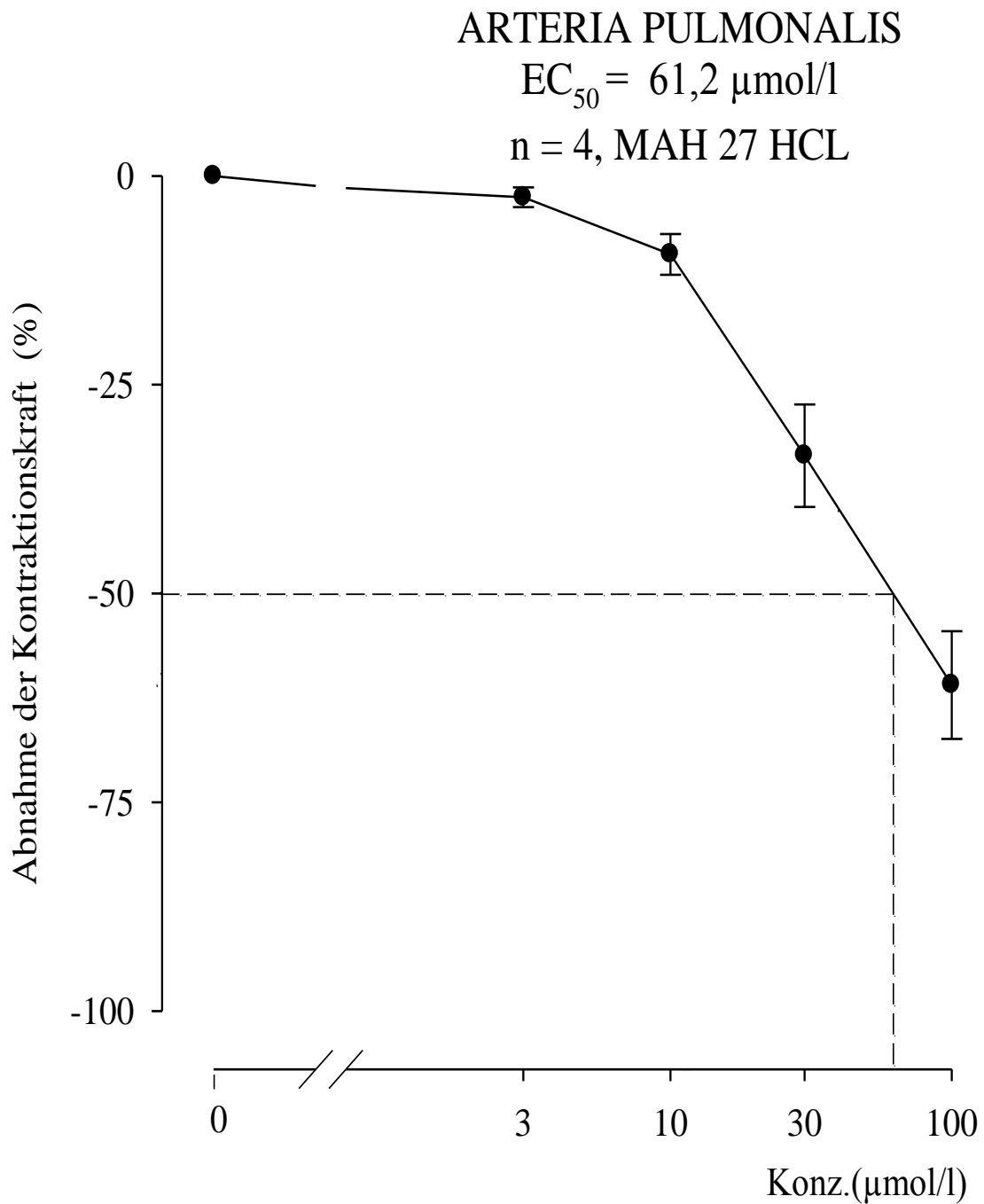


Abbildung 31: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von MAH 27 HCL an der isolierten Arteria pulmonalis

Diese Grafik soll die Abnahme der Kontraktionskraft darstellen. Auf der Ordinate (y-Achse) sieht man die Kontraktionskraft in Prozent und auf der Abszisse (x-Achse) die unterschiedlichen Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$. Der EC_{50} - Wert ist hier bei $61.2 \mu\text{mol/l}$.

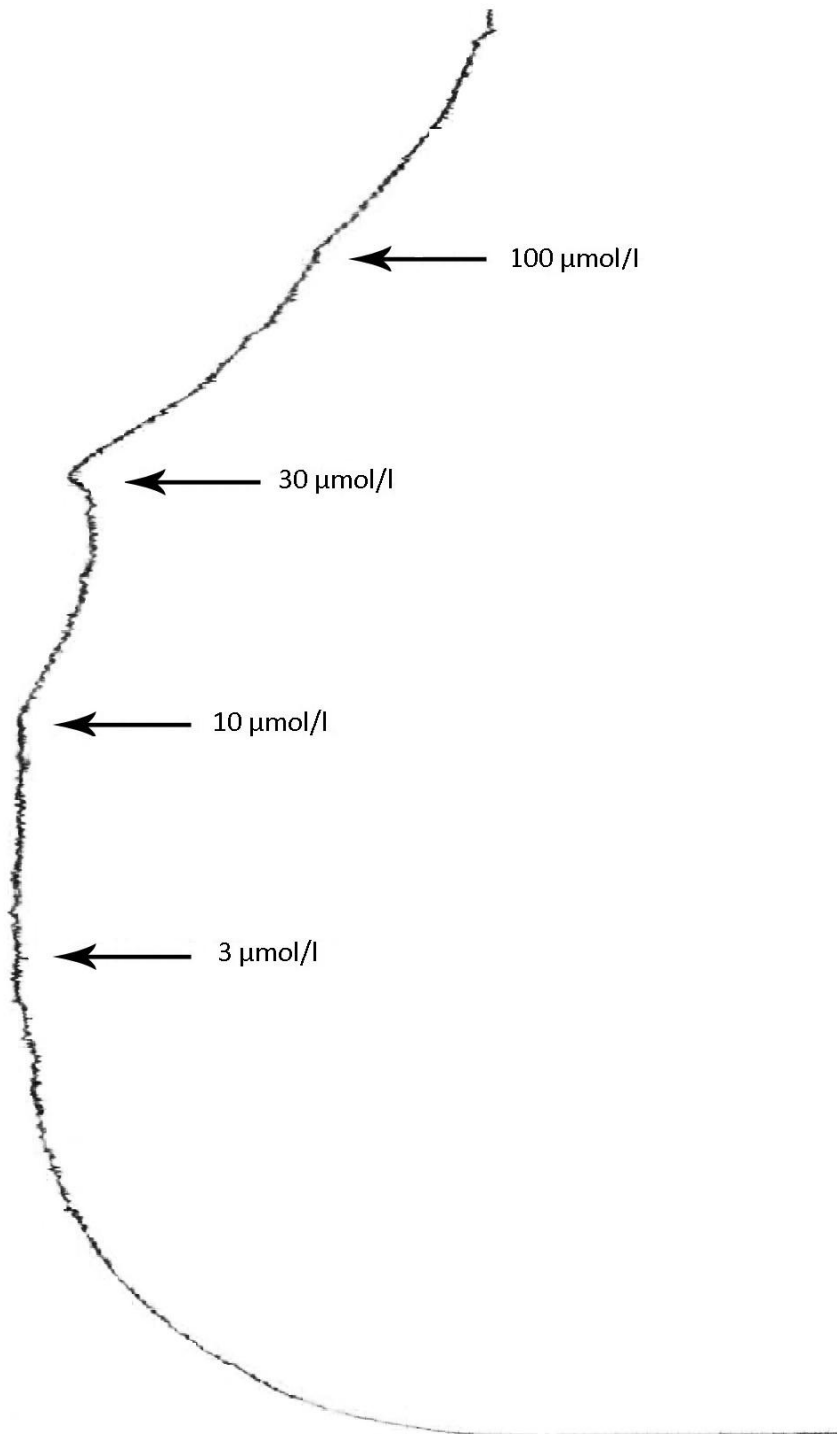


Abbildung 32 : Originalaufzeichnung von MAH 27 HCl an der Arteria pulmonalis

Die Kurve zeigt, dass es erst bei einer Konzentration von 30 μmol/l und 100 μmol/l zu einem Anstieg gekommen ist. Davor gab es keine signifikante Abnahme der Kontraktionskraft.

3.4. Wirkung von MAH 27 HCl auf den Papillarmuskel

Die Testsubstanz wurde hier auch mittels 4 Versuchen am isolierten Papillarmuskel getestet. Hier erfolgte die Kontraktion jedoch durch eine elektrische Reizung. Es wurde nach dem Konstant werden der Vorkontraktion die jeweiligen Konzentrationen (siehe oben) alle 45 Minuten hinzugegeben.

MAH 27 HCL	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl d. Versuche	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
0(Kontrolle)	1,53 ± 0,23	0±0	4	-----
3	1,32 ± 0,22	-14,49 ± 2,89	4	0,05
10	0,79 ± 0,15	-49,62 ± 2,96	4	0,01
30	0,29 ± 0,06	-80,78 ± 4,11	4	0,001
100	0,05 ± 0,03	-96,45 ± 2,21	4	0,001

Abbildung 33: Wirkung von MAH 27 HCl auf isolierte Papillarmuskel

In der Tabelle sieht man die unterschiedlichen Konzentrationen, Änderung der Inotropie (in mN und % angeführt), Anzahl der Versuche und die Irrtumswahrscheinlichkeit.

In der Kontrollphase lag die Kontraktionskraft bei $1,53 \pm 0,23$ mN.

Die danach dazugegebenen Konzentrationen zeigten eine Abnahme der Inotropie. Am Ende (Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$) lag der Wert der Inotropie nur noch bei $0,05 \pm 0,03$ mN.

PAPILLARMUSKEL
n = 4, MAH 27 HCl
EC₅₀ = 10 µmol/l

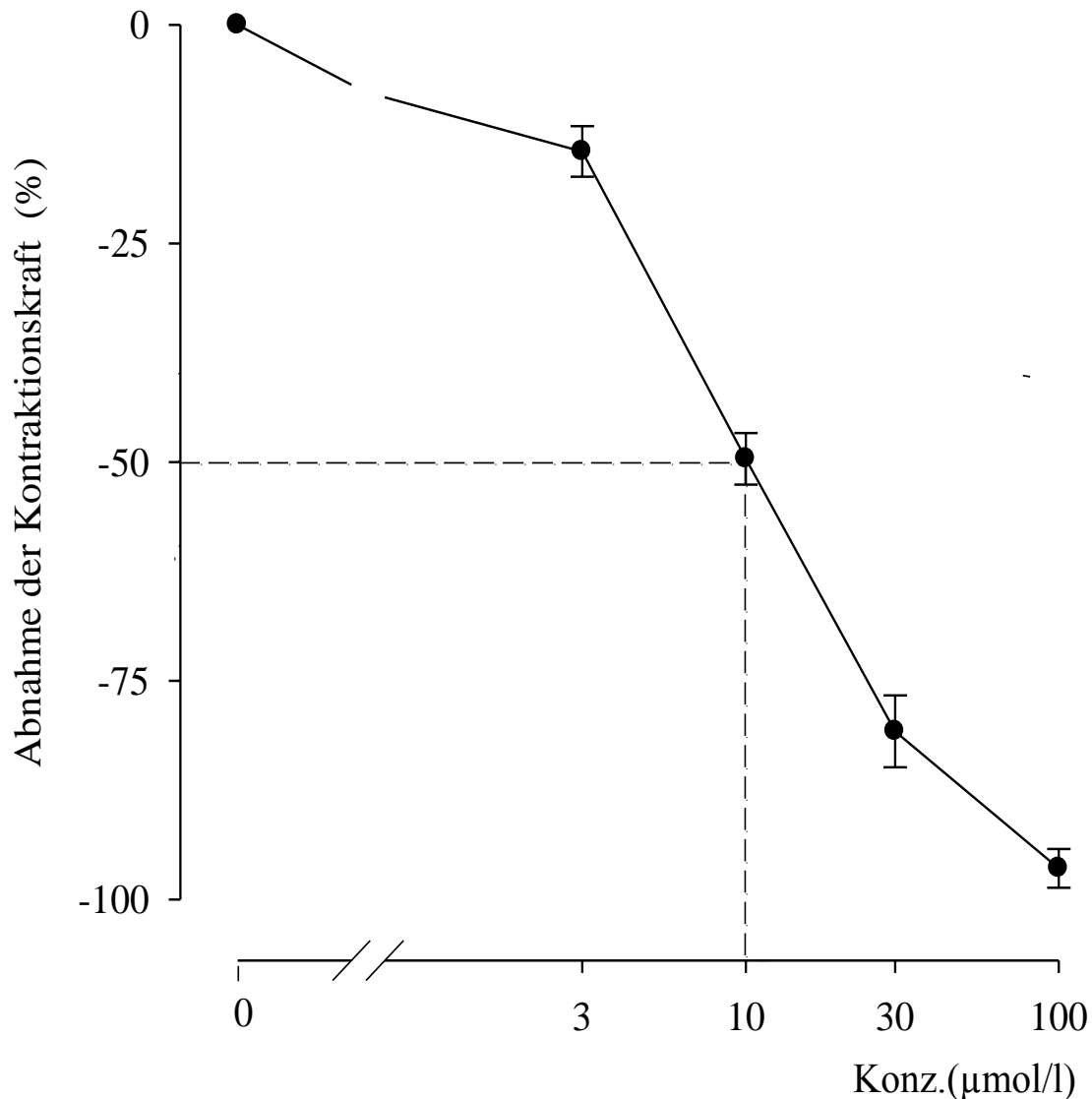


Abbildung 34: Konzentrations-Wirkungskurve von MAH 27 HCL am isolierten Papillarmuskel

Die Kurve zeigt die Zunahme der Kontraktionskraft (Inotropie).

Auf der Ordinate ist die Kontraktionskraft in Prozent angegeben, während auf der Abszisse die unterschiedlichen Konzentrationen (µmol/l) der verwendeten Testsubstanz eingetragen wurden. Es ist anhand der Kurve ersichtlich, dass die Inotropie stetig abnimmt. Der EC₅₀ Wert beträgt hier 10 µmol/l.

Die senkrechten Balken repräsentieren wieder den Standardfehler.

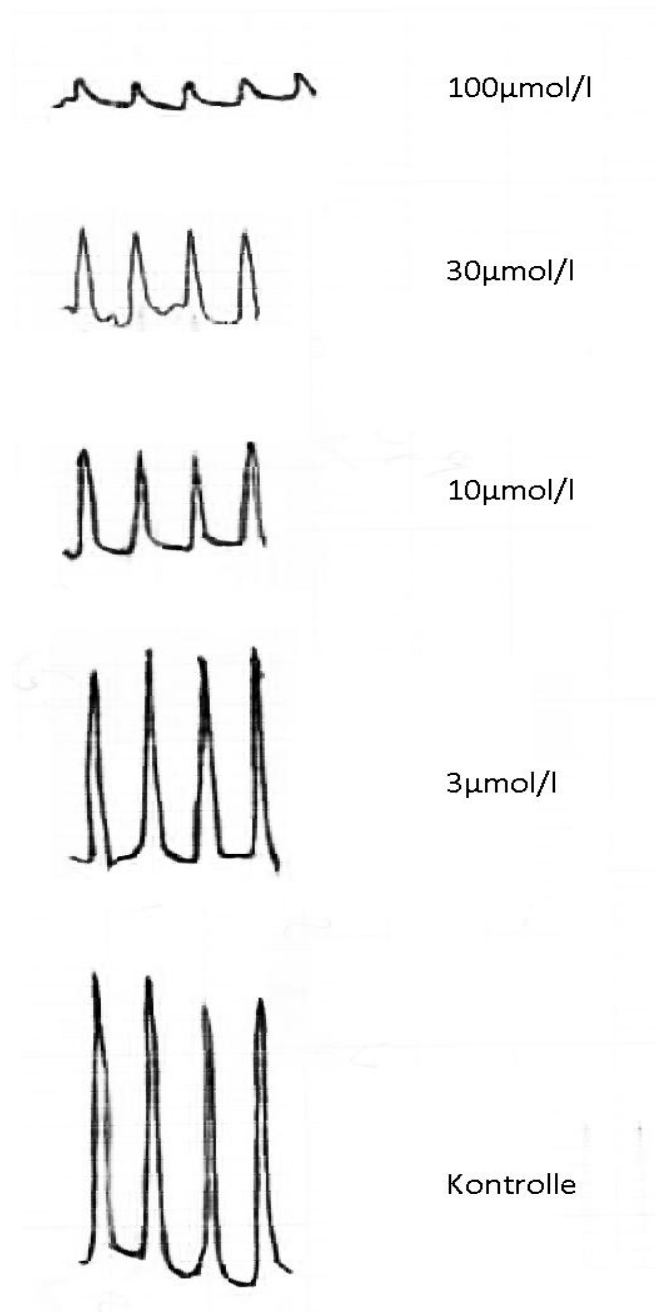


Abbildung 35: Originalaufzeichnung von MAH 27 HCl am Papillarmuskel

Diese Abbildung soll zeigen, wie sich die Injektion der unterschiedlichen Konzentrationen auf die Inotropie auswirkt.

Die einzelnen Amplituden zeigen die Kontraktionskraft und je breiter die Amplitude ist, umso stärker ist die Inotropie. Die Messungen sind alle 5 Minuten erfolgt.

3.5. Wirkung von MAH 27 HCl auf den Vorhof

Es wurden 4 Präparate für die Untersuchung der Testsubstanz verwendet. Hier wurde die Schlagfrequenz beobachtet und die Substanz wurde wieder nach dem Erreichen der Plateauphase alle 45 Minuten in den jeweiligen Konzentrationen (siehe oben) dazugegeben.

MAH 27 HCL	f ± SEM (x/min)	f ±SEM (%)	Anzahl d. Versuche	Irrtumswahr- scheinlichkeit (P)
0(Kontrolle)	197,5 ± 19,84	0 ± 0	4	-----
3	161,25 ± 12,48	-17,79 ± 2,02	4	0,05
10	111,25 ± 10,28	-43,21 ± 3,94	4	0,01
30	11,25 ± 11,25	-92,97 ± 7,00	4	0,001

Abbildung 36: Wirkung von MAH 27 HCl auf die rechten Vorhöfe

Diese Tabelle zeigt die verwendeten Konzentrationen der Testsubstanz, die Irrtumswahrscheinlichkeit, die Versuchsanzahl und die Änderungen der Schlagfrequenz (in % und in x/Minute angegeben, wobei x für die Anzahl der Schläge steht). Am Anfang vom Versuch betrug die Schlagfrequenz 197,5±19,84 Schläge/Minute. Schon bei den ersten Konzentrationen (3µmol/l, 10µmol/l) sieht man eine deutliche Abnahme. Bei der Konzentration von 30µmol/l lag der Wert bei 11,25±11,25, was bedeutet, dass das Präparat fast abgestorben ist. Außerdem ist bei einer Konzentration von 100 µmol/ l der Vorhof abgestorben und der Wert lag daher bei null Schläge/Minute.

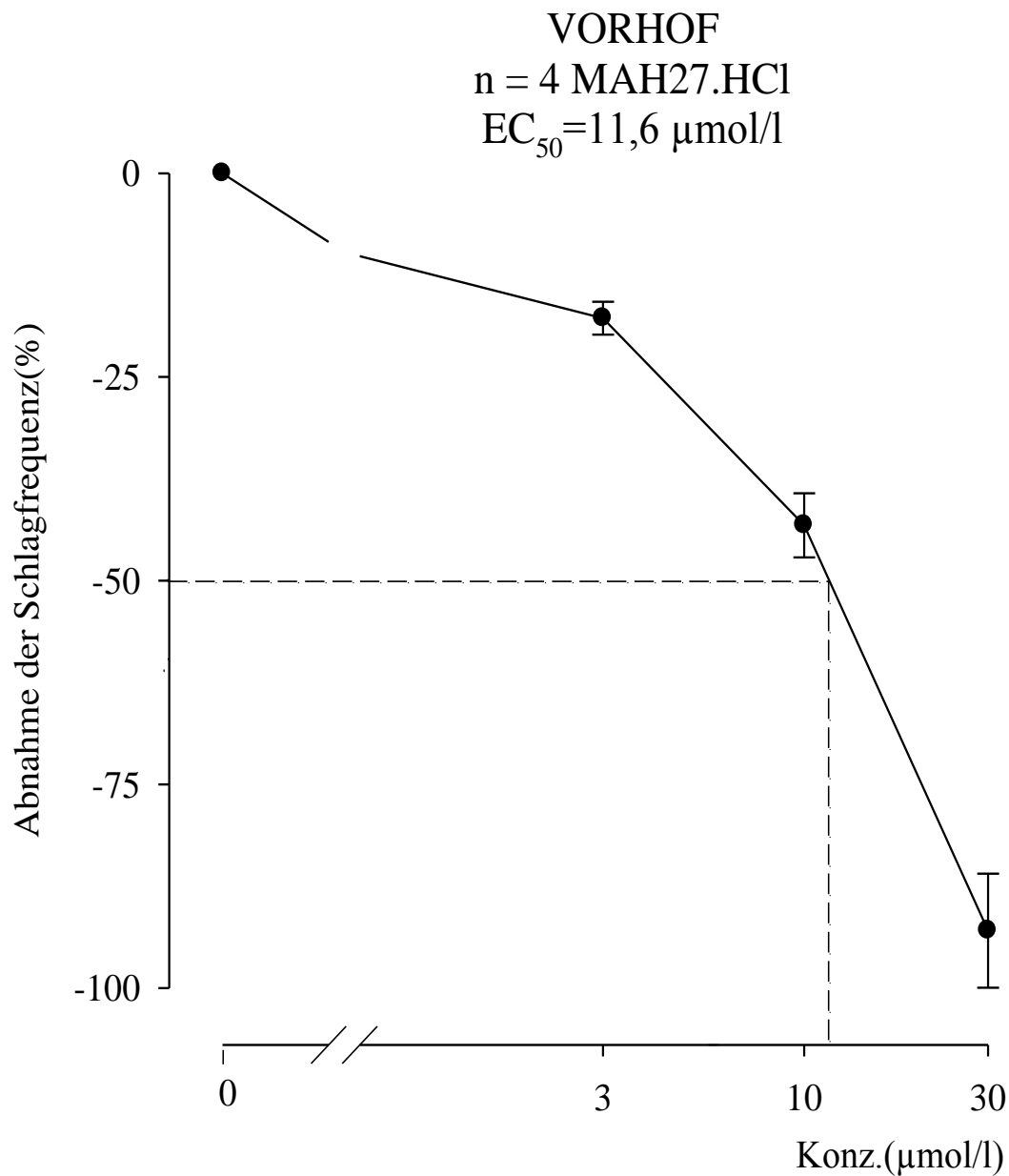


Abbildung 37: Konzentrations- Wirkungskurve von MAH 27 HCL an den isolierten Vorhöfen.

Die Kurve stellt die Abnahme der Schlagfrequenz des Vorhofs dar. Auf der Ordinate (y-Achse) ist die Abnahme der Schlagfrequenz in Prozent und auf der Abszisse (x-Achse) die Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$ angegeben. Die senkrechten Balken sollen wieder den Standardfehler zeigen.

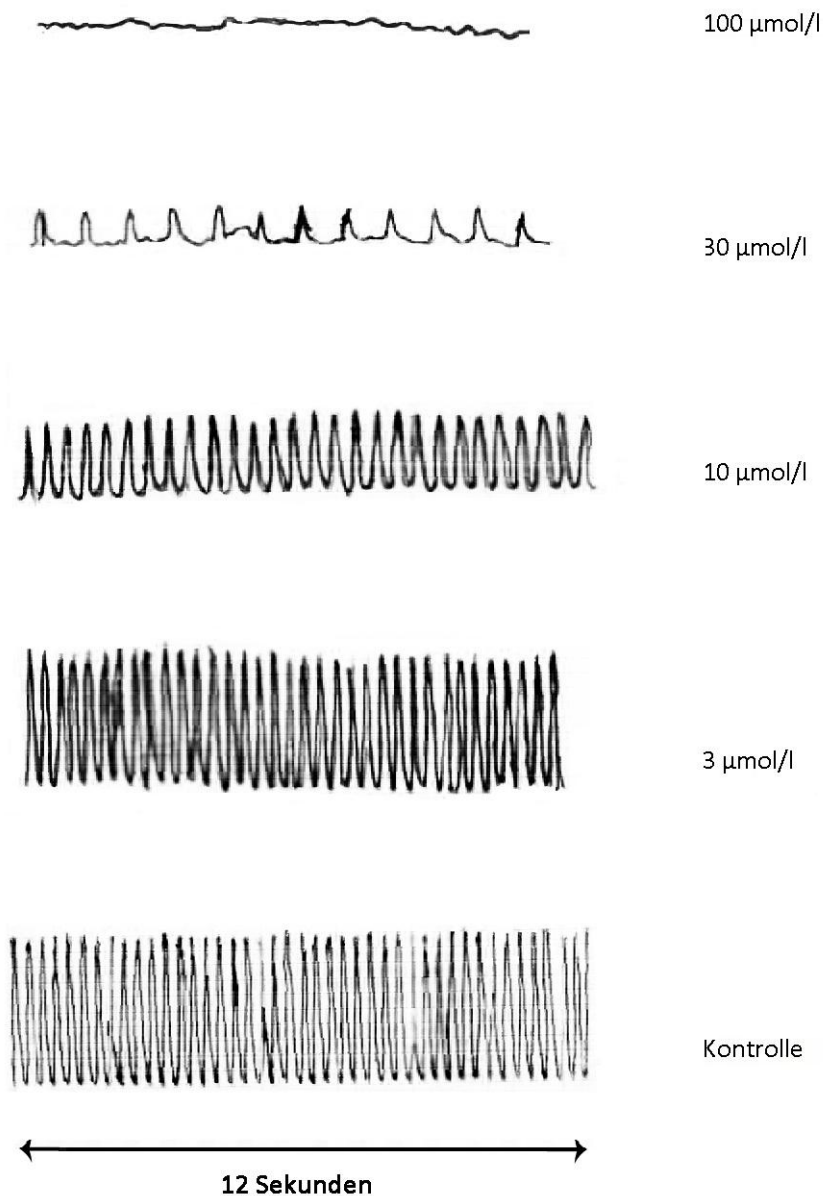


Abbildung 38: Originalaufzeichnung von MAH 27 HCl am rechten Vorhof

Diese Abbildung soll die Schlagfrequenz genauer zeigen, welche durch die Ausschläge des Schreibers pro Minute berechnet wurde.

Es wurde für eine Dauer von 12 Sekunden aufgezeichnet damit man die Schlagfrequenz pro Minute erhält. Anschließend wurde mit dem Korrekturfaktor 5 multipliziert. Dann erfolgte in einem Intervall von 45 Minuten die kumulative Zugabe der Substanzlösung.

3.6. Resultate der Untersuchung mit Glibenclamid

Für die Untersuchung des Wirkungsmechanismus der Testsubstanz wurde Glibenclamid, welcher den ATP-abhängigen Kaliumkanal blockiert, verwendet und es wurden insgesamt 6 Versuche am terminalen Ileum durchgeführt.

Für die ersten 3 Versuche wurde eine Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid verwendet, während für die weiteren 3 Versuche eine Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ genommen wurde.

Das fertig präparierte Organ wurde in die Apparatur B eingespannt und die Vorspannung erfolgte bei einer Stromstärke von 5 mV.

Nach 20 Minuten folgte die Vorkontraktion mittels KCl-Lösung.

Nach dem Erreichen der Plateauphase wurde Glibenclamid dazugegeben und danach 45 Minuten gewartet.

Dann gibt man 15 $\mu\text{mol/l}$ Testsubstanz (wurde dem EC_{50} -Wert vom terminalen Ileum angepasst, der hier 13 $\mu\text{mol/l}$ betrug) ebenfalls dazu und wartet wieder 45 Minuten und somit ist der Versuch zu Ende.

3.6.1. Resultate der Versuche mit 30 µmol/l Glibenclamid

Die Versuchsdurchführung erfolgt wie bereits oben erwähnt.

Glibenclamid (30 µmol/l)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl d. Versuche	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
0 (Kontrolle)	11,69 ± 1 ,35	3	-----
30µmol/l Glibenclamid	10,16 ± 1,87	3	-----
+15µmol/l MAH 27 HCL	2,88 ± 2,1	3	0,05

Abbildung 39: MAH 27 HCl –Wirkung an einem mit Glibenclamid (30µmol/l) vorbehandelten terminalen Ileum

Die Tabelle zeigt die Konzentration von Glibenclamid und MAH 27 HCl. Dazu zeigt sie noch die Mittelwerte der Kontraktionskraft (in mN angegeben), die Anzahl der Versuche und die Irrtumswahrscheinlichkeit.

In der Kontrollphase hatte die Kontraktionskraft den Wert von 11,69±1,35 mN. Nach der Zugabe von Glibenclamid kam zu einer geringen Abnahme der Kontraktionskraft.

Nach der Zugabe meiner Substanz wurde eine starke Änderung gezeigt, deren Wert bei 2,88 ± 2,1 mN lag.

**Terminales Ileum, Glibenclamid
MAH 27 HCl, 15 $\mu\text{mol/l}$
n=3**

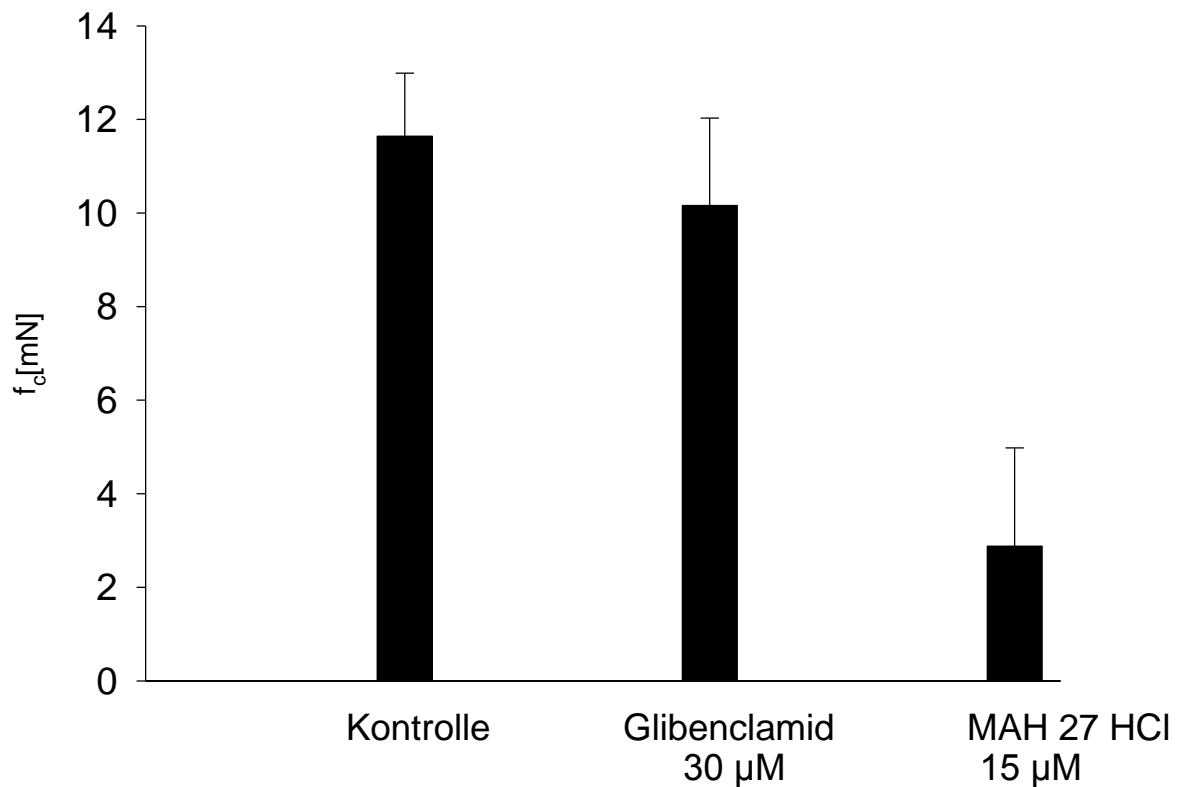


Abbildung 40 : Balkendiagramm von MAH 27 HCl am terminalen Ileum unter dem Einfluss von Glibenclamid

Die x-Achse zeigt die jeweiligen Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$ und auf der y-Achse ist die Kontraktionskraft in mN angegeben.

Die Balken präsentieren die Darstellung der Mittelwerte aus den 3 Versuchen und die strichförmige Verlängerung soll den Standardfehler darstellen. Anhand des Balkendiagramms zeigt sich, dass mit der Zugabe von $30\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid es zu einer leichten Abnahme der Kontraktionskraft kommt. Zu einer deutlichen Abnahme der Kontraktionskraft kam es allerdings erst nach der Zugabe von $15\mu\text{mol/l}$ MAH 27 HCl.

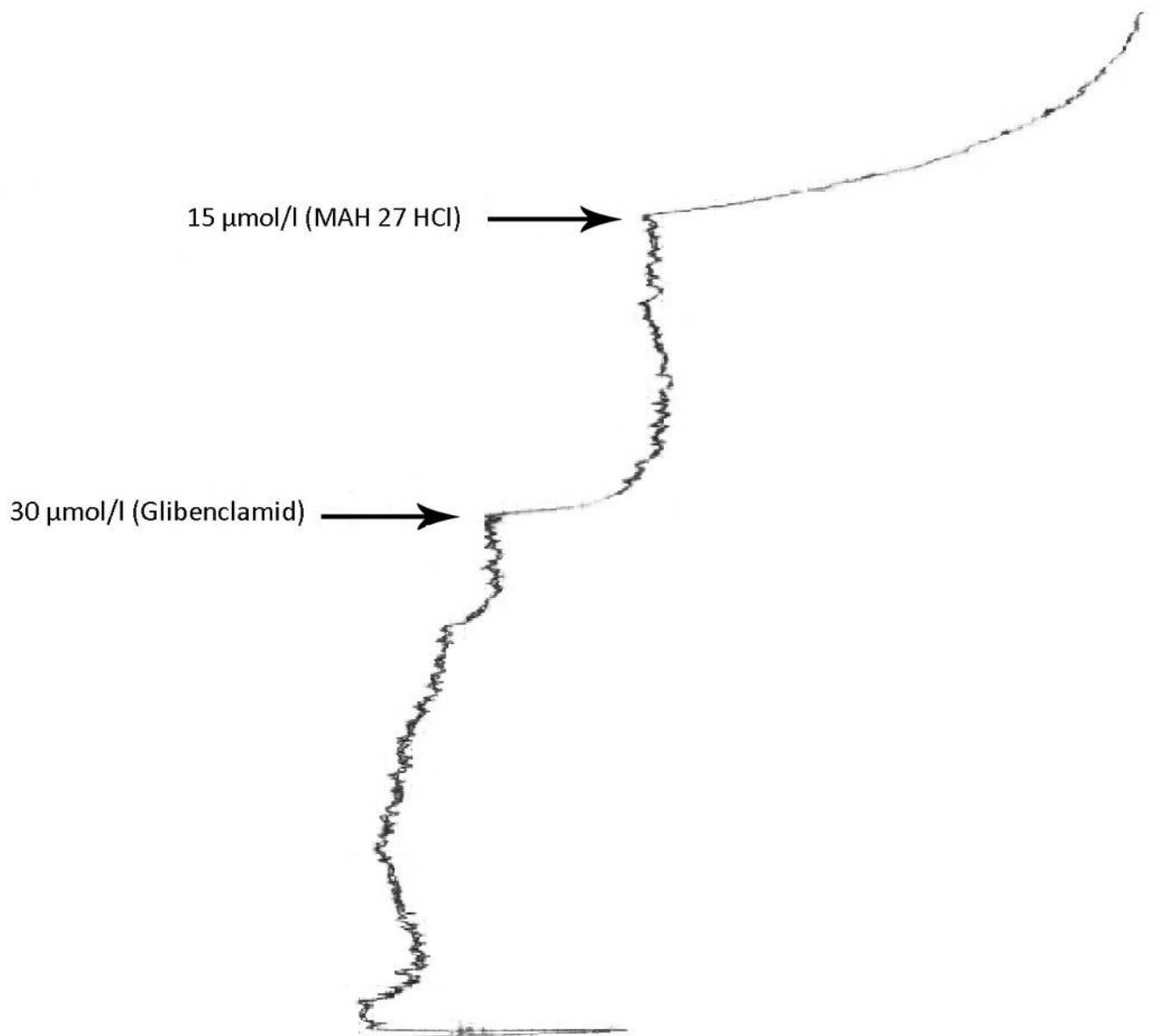


Abbildung 41: Originalaufzeichnung von 15 µmol/l MAH 27 HCl - Wirkung am terminalen Ileum unter Einfluss von 30 µmol/l Glibenclamid

3.6.2. Resultate der Versuche mit 100 µmol/l Glibenclamid

Die Versuchsdurchführung wurde bereits oben erwähnt.

Der Unterschied zu den erwähnten Versuchen bestand darin, dass hier bei diesen Versuchen nun 100 µmol/l statt 30 µmol/l Glibenclamid verwendet wurden.

Glibenclamid (100µmol/l)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl d.Versuche	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
0(Kontrolle)	9,36 ± 1,55	3	-----
100µmol/l Glibenclamid	4,73 ± 1,45	3	-----
+15µmol/l MAH 27 HCL	0,1 ± 0,1	3	0,01

Abbildung 42: MAH 27 HCl-Wirkung an einem mit 100 µmol/l vorbehandelten terminalen Ileum In der Tabelle sind die Substanzkonzentrationen, die Mittelwerte der Kontraktionskraft (mit mN angeführt), die Irrtumswahrscheinlichkeit und die Versuchsanzahl angegeben. In der Kontrollphase ergab der Wert der Kontraktionskraft 9,36± 1,55 mN. Nach dem Zusatz von 100 µmol/l Glibenclamid kam es zu einer Veränderung in der Kontraktionskraft. Nach der Gabe von 15 µmol/l MAH 27 HCl kam es dann zu einer noch deutlicheren Abnahme der Kontraktionskraft (0,1± 0,1 mN).

**Terminales Ileum, Glibenclamid
MAH 27 HCl, 15 $\mu\text{mol/l}$
n=4**

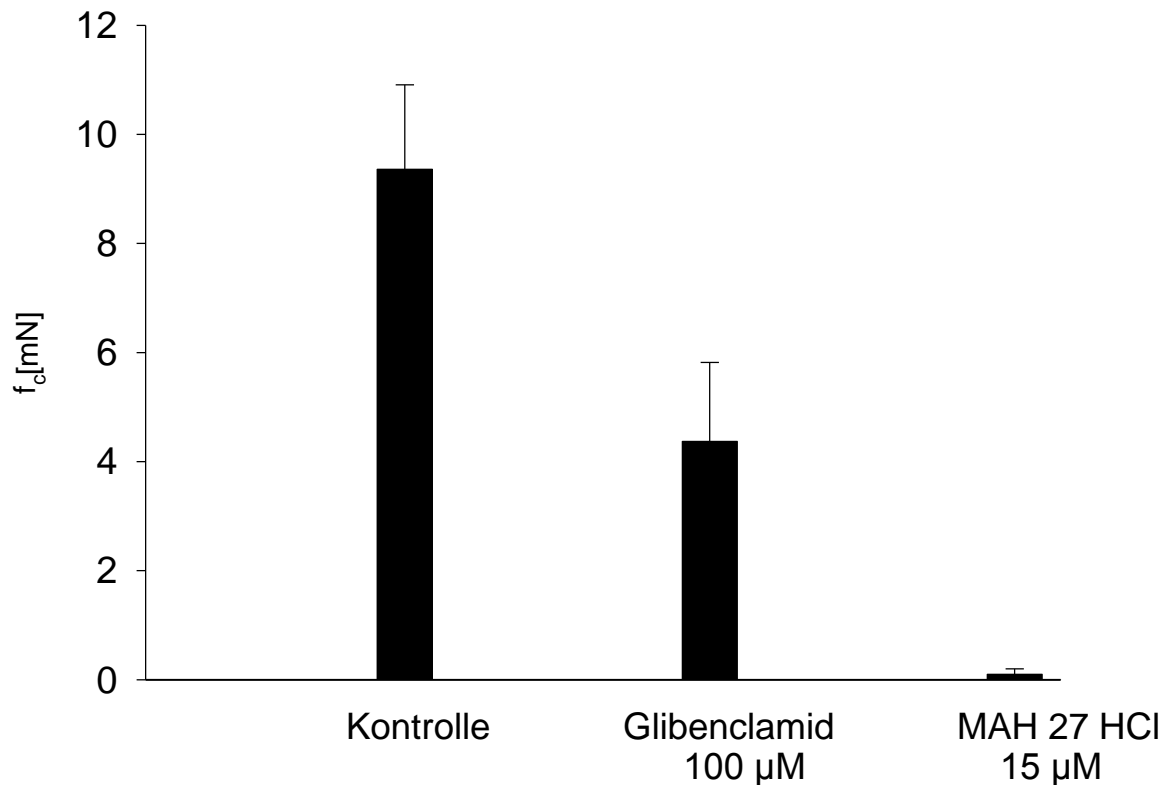


Abbildung 43: Balkendiagramm von MAH 27 HCl am terminalen Ileum unter Einfluss von Glibenclamid

Die oben gezeigten Balken symbolisieren wieder die Mittelwerte der 3 Versuche. Während auf der x- Achse (Abszisse) wieder die Konzentrationen von der Testsubstanz in $\mu\text{mol/l}$ angegeben sind, zeigt die y-Achse (Ordinate) die Kontraktionskraft (in mN).

Das Balkendiagramm zeigt, dass es durch die Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid zu einer deutlichen Abnahme der Kontraktionskraft kam. Nach der Zugabe von 15 $\mu\text{mol/l}$ MAH 27 HCl ist es zu einer noch signifikanteren Abnahme der Kontraktionskraft gekommen.

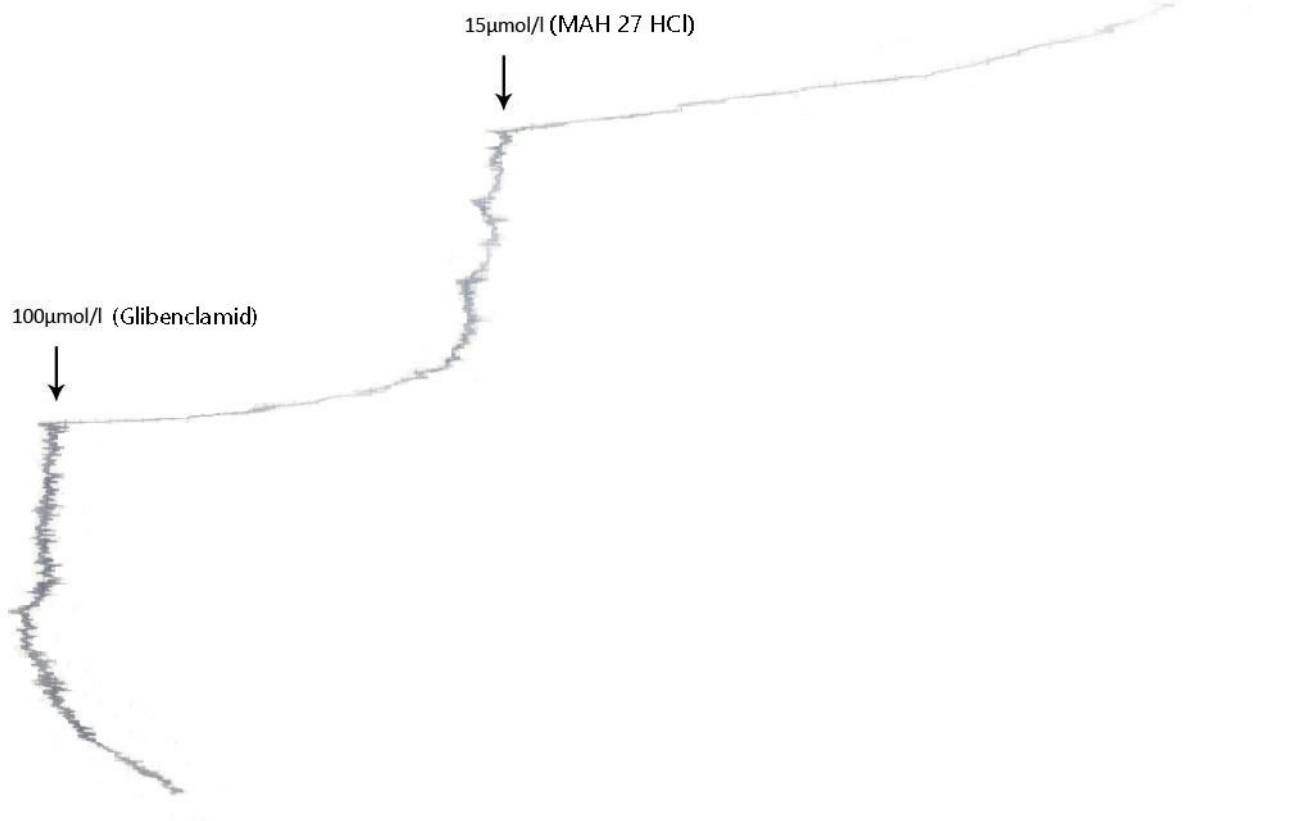


Abbildung 44: Aufzeichnung von MAH 27 HCl (15µmol/l) –Wirkung am terminalen Ileum unter Einfluss von Glibenclamid (100µmol/l)

Die Kurve zeigt eindeutig, dass durch die Zugabe von 100 µmol/l Glibenclamid es zwar zu einer Abnahme der Kontraktionskraft kam, jedoch nicht in derselben Stärke wie nach der Zugabe von MAH 27 HCl. Da kam es nämlich zu einer noch signifikanteren Abnahme der Kontraktionskraft.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Diplomarbeit, wurde die Wirkung von MAH 27 HCl an 5 unterschiedlichen Organen (Atrium dextrum, Aorta, Musculus papillaris, terminales Ileum und Arteria pulmonalis) von Meerschweinchen untersucht.

Danach wurde der Wirkungsmechanismus von Glibenclamid genauer getestet.

Der genaue Versuchsablauf und die Apparaturen wurden bereits in den vorangegangenen Kapiteln genauer beschrieben.

In diesem Teil der Diplomarbeit sollte genauer auf die Wirkung von MAH 27 HCl eingegangen werden, denn die Ergebnisse der Versuche wurden bereits in einem früheren Kapitel beschrieben.

4.1. Versuchsreihen am quergestreiften Herzmuskel

Durch die Versuche am Musculus papillaris und am Atrium dextrum sollten Inotropie (Musculus papillaris) bzw. Chronotropie (Atrium dextrum) genauer untersucht werden.

Für die Überprüfung des Effektes am Papillarmuskel musste das Organ zunächst mit einer Elektrode gereizt werden.

Bei dem rechten Vorhof war das nicht notwendig, weil dieses Organ, aufgrund der autonomen Spontanaktivität des Sinusknotens, spontan aktiv ist.

Organ	MAH 27 HCL $f_c \pm \text{SEM} (\%)$ bei 100 $\mu\text{mol/l}$ Endkonzentration	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
Atrium dextrum	$-92,97 \pm 7,03$	11,6
Musculus papillaris	$-96,45 \pm 2,21$	10

Abbildung 45: Tabelle zeigt die Wirkung von MAH 27 HCL auf die quergestreifte Herzmuskulatur

Mithilfe der Tabelle wird gezeigt, dass MAH 27 HCL eine starke Wirkung am rechten Vorhof hat. Der Kontrollwert lag bei $197,5 \pm 19,84$ Schläge pro Minute. Bei einer Konzentration von $30 \mu\text{mol/l}$ lag der Wert dann bei $11,25 \pm 11,25$ Schläge/Minute. Dadurch, dass der Wert abgenommen hat, sieht man, dass es zu einer signifikanten Abnahme der Chronotropie (negativ Chronotropie) gekommen ist.

Der EC_{50} -Wert liegt hier bei $11,6 \mu\text{mol/l}$.

Beim Papillarmuskel betrug der Kontrollwert $1,53 \pm 0,23$ mN, während der Wert nach der Zugabe von $100 \mu\text{mol/l}$ der Testsubstanz bei $0,05 \pm 0,03$ mN (= $-96,45 \pm 2,21 \%$) lag. Daran sieht man die starke Abnahme der Inotropie (negative Inotropie).

Beim Papillarmuskel konnte kein EC_{50} -Wert ermittelt werden.

Hier kann man also gut erkennen, dass die Testsubstanz MAH 27 HCL eine sehr starke Wirkung an isolierten Herzmuskelpräparaten erfüllt hat.

4.2. Versuchsreihen an glattmuskulären Organen

Durch eine Kaliumchlorid-Lösung wurde die glatte Muskulatur von Aorta, Arteria pulmonalis und Ileum terminales vorkontrahiert. Dadurch bekam man einen konstanten Kontraktionstonus, wodurch eine spasmolytische bzw. dilatierende Wirkung untersucht werden konnte.

Für die Versuche an der Aorta und an der Arteria pulmonalis wurde eine 90 mmolare KCL-Lösung verwendet, während für die Darmversuche eine 60 mmolare KCL-Lösung gebraucht wurde.

Organ	MAH 27 HCL $f_c \pm \text{SEM}$ (%) bei 100 $\mu\text{mol/l}$ Endkonzentration	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
Aorta	$-61,64 \pm 5,43$	54,5
Arteria pulmolnalis	$-60,96 \pm 6,45$	61,2
terminales Ileum	$-94,16 \pm 3,39$	13,0

Abbildung 46: Tabelle zeigt die Wirkung von MAH 27 HCl auf die glatte Muskulatur

MAH 27 HCl übte auf die Organe der glatten Muskulatur eine starke Wirkung aus, aber (bis auf das Ileum) eine nicht so starke Wirkung wie bei der quergestreiften Muskulatur. Der EC_{50} Wert wurde bei allen drei Organen ermittelt, wobei der niedrigste Wert von 13,0 $\mu\text{mol/l}$ die Pulmonalarterie hat.

Laut der Tabelle betrug der Kontrollwert bei der Aorta $8,58 \pm 0,81$ mN und nach der Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ der Testsubstanz betrug der Wert $3,31 \pm 0,55$ mN ($= -61,64 \pm 5,43$ %). Das zeigt eine stetig schwache Abnahme der Kontraktionskraft.

Der EC_{50} Wert beträgt bei der Aorta 54,5 $\mu\text{mol/l}$.

MAH 27 HCl hatte eine ähnliche Wirkung auf die Pulmonalarterie wie auf die Aorta. Der Kontrollwert liegt zu Beginn bei $13,37 \pm 1,74$ mN und nach der Zugabe von $100 \mu\text{mol/l}$ von der Testsubstanz liegt der Wert bei $5,0 \pm 1,17$ mN ($= -60,96 \pm 6,45 \%$).

Bei der Pulmonalarterie beträgt der EC_{50} Wert $61,2 \mu\text{mol/l}$.

Die signifikanteste Wirkung an der glatten Muskulatur sieht man beim terminalen Ileum, was hier eine spasmolytische Wirkung darstellt. Der Kontrollwert lag bei $14,51 \pm 0,98$ mN und nach der Zugabe von $30 \mu\text{mol/l}$ von MAH 27 HCl betrug der Wert $0,85 \pm 0,51$ mN ($= -94,16 \pm 3,39 \%$).

Der EC_{50} Wert beträgt beim Darm $13,0 \mu\text{mol/l}$.

4.3. Versuchsreihen mit MAH 27 HCl in Kombination mit Glibenclamid

Hier wurden 6 Versuche durchgeführt. Mit Hilfe vom Glibenclamid (=ein Kaliumkanalblocker) soll der Wirkungsmechanismus von der Testsubstanz genauer untersucht werden. Die ersten drei Versuche erfolgten mit einer Konzentration von $30 \mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und bei den letzten drei Versuchen wurde eine Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ Glibenclamid verwendet.

4.3.1. Versuch mit MAH 27 HCl in Kombination mit $30 \mu\text{mol/l}$ Glibenclamid

Nach dem Erreichen der Plateauphase wurden $30 \mu\text{mol/l}$ Glibenclamid hinzupipettiert und nach 45 Minuten wurden $15 \mu\text{mol/l}$ MAH 27 HCl hinzugesetzt.

Der Kontrollwert lag hier bei $11,69 \pm 1,35$ mN und nach der Zugabe von Glibenclamid und MAH 27 HCl wurde ein Wert von $2,88 \pm 2,1$ mN erreicht.

4.3.2. Versuch mit MAH 27 HCl in Kombination mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid

Nun wurden 100 $\mu\text{mol/l}$ anstelle von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid zu dem Organbad, in dem sich das Präparat befindet, dazugegeben. Der Kontrollwert lag bei $9,36 \pm 1,55$ mN und nach der Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und 15 $\mu\text{mol/l}$ der Testsubstanz betrug der Wert $0,1 \pm 0,1$ mN.

Das Zustandekommen der relaxierenden Wirkung ist wahrscheinlich nicht durch die Öffnung der ATP-abhängige-Kalium-Kanal bedingt.

Zur Untersuchung eines möglichen Wirkungsmechanismus wären somit noch weitere Versuche notwendig.

5. Zusammenfassung

In dieser wissenschaftlichen Arbeit ging es um die in vitro- Untersuchung von einem am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie der Universität Wien synthetisierten Testsubstanz und zwar das MAH 27 HCl. Diese wurde in den Konzentrationen 1 $\mu\text{mol/l}$, 3 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ an 5 verschiedenen Organen (Arteria pulmonalis, Atrium dextrum, Aorta, Musculus papillaris und das terminale Ileum) von Meerschweinchen analysiert.

Mithilfe des Musculus papillaris wurde eine eventuelle positive oder negative inotrope Wirkung untersucht, während beim Atrium dextrum der Effekt der Testsubstanz auf die Chronotropie getestet wurde. Bei den restlichen Präparaten, welche die glattmuskulären Organe waren, wurde die Wirkung von MAH 27 HCl auf die Kontraktionskraft genauer untersucht.

Für eine repräsentative Aussage war es wichtig mindestens 4 Versuchsreihen pro isoliertes Organ durchzuführen.

Am Papillarmuskel zeigte die Testsubstanz eine eindeutige negative inotrope Wirkung, jedoch wurde der EC_{50} Wert hier gar nicht erreicht.

Beim Vorhof zählte man die Schläge pro Minute. Durch die Zugabe der Testsubstanz nahm die Zahl der Schläge stetig ab. Bei 11,6 $\mu\text{mol/l}$ wurde hier ein EC_{50} Wert erreicht.

Am Darm wurde auch eine spasmolytische Wirkung gezeigt, während es bei der Aorta und der Pulmonalarterie zu einer schwachen vasodilatierenden Wirkung kam.

Der EC_{50} Wert liegt beim Darm bei 13 $\mu\text{mol/l}$, bei der Aorta beträgt der Wert 54,5 $\mu\text{mol/l}$ und bei der Pulmonalarterie hat er einen Wert von 61,2 $\mu\text{mol/l}$.

Dadurch dass beim terminalen Ileum die stärkste Abnahme der Kontraktionskraft beobachtet wurde, verwendete man dieses Organ auch zur Untersuchung des Wirkmechanismus der Testsubstanz MAH 27 HCl. Dazu verwendete man Glibenclamid.

Im zweiten Teil der Diplomarbeit wurde der Wirkmechanismus genauer am Ileum terminales untersucht. Mit dem Glibenclamid blockierte man den ATP-abhängigen Kaliumkanal.

Wie schon oben erwähnt, ist die relaxierende Wirkung vom MAH 27 HCl vermutlich nicht durch die Öffnung des ATP-abhängige-Kalium-Kanals entstanden. Daher sind für die Untersuchung eines möglichen Wirkungsmechanismus noch weitere Versuche nötig.

6. Literaturverzeichnis

Estler CJ, Schmidt H (2007) Pharmakologie und Toxikologie: Für Studium und Praxis. 6. Auflage, F.K. Verlag GmbH

Forth W, Henschler D, Rummel W (2009) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10. Auflage, Elsevier München

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.

Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch (2004). 9. Auflage, Gruyter

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.

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Kortnig 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

Patel M, Shah G (2010) Possible role of hydrogen sulfide in insulin secretion and in development of insulin resistance. *J Young Pharm* 2:148-51.

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

Stipanuk MH, Beck PW (1992) Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J* 206:267-277.

Wang R (2002) Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *Faseb J* 16:1792-1798.

Wang YF, Mainali P., Tang CS, Shi L, Zhang CY, Yan H, Liu Xq, Du JB (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 K_{ATP} channel opener. *EMBO J* 20:6008-6016.

7. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Vor- und Nachname	Ahmed El-Gamal
Geburtsdatum	1.12.1982
Geburtsort	Ägypten
Staatsbürgerschaft	Österreich
Eltern	Rashad El-Gamal Hemat Agour
Geschwister	Mag. Pharm. Mohamed El-Gamal Mag. Dena El-Gamal (Diplom Pädagogin) Mahmoud El-Gamal (Student)

Ausbildung

1988-2001	Volksschule Grundschule Gymnasium (Matura) in Mansura/ Ägypten
März 2003	Universitätslehrgang Vorstudienlehrgang UniStG (Ausgleich ägyptische Matura)
Seit 2005	Studium der Pharmazie an der Uni Wien
Jänner-Juni 2006	Wehrdienst: Österreichisches Bundesheer
WS 2011	Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Beruflicher Werdegang

April 2007-Jänner 2011	Tätigkeit als Werkstudent bei Bank Austria
------------------------	--