

Aus dem Oscar Langendorff Institut für Physiologie der Universität Rostock  
unter der Leitung von Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling.

# **Altersabhängige Adenosin – vermittelte Relaxation des Musculus detrusor vesicae der Ratte**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Weller, Johannes

geboren in Havelberg

Rostock 2016

Dekan

Prof. Dr. med. univ. Reisinger

Dekan

Prof. Dr. Emil Reisinger

1. Gutachter: PD Dr. med. Timo Kirschstein, Oskar-Langendorff-Institut für Physiologie,  
Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Oliver Hakenberg, Klinik für Urologie, Universität Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Gabriele Pfitzer Institut für Physiologie, Universität Köln

Datum der Einreichung: 27.06.2016

Datum der Einreichung: 22.11.2016



## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Anatomie	1
1.2. Physiologie der Miktion	1
1.3. Die überaktive Blase	3
1.4. Adenosinrezeptoren in der Blase	6
2. Materialien	10
2.1. Chemikalien	10
2.2. Lösungen	12
2.3. PCR Primer	13
2.4. Software	13
2.5. Geräte	14
2.6. Versuchstiere	15
3. Methoden	16
3.1. Organbad	16
3.2. Polymerase – Kettenreaktion	21
4. Ergebnisse	24
4.1. Organbad	24
4.1.1. Vorbetrachtungen	24
4.1.2. Einfluss des rho – Kinase – Inhibitor Y 27632	27
4.1.3. Wirkung von Adenosin	28
4.1.4. Adenosingabe nach Kaliumchloridapplikation	30
4.1.5. Adenosingabe vor Kaliumchloridapplikation	35
4.1.6. Vergleich des Zeitpunktes der Adenosinapplikation	41
4.2. Polymerase – Kettenreaktion	42
4.2.1. Vergleich der verschiedenen Rezeptorsubtypen in Abhängigkeit der House – keeping – Gene	43
4.2.1.1. House – keeping – Gen: ribosomale S – 18 Untereinheit (S – 18)	44
4.2.1.2. House – keeping – Gen: Glycerinaldehyd – 3 – Phosphat – Dehydrogenase (GAPDH)	45

4.2.2.	Vergleich der verschiedenen Rezeptorsubtypen in Abhängigkeit der Altersgruppen	47
4.2.3.	Betrachtung der einzelnen Adenosinrezeptoren	49
5.	Diskussion	54
6.	Zusammenfassung	66
7.	Literaturverzeichnis	67
8.	Abkürzungsverzeichnis	74
9.	Abbildungs – und Tabellenverzeichnis	76
Anlage 1	Selbständigkeitserklärung	
Anlage 2	Thesen	
Anlage 3	Lebenslauf	

# 1. Einleitung

## 1.1. Anatomie

Die Harnblase ist ein Hohlorgan im Bereich des kleinen Beckens. Mit ihrer Vorderwand liegt sie im oberen Anteil der Bauchwand und im unteren der Symphyse an. Wie bei den anderen gastrointestinalen Hohlorganen gliedert sich auch die Wand der Blase in die Schichten Tunica mucosa (Mucosa), Lamina propria, Tunica muscularis (Muscularis), Tela subserosa und Tunica serosa. Die Schleimhaut ist durch die Möglichkeit, sich den stark unterschiedlichen Füllungsverhältnissen anzupassen, gekennzeichnet. In ungefülltem Zustand wirft die Tunica mucosa Falten, die bei zunehmender Dehnung der Blasenwand verstreichen (Moll und Moll 2000). Auch das Epithel selbst kann durch die Anordnung der Zellen und deren Eigenschaften die Dehnungsfähigkeit der Schleimhaut unterstützen. Die Innenseite des Organs ist mit dem mehrreihigen Übergangsepithel des Harntraktes ausgekleidet, welches deshalb auch Urothel genannt wird. Im ungefüllten Zustand besteht das Epithel aus 5–7 Schichten, die sich bei Füllung auf bis zu 3 Schichten reduzieren. Diese Möglichkeiten tragen dazu bei, dass das Volumen der Harnblase im gefüllten Zustand auf bis zu 1500 ml steigen kann (Moll und Moll 2000). Die Regulation des Volumens ist Grundlage für die Möglichkeit der Blase große Mengen Urin zu speichern, ohne dass der intravesikale Druck zu sehr steigt. Verantwortlich hierfür ist eine Regulation durch das vegetative Nervensystem, dass über beta – adrenerge Rezeptoren zu einer Relaxation des Detrusors führt (Andersson 2004; Yamanishi et al. 2002). Sowohl beta – adrenerge Rezeptoren (Alzheimer et al. 2009) als auch die Adenosinrezeptoren  $A_{2A}$  und  $A_{2B}$  sind an  $G_s$  – Proteine gekoppelt (Fredholm et al. 2011). Sie führen zu einem Anstieg des cyclischen Adenosinmonophosphats mit dem Resultat der Relaxation des glatten Muskels.

## 1.2. Physiologie der Miktion

Die glatte Muskulatur der Blase wird als funktionelle Einheit betrachtet und als Detrusor vesicae bezeichnet. Dieser ist dreischichtig in seinem Aufbau und besteht aus einer inneren und einer äußeren Längsschicht sowie einer mittleren Zirkulärschicht. Für den Verschluss der Blase gegenüber der Urethra ist ein Sphinkter verantwortlich (Hautmann und Huland 2006). Neben diesem glatt – muskulärem Sphinkter existiert auch eine quergestreifte Muskulatur,

die eine Kontinenzfunktion ausübt und die für die willkürliche Miktion notwendig ist. Die Innervation der glatten Muskulatur geschieht durch sympathische und parasympathische Fasern auf zentrale und periphere Reize hin. Demgegenüber wird die quergestreifte Muskulatur durch somatische Nervenendigungen gesteuert. Diese Innervation ist verantwortlich für ein komplexes Zusammenspiel aller beteiligten Muskeln bei Harnspeicherung und Miktion. Der für die willkürliche Blasenentleerung verantwortliche Regelkreis erstreckt sich von der Harnblasenwand über vegetative Fasern in das Sakralmark. Von hier erfolgt die Weiterleitung der Afferenzen ins Großhirn, zudem findet eine Umschaltung der Signale auf Neuronen des Vorderhorns des Sakralmarkes statt. Aus dem Vorderhorn verlaufen die motorischen Fasern zurück zum Zielorgan, der glatten Muskulatur der Harnblase (Abb. 1). Durch diesen einfachen Regelkreis wird durch die Steigerung von afferenten Reizen bei Zunahme der Wandspannung der Blasenwand ein Miktionsreflex ausgelöst. In der Regel erlernt der Mensch im Kleinkindalter die Miktion zu kontrollieren, sodass dieser Regelkreis zusätzlich supraspinalen Einflüssen unterliegt. Eine wichtige Rolle hierbei spielt das pontine Miktionszentrum. Die Axone verlaufen im Seitenstrang des Rückenmarks ins Sakralmark und können fördernd auf die Miktion einwirken. Das pontine Miktionszentrum wird durch kortikale Neuronen des Großhirns gehemmt (Alzheimer et al. 2009).

Die Miktion wird durch die Hemmung der somatischen Neurone des externen Blasensphinkters eingeleitet. Daraufhin wird über parasympathische Nervenendigungen eine Kontraktion des Detrusors ausgelöst. Gleichzeitig kommt es zu einer Aktivitätsabnahme des Sympathikus und zu einer Tonusabnahme des M. sphincter urethrae internus. Aufgrund der Drucksteigerung in der Blase wird der Urin durch die Urethra hinausgedrückt. Während der Kontinenzphase verhält es sich entgegengesetzt, die sympathische Innervation überwiegt und die Sphinktermuskulatur ist kontrahiert während der Detrusor vesicae entspannt ist (Alzheimer et al. 2009).

Zusätzlich zur sympathischen und parasympathischen Innervation, erfolgt die Signalübermittlung an die glatte Muskulatur der Blase auch durch nicht – adrenerge – nicht – cholinerge Nervenendigungen (NANC). Ein wichtiger Transmitter in diesem System ist Adenosin. Es konnte gezeigt werden, dass alle vier Adenosinrezeptoren ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ,  $A_3$ ) in der Harnblase exprimiert werden. Relativ hohe Spiegel ergaben sich für die mRNA des  $A_{2B}$  – Rezeptors (Dixon et al. 1996; Fredholm et al. 2001; Owen et al. 2012).

Eine Kontraktion der glatten Muskulatur kann durch eine Depolarisation mittels Kaliumchlorid (KCl) ausgelöst werden. Es kommt zu einer Öffnung der spannungsabhängigen Calciumkanäle. Die einströmenden Calciumionen, vorrangig aus dem extrazellulären Raum, vermitteln über eine Bindung an Calmodulin eine Aktivierung der myosin light chain Kinase (MLCK). Dieses Enzym phosphoryliert die leichte Kette des Myosins (MLC) und erhöht damit ihre Aktivität. Der Querbrückenzyklus kann ablaufen und es kommt zu einer Verkürzung der Muskelzellen durch das Ineinandergreifen der Myosin – und Aktinfilamente (Alzheimer et al. 2009).  $A_{2A}$  – und  $A_{2B}$  – Rezeptoren sind vorwiegend an  $G_s$  – Proteine gebunden (Aronsson et al. 2010), die  $A_1$  – und  $A_3$  –Rezeptoren interagieren bevorzugt mit  $G_{i/o}$  – Proteinen (Abb. 2). Auch andere Verknüpfungen von Adenosinrezeptoren und G – Proteinen sind beschrieben (Fredholm et al. 2001).

### 1.3. Die überaktive Blase

Pathophysiologisch ergibt sich bei fehlender oder gestörter supraspinaler Kontrolle das Bild einer Detrusorhyperreflexie und damit einer überaktiven Blase (OAB – overactive bladder). Schon bei geringen Füllungen besteht ein starkes Gefühl der gefüllten Blase. Dies kann zu imperativem Harndrang und zu Dranginkontinenz führen. Weiterhin bestehen eine Pollakisurie und eine Nykturie. Die überaktive Blase ist ein häufiges und schwerwiegendes Krankheitsbild. Es hat einen negativen Einfluss auf die Lebensqualität vieler Menschen (Griebling 2013). Die Prävalenz liegt in Deutschland bei ca. 17 % in der erwachsenen Bevölkerung, steigt jedoch mit zunehmendem Alter an (Liu et al. 2004; Schumacher 2006). Laut Hautmann et al. können drei Formen der OAB unterschieden werden.

1. Bei Schädigung des zentralen Nervensystems oder Hirnleistungsstörungen kann es zu einem Mangel der kortikalen Hemmung des pontinen Miktionszentrums kommen. Die Miktion läuft in der Folge ohne Möglichkeit der willkürlichen Einflussnahme, durch den sakralen Reflexbogen gesteuert, autonom ab. Dies wird als neurogene Detrusorhyperaktivität bezeichnet. Beispielhaft für diese Schädigungen des zentralen Nervensystems können cerebrovaskuläre Ereignisse, Rückenmarksverletzungen oder Multiple Sklerose genannt werden (Schumacher 2006).

2. Dagegen wird von einer nichtneurogenen Detrusorhyperaktivität gesprochen, wenn eine gesteigerte Erregbarkeit des Detrusors vorliegt. Grund hierfür können anatomische oder funktionelle Veränderungen des M. detrusor selbst sein. Als ursächlich werden ischämische Veränderungen der Nervenendigungen oder des Detrusors selbst diskutiert. Myogene Veränderungen können auch durch eine Auslassobstruktion ausgelöst werden. Der gesteigerte intravesikale Druck führt zu einer Schädigung der Nervenendigungen (Turner und Brading 1997).
3. Gesteigerte oder vermehrte Afferenzen von der Blase können zu Dysbalancen in der Regulation der sakralen Reflexmuster führen und ein Überwiegen der kontrahierenden Efferenzen auslösen.

Wie oben beschrieben wird die glatte Muskulatur des Detrusors via acetylcholinergischer und adrenerger Neuronen durch das vegetative Nervensystem innerviert. Deshalb erfolgt die Therapie zurzeit in erster Linie mit Anticholinergika (Andersson 2004). Dazu werden zum Beispiel Oxybutenin oder Propiverin genutzt. Diese Pharmaka sind kompetitive Antagonisten an muskarinergen Acetylcholinrezeptoren, die durch postsynaptische Blockade auf den Muskelzellen der glatten Muskulatur die dadurch ausgelöste Kontraktion vermindert.

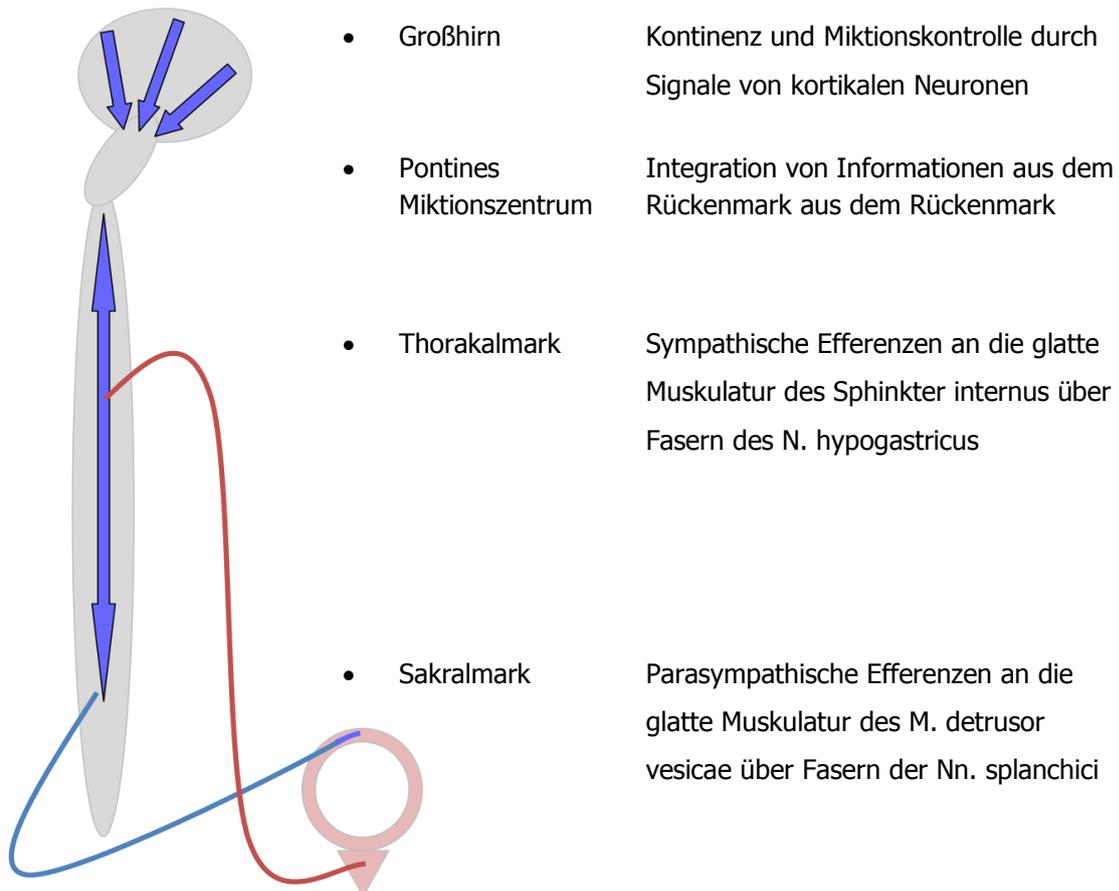


Abb. 1

### **Die vegetative Innervation der Blase.**

Die Blasenkontrolle geschieht durch Efferenzen aus dem Frontalhirn. Die Afferenzen aus der Blase bezüglich Füllungsdruck und – menge gelangen über parasymphatische (blau) und sympathische (rot) Fasern ins pontine Miktionszentrum. Hier geschieht die Verarbeitung von vegetativen Regelkreisen und supraspinalen, willentlichen Efferenzen. Der Miktionsreflex wird bei Ausreifung des zentralen Nervensystems willentlich unterdrückt, kann jedoch bei starken Reizen durch das vegetative Nervensystem bei pathologischen Zuständen spontan ablaufen.

#### 1.4. Adenosinrezeptoren in der Blase

Alle vier Rezeptortypen  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  und  $A_3$  wurden hinsichtlich ihrer molekularen Struktur, ihrer Pharmakologie und ihrer Kopplung an G – Proteine beschrieben (Fredholm et al. 2001). Der  $A_1$  – Rezeptor vermittelt über  $G_i$  – Proteine eine Hemmung der Adenylatcyclase. Weiterhin sind eine Aktivierung von Kaliumkanälen und eine Hemmung von N – Typ – Calciumkanälen bekannt. Die  $A_2$  – Rezeptoren, sowohl  $A_{2A}$  als auch  $A_{2B}$ , sind an einer Aktivierung der Adenylatcyclase über  $G_s$  – Proteine beteiligt. Ähnlich zum  $A_1$  – Rezeptor inhibiert auch der  $A_3$  – Rezeptor die Adenylatcyclase (Abb. 2). Es ist auch eine Stimulierung der Phospholipase C durch die Rezeptorsubtypen  $A_1$ ,  $A_{2B}$  und  $A_3$  bekannt. Über die Bildung von 3,4,5 – Inositoltriphosphat resultiert ein Anstieg der intrazellulären Calcium – konzentration (Polosa und Blackburn 2009; Abbracchio et al. 1995, Baraldi et al. 2000).

Adenosin liegt in geringer Konzentration ständig im Körper vor. Eine Quelle für Adenosin als Liganden kann die intrazelluläre Bildung und der sich anschließende extrazelluläre Transport sein. Viele Körperzellen besitzen Nukleosidtransportproteine, die Purine und Pyrimidine in den Extrazellulärraum transportieren können (Baldwin et al. 2004). Die Wirkung geht wahrscheinlich über das bloße Wiedergewinnen der Verbindungen hinaus, Purin– und Pyrimidinrezeptoren haben potentiell die Wirkung, neurosynaptische Übertragungen zu modifizieren. So kann Adenosin intrazerebral modulierend auf Schlaf, Drogen – und Alkoholabhängigkeit, Nociception und Analgesie wirken (King et al. 2006). Neben dem direkten Transport von Adenosin nach extrazellulär wird Adenosin auch extrazellulär gebildet, zum Beispiel durch Hydrolysierung von Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP) (Yu et al. 2011). Ob die Adenosinnukleotide an die Adenosinrezeptoren binden können, ist zweifelhaft. Eventuell findet zuvor ein Abbau der Nukleotide durch Nukleotidasen statt, sodass schließlich Adenosinnukleoside an die Adenosinrezeptoren binden (Fredholm et al. 2011; Yu et al. 2011). Diese Verbindungen gelangen nach extrazellulär durch Apoptose von Zellen (Elliott et al. 2009), durch Vesikelentleerung von Hormonen (Zhang et al. 2009) und durch Connexine (Hemikanäle) (Spray et al. 2006).

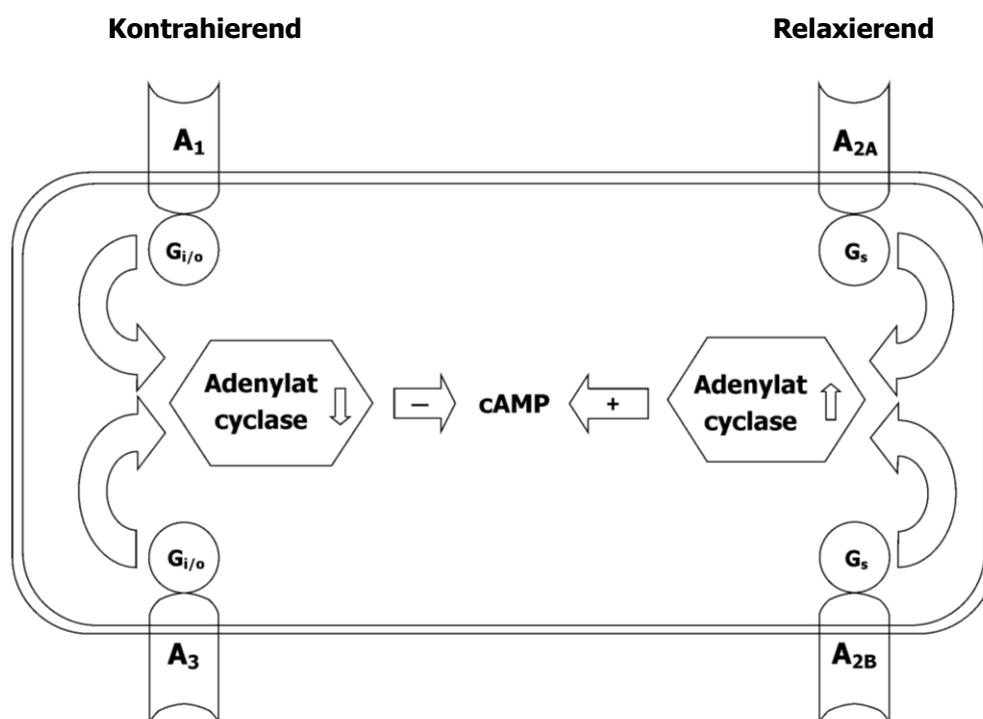


Abb. 2 **Schematische Darstellung der Adenosinrezeptoren und deren second messenger.**

Die vier Adenosinrezeptoren sind an G – Proteine gekoppelt und wirken entweder stimulierend ( $G_s$  – Proteine) oder inhibierend ( $G_{i/o}$  – Proteine) auf die Adenylatcyclase. So wird durch eine Modulierung der intrazellulären cAMP –Konzentration die Aktivität von Proteinkinasen gesteuert und Einfluss auf die Kontraktionskraft genommen.

Es ist zudem bekannt, dass Zellen bei Dehnungsreizen ATP freisetzen (Okada et al. 2006). Ebenso wie bei dem Bronchialepithel wird ATP auch aus dem Urothel der Urethra freigesetzt. In Ruhebindungen beträgt die Konzentration etwa 10 pM. Bei einem Dehnungsreiz kann diese Konzentration jedoch auf 100 – 600 pM ansteigen (Knight et al. 2002). Dieses ATP kann, wie zuvor bereits beschrieben mittels extrazellulärer Nucleotidasen zu Adenosin abgebaut werden. Die Nucleotidasen wurden in Gefäßepithel (Robson et al. 2005), Bronchialepithel (Garcia, Guilherme J M et al. 2011; Okada et al. 2006), Eileiterepithel (Strobel et al. 1996; Nagy et al. 1998) und Prostata nachgewiesen (Ronquist und Brody 1985). Das Urothel exprimiert Ektonucleotidasen und so ist es wahrscheinlich, dass der

Metabolismus von ins Lumen abgegebenem Nukleotiden zu Nukleosiden stattfindet (Yu et al. 2011). ATP löst seinerseits in der glatten Muskulatur eine Relaxation aus (Werkström und Andersson 2005). Die Relaxation durch Adenosin, jedoch nicht durch ATP wird durch den Adenosinrezeptorantagonisten 8-Phenyltheophylline gehemmt. Dies spricht für zwei verschiedene Wirkmechanismen. ATP scheint nicht ausschließlich über den Abbau zu Adenosin zu wirken sondern auch selbst als Transmitter (Pinna et al. 2005).

Die Prävalenz der überaktiven Blase steigt mit zunehmendem Alter (Schumacher 2006). Gerade deshalb ist es von Interesse, ob sich die kontraktile oder relaxierende Mechanismen in Abhängigkeit vom Alter verändern. Die Kontraktionsmechanismen werden von Wuest et al. altersabhängig untersucht. Dazu werden die Kontraktionskräfte von Blasen junger (< 12 Wochen alt) und ausgewachsener (> 40 Wochen) Schweine verglichen. Beschrieben ist, dass die maximale Kontraktionskraft bezogen auf die Muskelmasse bei jungen Tieren größer als bei ausgewachsenen ist. Dem gegenüber steht die Erkenntnis, dass Carbachol als muskarinerg Agonist bei den jungen Versuchstieren etwas weniger potent ist als bei den ausgewachsenen. Weiterhin sind geringe, jedoch nicht signifikante, altersabhängige Veränderungen in der Expression der  $M_2$ - und  $M_3$ -Rezeptoren zu beobachten (Wuest et al. 2008). Eine andere Veröffentlichung von Wüst et al. beschreibt die Änderungen von mRNA für  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $P2X_1$  und  $P2X_3$  in menschlichem Blasengewebe (Wuest et al. 2005). Es lassen sich keine relevanten Änderungen der funktionellen Wirksamkeit mit dem Alter nachweisen. Allenfalls wird eine leicht gesteigerte Sensitivität für alpha-beta-Methylen-ATP mit steigendem Alter erkennbar (Wuest et al. 2005). Yoshida et al. beschreiben einen altersabhängigen Anstieg der Atropin-resistenten Kontraktion in isoliertem humanem Blasengewebe. Ebenso zeigen sie einen signifikanten Anstieg des Anteils der purinergen Neurotransmission sowie einen signifikanten Rückgang der acetylcholinergen neuromuskulären Übertragung an der Kontraktion mit steigendem Alter (Yoshida et al. 2001).

Hieraus kann abgeleitet werden, dass auch die adenosinerge Relaxation der Blase einer altersabhängigen Änderung unterliegt und diese eventuell mit steigendem Alter eine wichtige Rolle übernimmt. Die Behandlung der überaktiven Blase besteht zur Zeit noch in einer Blockade der acetylcholinergen Nervenendigungen (Andersson 2004). In Zukunft könnten Medikamente, die in die purinerge Signalübermittlung eingreifen hier ihren Einsatz

finden. Dadurch könnte eventuell die Anzahl unerwünschter Nebenwirkungen reduziert werden.

Ziel dieser Arbeit ist es nun den Effekt von Adenosin auf die Motilität des Detrusors bei jungem und altem Rattengewebe zu untersuchen. Um die relaxierende Wirkung von Adenosin zu quantifizieren, wird zum einen eine Relaxation durch Adenosin auf vorkontrahierte Detrusor – Muskelstreifen aufgezeichnet, zum anderen die verbliebene Kontraktionskraft nach Vorinkubation mit Adenosin gemessen.

Weiterhin erfolgt mittels real time Polymerase Ketten Reaktion (rt PCR) die quantitative Bestimmung der Expression der Adenosinrezeptoren, um eine molekulare Ursache für eine veränderte Adenosinwirksamkeit zu ermitteln.

## 2. Materialien

### 2.1. Chemikalien

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Merck KGaA
Adenosin	Tocris Bioscience
Akasolv water bath protection	Carl Roth GmbH und Co.KG
Aqua bidest. RNase / DNase frei	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Aqua dest.	Purelab Ultra, ELGA
Calciumchlorid Dihydrat	Merck KGaA
Carbamoylcholinchlorid	Tocris Bioscience
Carbogen – Gas (95 Vol% O <sub>2</sub> , 5 Vol% CO <sub>2</sub> )	Linde
Chloroform	Sigma Aldrich Chemie GmbH
D-(+)-Glucose, wasserfrei	Carl Roth GmbH und Co.KG
Diethylpyrocarbonat – Wasser (DEPC)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Diethylether	J.T. Baker
Dimethylsulfoxid	Merck KGaA
Desoxy – Nukleotid – Triphosphat Mix (je 10 mM)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ethanol (70 %, 100 %)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Isopropanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Kaliumchlorid	Merck KGaA
Magnesiumchlorid	Merck KGaA
Magnesiumsulfat	SERVA Elektrophoresis GmbH

Moloney murine leukemia virus Reaktionspuffer	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Moloney murine leukemia virus Reverse Transkriptase (200 U/ $\mu$ l)	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Natriumchlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Natriumhydrogencarbonat	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA
Natriumhydrogenpyruvat	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Natriumhydroxidlösung	Merck KGaA
Natriumpyruvat	Sigma Aldrich Chemie GmbH
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	Qiagen Inc., Valencia, CA, USA
Random Hexamere (3 $\mu$ g/ $\mu$ l)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
RNasin Plus RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Salzsäure	Merck KGaA
Trizol <sup>®</sup>	Invitrogen
Y 27632-Dichlorid ((1R,4r)-4-((R)-1-aminoethyl)-N-(pyridin-4-yl)cyclohexanecarboxamid)	Tocris Bioscience

## 2.2. Lösungen

### *Präparierlösung*

<b>Chemikalie</b>	<b>Konzentration in mM</b>
Natriumchlorid	120
Kaliumchlorid	4,5
Dinatrium – EDTA	0,025
Glucose	5,5
HEPES	5,0

### *Organbadstandardlösung*

Zur Herstellung der Organbadstandardlösung werden zunächst 4 l destilliertes Wasser in ein 5 l fassendes Becherglas gegeben. Die Zugabe der Chemikalien erfolgt unter Rühren mittels eines Rührmagneten. Die nachgenannten Werte zeigen die abschließenden Konzentrationen in der Organbadstandardlösung.

<b>Chemikalie</b>	<b>Konzentration in mM</b>
Natriumchlorid	120
Kaliumchlorid	4,7
Calciumchlorid	2,5
Magnesiumchlorid	1,2
Natriumhydrogencarbonat	30
Natrium – EDTA	0,5
Glucose	5,5
Natriumhydrogenpyruvat	2,0

Nach Zugabe aller Chemikalien erfolgt die Verwendung der Lösung im Organbad.

### 2.3. PCR Primer

**Tab. 1 Basensequenzen der verwendeten Primer**

Gen	Forward primer	Reverse primer
<b>A1</b>	TGACCCTTGAAACCATGTGA	TCGAGGGGTTACTTGTCCCTA
<b>A2A</b>	AAACACAGTGTGGCTCATT	CAGGTCCCATGAGAGAGATTAG
<b>A2B</b>	GGCACAACATGGGTGTGTAAGT	CAGCATTAGGACCAGCAAGACA
<b>A3</b>	CCCTCCCGCTTCATTTATTT	CCCTCAACGTTCACTCCATT
<b>GAPDH</b>	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG
<b>S – 18</b>	CCGCAGCTAGGAATAATGGA	CCCTCTTAATCATGGCCTCA

### 2.4. Software

Zur Erfassung der Messwerte wird das Programm Lab Chart 7 (ADI Instruments Inc., Colorado Springs, CO, USA) verwendet.

Die PCR – Auswertung erfolgt mittels ep mastercycler (Software realplex 2.2, Eppendorf, Hamburg, Germany).

Die statistische Auswertung erfolgt mit Microsoft Excel sowie SPSS Statistics 20 (IBM, Armonk, NY, USA). Als statistische Signifikanztests wird der Student – t – Test für paarweise Vergleiche gewählt, für Mehrfachvergleiche die Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni post – hoc – Test.

Zur Textverarbeitung dient Microsoft Word 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA) sowie zur Literaturverwaltung Citavi 4 (Swiss Academic Software, Wädenswil, Zürich).

## 2.5. Geräte

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Automatisches Organbad	Panlab
Faden, geflochten, nicht resorbierbarer	Dermafil Green Polyester
Guillotine (small animal decapitator)	Stoelting
Handschuhe	Kimberly – Clark, Sterling Nitrile,
Kanülen (23G 1 Nr. 16 , 0,6 x 25 mm, REF 300800)	BD Microlance 3 ,
Kühl – und Gefrierschrank	Liebherr
Magnetrührer	RH basic 2
Messwandler	Panlab, Modelnr.: MLT0201
Pipetten	Eppendorf Research
Pipettenspitzen (2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1 ml, 10 ml)	greiner bio – one
Pinzette	Geuder
Powerlab 4/30	ADInstruments
Purelab Ultra	ELGA
Quad Bridge Amp	ML224, ADInstruments
Reaktiongefäße (0,5 ml, 1,5 ml)	Eppendorf Research
Scheren, chirurgisch	dimedica und Geuder
Thermostat	Panlab, LE 13206
Realplex 2	Eppendorff
Zentrifuge	Eppendorff
100 ml Bechergläser	Rasotherm
5 l Becherglas	vitlab

## **2.6. Versuchstiere**

Bei allen mit dieser Arbeit verbundenen Experimenten werden unbehandelte und gesunde Wistar – Ratten beider Geschlechter verwendet, die zwischen 10 und 211 Tagen alt sind. Die Haltung erfolgte nach den vorgegebenen Richtlinien für Labortiere.

## 3. Methoden

Als Methoden dienen zum einen das Organbad, zum anderen die Polymerase – Kettenreaktion.

### 3.1. Organbad

Die Versuchstiere werden zunächst mit Diethyleter narkotisiert und danach dekapitiert. Die Bauchhöhle wird mit einer chirurgischen Schere und einer chirurgischen Pinzette eröffnet, die Harnblase freipräpariert und am Übergang von Harnblase zu Urethra exzidiert. Das Präparat wird in ein Becherglas mit auf 4 °C gekühlter Präparationslösung überführt. Auf diese Weise wird die Funktionsfähigkeit des Gewebes für einige Stunden gesichert. Durch die geringe Calciumkonzentration (0,5 mM) können spontane Kontraktionen verhindert werden, was den Metabolismus senkt. Zudem wirkt die niedrige Temperatur senkend auf die Metabolisierungsrate des Gewebes. Die Blase wird in einer Petrischale mit Kanülen aufgespannt und vom unteren Pol funduswärts eröffnet. Eventuelle angelagerte Organe wie Prostata, Samenblase bzw. die Serosa mit perivesikalem Fett werden abpräpariert. Danach erfolgt eine Teilung des Organs in 2 (bei jungen Tieren) bis 4 schmalen Streifen (bei älteren Tieren). Diese Streifen sind im ursprünglichen Präparat longitudinal orientiert. Teile der Blasenmuskulatur werden in flüssigem Stickstoff zur späteren Analyse mittels PCR eingefroren und bei – 80 °C gelagert. Die Blasenfragmente werden an beiden Enden gefasst und mit Kanülen aufgespannt. Mit 2 Nylonfadenschlaufen wird das Präparat vertikal in die Versuchsanordnung eingehängt. Dabei ist die untere, kürzere Schlaufe im Präparathaken fixiert, die obere, längere wird über die Aufnahme des mechanoelektrischen Messwandlers gelegt. Dieser wandelt die isometrische Kraftänderung der glatten Muskulatur in ein elektrisches Signal um, welches, durch den Quad Bridge Amplifier verstärkt, mit Lab Chart auf einem Computer dargestellt und aufgezeichnet wird. Zur weiteren Betrachtung der aufgezeichneten Kräfte erfolgt die Darstellung in mN. Hierzu wird ein Umrechnungsfaktor durch Eichung mittels eines bekannten Gewichtes bestimmt.

Das Präparat ist bei befüllten Kammern dauerhaft und vollständig von der Organbadlösung bedeckt. Es folgt das Füllen der einzelnen Organbadkammern mit 25 ml der Organbadstandardlösung. Ein großes Vorratsgefäß ist oberhalb des Organbad platziert, sodass die Lösung durch die Schwerkraft ventilgesteuert in das Organbad läuft und auch von

dort wieder hinaus in ein Auffanggefäß. Durch eine mit einem Thermostaten verbundene Heizeinrichtung wird eine konstante Temperatur von 37 °C im Organbad gehalten. Zusätzlich erfolgt eine Begasung mit Carbogen, das sich aus 95 Vol% Sauerstoff und 5 Vol% Kohlenstoffdioxid zusammensetzt. Eine Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff wird so sichergestellt und eine zusätzliche pH – Wert – Pufferung ermöglicht. Die Begasung wird so eingestellt, dass die Gewebestücke nicht zu viel Auftrieb erhalten und sich ruhig in der Lösung befinden, um die Artefakte durch Bewegungen der Präparate zu minimieren. Nach Einhängen der Gewebefragmente erfolgt eine dreißigminütige Äquilibration um eine möglichst vollständige Entspannung der Muskulatur zu erreichen. Als Äquilibrationkriterium wird das Monitoring einer horizontalen Baseline definiert. Falls notwendig werden vor Beginn der Versuche die einzelnen Präparate nachgespannt, um eventuelle Totwege der Präparate zu eliminieren.

Vor Beginn der Messungen werden die eingespannten Blasenfragmente auf ihre Funktionsfähigkeit getestet. Dazu wird je 1 ml 1,5 M konzentrierte Kaliumchloridlösung in jede Kammer gegeben. So steigt die Konzentration von Kalium in den Kammern auf 60 mM. Als Kriterium der Funktionsfähigkeit wird eine prompte, kräftige Kontraktion vorausgesetzt. Sollte diese nicht erfolgen wird das jeweilige Gewebestück verworfen. Durch drei – bis viermaligen Austausch der Organbadlösung wird das Kaliumchlorid aus der Lösung entfernt. Die Präparate erhalten die Möglichkeit sich wieder zu entspannen bis erneut eine Baseline mit ihrem Ruhetonus aufgezeichnet wird. Nun kann mit der Zugabe der Agonisten und Antagonisten begonnen werden. Bei den eingesetzten Stoffen handelt es sich um Adenosin (0,4 µM – 400 µM), Carbachol (0,1 µM – 100 µM), Kaliumchlorid (30 M) und Y 27632 (10 nM). Es werden Stammlösungen aller Chemikalien hergestellt. Die Konzentrationen der Stammlösungen betragen: Adenosin 10 mM, Carbachol 25 mM, Kaliumchlorid 1,5 M und Y 27632 2,5 µM. Mit Aqua dest. erfolgt die Lösung und Verdünnung auf die benötigte Konzentration. Die nötigen Mengen zum Erreichen der gewünschten Konzentrationen sind in Tabelle 2 abzulesen. Die Zugabe der Stoffe erfolgt parallel in allen 4 Kammern.

**Tab. 2      Verwendete Chemikalien und Auflistung der Konzentrationen mit resultierenden Konzentrationen im Organbad.**

Konzentration der Verdünnungsreihe	Zugegebene Menge in $\mu\text{l}$	Konzentration im Organbad
<b>Kaliumchlorid</b>		
<b>1,5 M</b>	1000	60 mM
<b>1,5 M</b>	500	30 mM
<b>Y 27632</b>		
<b>2,5 <math>\mu\text{M}</math></b>	100	10 nM
<b>Carbachol</b>		
<b>0,025 mM</b>	100	0,1 $\mu\text{M}$
<b>0,1 mM</b>	100	0,4 $\mu\text{M}$
<b>0,25 mM</b>	100	1,0 $\mu\text{M}$
<b>1,0 mM</b>	100	4,0 $\mu\text{M}$
<b>2,5 mM</b>	100	10 $\mu\text{M}$
<b>10 mM</b>	100	40 $\mu\text{M}$
<b>25 mM</b>	100	100 $\mu\text{M}$
<b>Adenosin</b>		
<b>0,01 mM</b>	100	0,01 $\mu\text{M}$
<b>0,025 mM</b>	100	0,4 $\mu\text{M}$
<b>0,1 mM</b>	100	1,0 $\mu\text{M}$
<b>0,25 mM</b>	100	4,0 $\mu\text{M}$
<b>1 mM</b>	100	10 $\mu\text{M}$
<b>1 mM</b>	400	40 $\mu\text{M}$
<b>1 mM</b>	1000	100 $\mu\text{M}$

Die Untersuchung der Wirkung von Carbachol auf die Blasenmuskulatur wird nachfolgend beschrieben: Nach Funktionsprüfung der Organpräparate wird eine der insgesamt 7 unterschiedlichen Konzentrationen Carbachol zugegeben. Die Beobachtungszeit beträgt 15 Minuten. Danach werden die Kammern wiederum drei – bis viermal mit neuer Organbadlösung gespült. Um die Wirkung des rho – Kinase – Inhibitors Y 27632 zu quantifizieren, wird zunächst Y 27632 bis zu einer Organbadkonzentration von 10 nM in das Organbad gegeben. Nach 15 Minuten erfolgt die Zugabe von Carbachol in einer zufällig ausgewählten Konzentration. Der übrige Ablauf stimmt mit dem oben genannten Ablauf zur Testung von Carbachol überein.

Die Zugabe von Adenosin erfolgt jeweils vor oder nach der Kontraktionsauslösung mit Kaliumchlorid. Bei Gabe von Adenosin nach Kaliumchlorid wird wie folgt verfahren: Zuerst wird eine Kontraktion mit Kaliumchlorid (30 mM im Organbad) ausgelöst. Nach anfänglicher überschießender Kontraktion stellt sich nach ca. 3 Minuten ein Gleichgewicht in der Kontraktionskraft ein. 5 Minuten nach Kaliumchloridgabe erfolgt die Zugabe von Adenosin. Es folgt eine 15 – minütige Beobachtungszeit und hiernach werden alle Kammern drei – bis viermal gespült. Vor Testung mit Adenosin wird zufällig ein Präparat ausgewählt, welches in der Folge ohne Adenosinzugabe bleibt. Dieses Präparat dient der Negativ – Testung und wird als Zeitkontrolle bezeichnet.

Bei Gabe von Adenosin vor Kaliumchlorid beträgt die Inkubationszeit 3 Minuten. Danach erfolgt die Zugabe von Kaliumchlorid (30 mM im Organbad). Die Beobachtungszeit beträgt ebenfalls 15 Minuten. Nach jedem Durchgang werden alle Kammern drei – bis viermal mit neuer Organbadlösung gespült um die zugegebenen Stoffe auszuwaschen. Nach einer Ruhezeit von wiederum 20 – 25 Minuten folge der nächste Durchgang. Insgesamt werden nach diesem Ablauf 7 Durchgänge durchgeführt. Die applizierte Adenosinmenge wird zufällig aus einer der in Tabelle 2 aufgeführten ausgewählt.

Die Ausmessungen in Lab Chart werden direkt durchgeführt. Vor den Kontraktionen, sei es durch Kaliumchlorid oder durch Carbachol verursacht, ist die gemessene Kraft bei Aufzeichnung der Baseline der Ausgangswert. Die Kontraktionskraftänderung wird als Betrag der Differenz zwischen Ausgangswert und maximaler Kontraktionskraft bestimmt.

Die gemessene Kontraktionskraftänderung wird prozentual auf die Erste, durch Kaliumchlorid hervorgerufene Kontraktion, bezogen. So kann auf eventuell unterschiedlich

angeordnete Muskelzüge in der Blase und dadurch hervorgerufene unterschiedliche absolute Kräfte reagiert werden. Bei den Versuchen hinsichtlich der Adenosinwirkung wird die Modifikation der Kontraktionskraft unter Einfluss von Adenosin immer auf die zuvor durch Kaliumchlorid ausgelöste Kontraktion bezogen. So ergibt sich eine Auftragung der verbleibenden prozentuellen Kontraktionskraft unter Adenosinwirkung abhängig von der verwendeten Adenosinkonzentration. Für die Gabe von Adenosin vor Kaliumchlorid – applikation wird die verminderte Kontraktionskraftänderung auf die initiale, durch 30 mM KCl, ausgelöste Kontraktion bezogen. So ergeben sich ebenfalls prozentuale Werte, die die verbliebene Kontraktionskraft angeben.

Mittels der Boltzmann – Funktion (Gleichung 1) lässt sich der sigmoidale Verlauf der experimentell bestimmten Dosis – Wirkungs – Kurve darstellen. Hierbei entspricht A2 dem Maximalwert, A1 dem Minimalwert,  $x_0$  dem Wendepunkt des Graphen und d dem maximalen Anstieg des Graphen. Der Wendepunkt  $x_0$  entspricht der Konzentration mit halbmaximaler Wirkung, der ED<sub>50</sub>.

$$y = A1 + \frac{A2 - A1}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^d}$$

<b>Gleichung 1:</b>	Boltzmann – Funktion
	A1 Minimaler Kontraktionswert
	A2 Maximaler Kontraktionswert
	$x_0$ Wendepunkt (ED <sub>50</sub> )
	d maximaler Anstieg des Graphen
	x verwendete Adenosinkonzentration
	y Kontraktionskraft

### 3.2. Polymerase – Kettenreaktion

Die Polymerase – Kettenreaktion (PCR) wird mit Gewebe von Wistar – Ratten durchgeführt. Deren Blasenfragmente waren zu den Organbadversuchen verwendet worden. Zur Gewinnung der RNA werden die Proben aus dem – 80 °C Tiefkühler genommen und bei möglichst geringen Temperaturen um den Gefrierpunkt in ihren 1,5 ml Reaktionsgefäßen manuell in TRIzol® zerstoßen. Um die geringe Temperatur zu halten, werden die Reaktionsgefäße in einem zuvor bei – 20 °C gekühltem metallenen Ständer aufbewahrt. Nach Vorversuchen, in denen die maschinelle Zerstoßelung und das Zermörsern in flüssigem Stickstoff getestet wurden, erweist sich die manuelle Methode am erfolgreichsten. Wenn das TRIzol® trübe wird oder keine festen Gewebefragmente mehr zu erkennen sind, kann das Zerkleinern als abgeschlossen betrachtet werden. Es erfolgt die Zugabe von Chloroform, die Proben werden 10 Sekunden geschüttelt. Anschließend wird das Gemisch für 3 Minuten inkubiert. Danach wird das Gemisch 15 Minuten bei 14000 relativen Zentrifugalkräften (rcf) und 4 °C zentrifugiert. Während der Zentrifugation trennt sich das Gemisch in zwei Phasen auf. Die klare, obere organische Phase wird in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, der Rest wird zur weiteren Lagerung wieder eingefroren. Zu der klaren Phase werden 400 µl Isopropanol zugegeben. Es folgt eine weitere Inkubation über 10 Minuten. Dann wird das Gemisch erneut 10 Minuten bei 14000 rcf zentrifugiert. Der Überstand wird danach vollständig verworfen. Es folgt das zweimalige Waschen des Pellets, das die konzentrierte RNA enthält, mit 75 Vol% Ethanol. Nach abschließendem, kurzem Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes wird das Pellet auf einem Filterpapier getrocknet. Das getrocknete Pellet wird anschließend in 30 µl DEPC – Wasser gelöst und erneut bei – 80 °C eingefroren.

Der nächste Schritt besteht in der Generierung einer cDNA aus der zuvor gewonnen mRNA. Dazu werden 2 µl aus dem aufgetauten mRNA – DEPC – Wasser – Gemisch entnommen und in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es werden 1 µl Random Hexamere und 11 ml Aqua bidest. hinzugefügt. Anschließend erfolgt eine Inkubation über 5 Minuten bei 70 °C, danach wird das Gemisch sofort auf Eis gestellt. Es folgt die Zugabe von 4 ml M – MLV Reaktionspuffer, 1 µl dNTP – Mix, 0,5 µl RNasin Plus RNase Inhibitor und 1 µl M – MLV Reverse Transkriptase. Dieser Ansatz wird anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur und schließlich 40 Minuten bei 40 °C inkubiert. Die Reverse Transkriptase generiert unter

diesen Bedingungen aus den RNA – Strängen cDNA. Diese cDNA kann anschließend mittels PCR analysiert werden.

Aus cDNA –spezifischen Primern (20 µM) und QuantiFast SYBR Green PCR Kit wird ein Mastermix hergestellt. Jeweils 1 µl der cDNA eines Versuchstieres wird in eine Vertiefung einer 96–well PCR–Lochplatte gegeben, hinzukommen 10 µl SYBR Green M, 8 µl Aqua bidest. und 1 µl spezifische Primer (jeweils 0,5 µl Reverse – und Forward –Primer). Es werden 40 Zyklen bei 95 °C mit Hilfe des Thermozyklers realplex<sup>2</sup> durchlaufen, 2 Minuten Dauer im ersten Zyklus, für alle weiteren Zyklen 15 Sekunden Dauer. Hiernach folgt die Primerhybridisierung für 15 Sekunden bei dem für die jeweiligen Primer zuvor ermittelten Temperaturoptima ( $A_{1/A_{2A}}$  53,0 °C,  $A_{2B}$  57,5 °C,  $A_3$  52,0 °C). Diese werden mittels Temperaturgradient – PCR ermittelt. Die Amplifikation der DNA wurde durch Fluoreszenz des Farbstoffes SYBR Green gemessen. Dies geschieht nach jedem Zyklus in Echtzeit. Daher wird diese Methode auch als real time PCR (rt PCR) bezeichnet. Zudem ist durch die Fluoreszenzmessung eine semiquantitative Auswertung möglich. Die Bestätigung der PCR – Produkte erfolgte durch Schmelzkurvenauswertung.

### *Effizienzbestimmung und Normierung*

Die Analyse der cDNA wird abschließend mittels real time PCR durchgeführt. Als House – keeping – Gen werden die Gene für die S – 18 – Unterheit und für die Glycerinaldehyd – 3 – phosphat – Dehydrogenase gewählt (Kim et al. 2011). In den Gewebeproben wird mittels quantitativer PCR die Menge an enthaltener Adenosinrezeptor – mRNA bestimmt um so einen Rückschluss auf die Expression der Adenosinrezeptoren zu erhalten. Um eine quantitative Bewertung vornehmen zu können, werden die mRNA – Expressionswerte mit Hilfe der House – keeping – Gene normiert. Dazu sei angenommen, dass die Expression der House – keeping – Gene interindividuell und unabhängig vom Alter konstant bleibt. Eventuelle Schwankungen der Probenmenge und des Zellgehaltes bzw. RNA – Gehaltes werden rechnerisch durch die Normierung auf das House – keeping – Gen ausgeglichen. Durch diese Umformungen kann die Expression der 4 Adenosinrezeptoren zwischen den unterschiedlichen Versuchstieren verglichen werden.

Zu Beginn werden die Temperaturoptima für die verschiedenen Primer ermittelt. Dazu wird ein Temperaturgradient über eine 96 – well Platte gelegt, der von 50 °C bis 62 °C reicht. Die Temperatur, bei der der geringste Ct – Wert ermittelt wird, sei optimal. Für die Rezeptoren

$A_1$  und  $A_{2a}$  wird ein Temperaturoptimum bei 53 °C gemessen, für den  $A_{2b}$  – Rezeptor beträgt dieses 57,5 °C und für den  $A_3$  – Rezeptor 52 °C.

Es folgt eine Effizienzbestimmung der Primer. Dazu werden Verdünnungsreihen mit cDNA verschiedener Tiere hergestellt. Die Verdünnungen betragen, neben der Stammlösung, 1:4, 1:16 und 1:256 (Teile Stammlösung zu Teilen Wasser). Die Ct – Werte werden in Abhängigkeit zur Konzentration aufgetragen. Mittels des Anstieges der Regressionsgraden sei nach Gleichung 2 die Effizienz des jeweiligen Primers zu bestimmen.

$$E = 10^{-\left(\frac{1}{m(Regr)}\right)}$$

**Gleichung 2: Effizienzbestimmung (Pfaffl 2001)**

E Effizienz

m Anstieg der Regressionsgeraden

Eine Effizienz E von 2 entspricht einer 100 prozentigen Amplifizierung durch die Taq – Polymerase und würde das Optimum bedeuten. Die ermittelten Effizienzen liegen im Bereich 1,95 bis 2,14. Werte größer 2 würden jedoch bedeuten, dass mehr als eine Verdoppelung von DNA – Strängen stattfindet. Die ermittelten Werte liegen wahrscheinlich in erschwerter Registrierung der Ct – Werte bei höheren Verdünnungen begründet. Für einzelne Präparate zeigen sich in der Verdünnung 1:256 nach 40 Zyklen keine Anstiege der Fluoreszenz. Da Effizienzen größer 2 nicht möglich sind werden für weitere Berechnungen eine ideale Effizienz von 2 angenommen.

Für den Vergleich der Adenosinrezeptoren erfolgt die Potenzierung der ermittelten Ct – Wertdifferenzen zwischen Adenosinrezeptor und House – keeping – Gen über die Basis 2 (Gleichung 3).

$$\text{Ratio} = 2^{Ct(\text{Zielgen}) - Ct(\text{HKG})}$$

**Gleichung 3: Ermittlung des Verhältnisses zwischen relativer Expression der Zielgens zu House – keeping – Gen.**

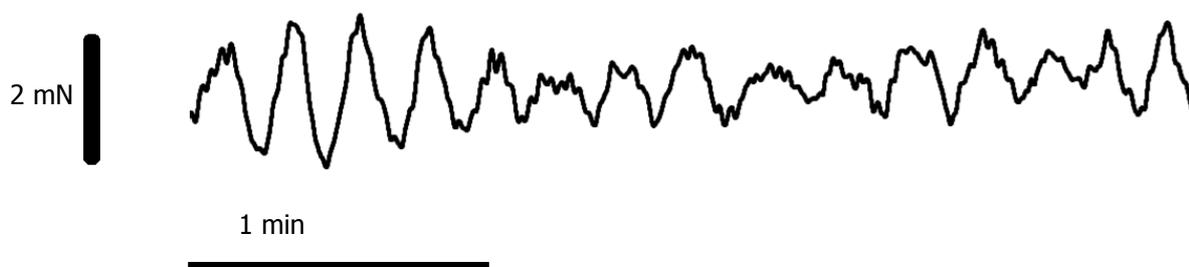
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Organbad

Zu Beginn wird die Wirkung des Acetylcholinagonisten Carbachol auf die Blasenmuskulatur untersucht. Diese Versuche dienen dazu, sich mit der Methode des Organbads und des Präparierens des Gewebes vertraut zu machen. Es wird zunächst eine Dosis – Wirkungs – Kurve des M – Rezeptor – Agonisten Carbachol erstellt. Weiterhin erfolgt die Betrachtung des Einflusses auf die Kontraktionskraft der Blasenmuskulatur des rho – Kinase – Inhibitors Y 27632.

#### 4.1.1. Vorbetrachtungen

Die Blasenfragmente zeigen in Ruhe einen Grundrhythmus mit 3 bis 4 Kontraktionen pro Minute. Die Amplitude beträgt dabei bis zu 4 mN (Abb. 3). Einige dagegen zeigen einen wenig geordneten Grundrhythmus, die Amplitude beträgt teilweise weniger als 1 mN.

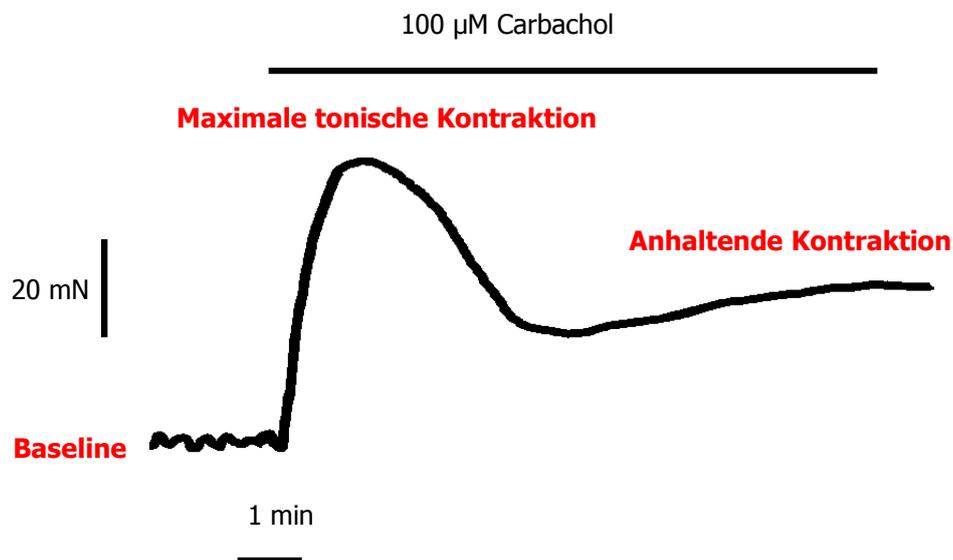


**Abb. 3** Aufzeichnung des Verlaufes von Spontankontraktionen im Ruhetonus eines Blasenfragmentes.

Es sind rhythmische Kontraktionen geringer Intensität mit einer Frequenz von ca. 4 Kontraktionen/Minute zu erkennen.

Bei Zugabe von Carbachol zeigen alle Proben eine Kontraktion, die zwischen 55 Sekunden und 242 Sekunden ihr Maximum erreicht. Dabei unterscheiden sich diese Kontraktionen vom Ablauf. Je höher die Dosis Carbachol, desto schneller erreicht die Kontraktion ihr Maximum. So beträgt die Zeit, von Gabe bis zum Maximum der Kontraktion bei einer Carbacholkonzentration von  $100 \mu\text{M}$   $55 \text{ s} (\pm 9 \text{ s})$ , bei  $40 \mu\text{M}$   $60 \text{ s} (\pm 8 \text{ s})$  und steigt bis auf  $242 \text{ s} (\pm 71 \text{ s})$  bei einer Carbacholkonzentration von  $0,1 \mu\text{M}$  (Abb. 4 und 5). Bei höheren Dosen ( $> 4 \mu\text{M}$  Carbachol) ist zu Beginn eine überschießende Kontraktion zu erfassen. Die

phasischen Komponenten der Grundaktivität sind nun nicht mehr erkennbar. Bei allen Präparaten stellt sich nach 4 bis 5 Minuten eine konstante, neue Baseline ein. Hier tritt erneut der Grundrhythmus auf und zeigt Frequenzen wie zu Beginn (3 – 4 Kontraktionszyklen pro Minute) (Abb. 3).

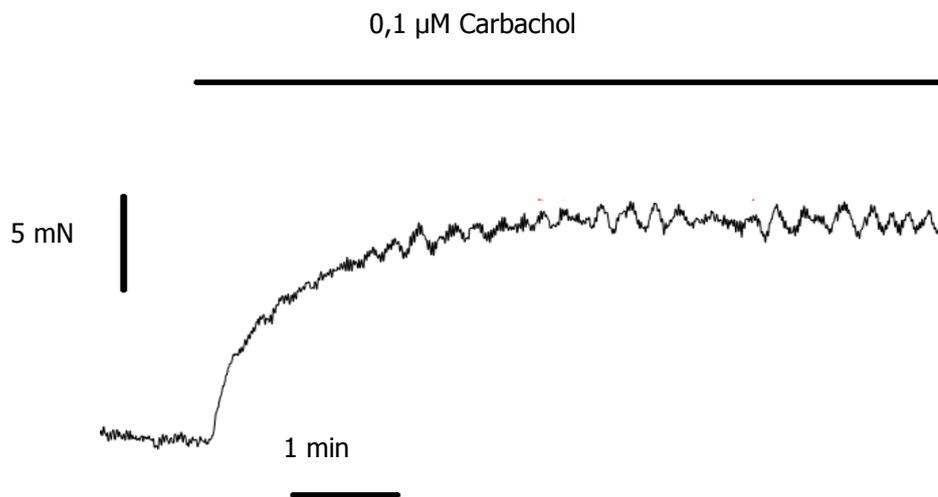


**Abb. 4 Verlauf der Kontraktionskraft nach Zugabe von Carbachol.**

Es zeigen sich ein rascher Anstieg des Tonus und eine überschießende tonische Kontraktion. Nach etwa 3 Minuten stellt sich ein Gleichgewicht ein und die Grundrhythmik der Spontankontraktionen ist wieder zu erkennen.

Mit abnehmenden Dosen Carbachol verringert sich die maximal erreichte Kontraktionskraft dosisabhängig. Bei geringeren Konzentrationen Carbachol erfolgt eine Bindung von weniger Molekülen an die muskarinergen Acetylcholinrezeptoren und somit eine geringere Aktivierung kontraktile Prozesse. Bei Dosen von 1 µM Carbachol im Organbad wird nur in 3 von 13 Messungen eine überschießende Kontraktion ausgelöst. Für die verwendeten Kontraktion von 0,4 µM und 0,1 µM zeigt sich ausschließlich eine langsame Anhebung des Grundtonus auf ein höheres Niveau (Abb. 5). Zur genauen Bestimmung der pharmakologischen Eigenschaften werden die Blasenfragmente verschiedenen Konzentrationen Carbachol ausgesetzt (0,1 µM, 0,4 µM, 1 µM, 4 µM, 10 µM, 40 µM, 100 µM). Die erhaltenen Mittelwerte der Kontraktionskräfte aus Messungen mit 8 Versuchstieren werden in einem Dosis – Wirkungsdiagramm aufgetragen (Abb. 6, ungefüllte

Kreise). Die Punkte liegen sigmoidal verteilt. Bei diesen Versuchen zeigt sich eine Abhängigkeit der Kontraktionskraft von der zugegebenen Carbacholmenge.



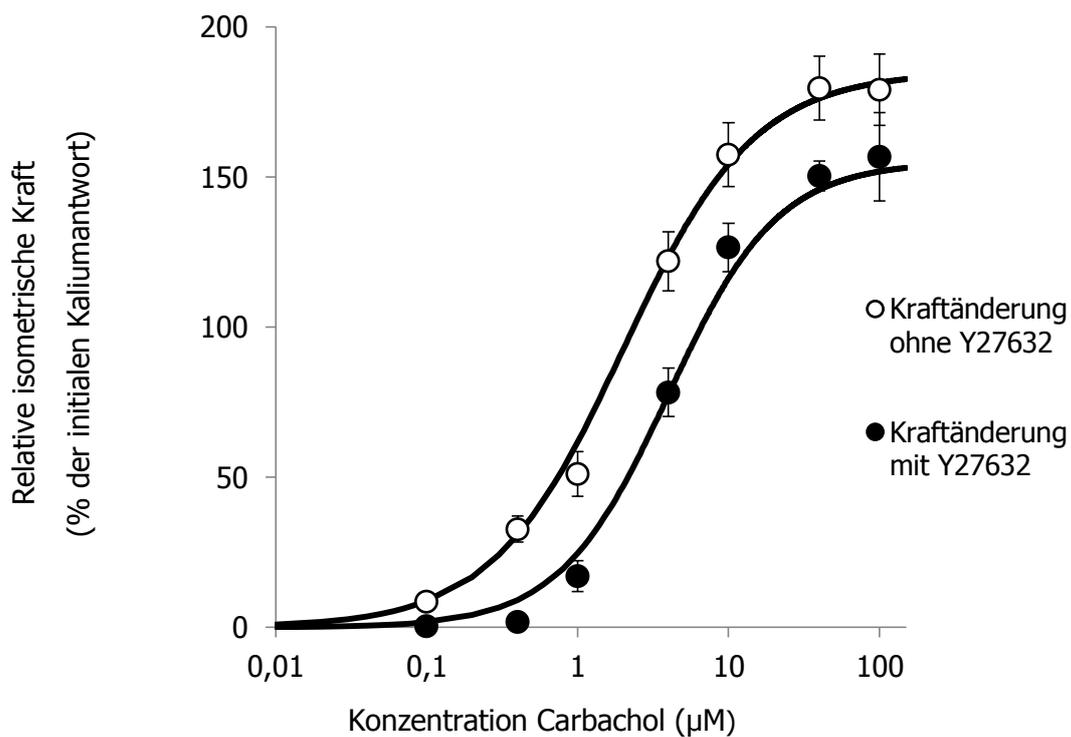
**Abb. 5 Verlauf der Kontraktionskraft nach Zugabe von Carbachol.**

Es zeigt sich ein langsamerer Anstieg des Tonus verglichen mit 100 µM Carbachol. Eine überschießende tonische Kontraktion lässt sich nicht beobachten. Die Grundrhythmik der Spontankontraktionen ist allenfalls während der ersten Minute nicht zu erkennen, kehrt aber zügig zurück. Eine überschießende Kontraktion wird nicht verzeichnet.

Bei Konzentrationen von 0,1 µM Carbachol kann im Mittel eine Anhebung der Kraft auf 9 % ( $\pm 1$  %), bezogen auf die initiale Kaliumchloridkontraktion, beobachtet werden. Die Kraft steigt mit zunehmender Carbacholkonzentration auf 131 % ( $\pm 15$  %) bei 4 µM und weiter auf 178 % ( $\pm 11$  %) bei 10 µM Carbachol. Maximal wird eine relative Kraft von 180 % ( $\pm 16$  %) bei einer Carbacholkonzentration von 100 µM beobachtet. Bei Erhöhung der Konzentration von 10 µM (157 %) auf 40 µM (179 %) und schließlich auf 100 µM wird kein signifikanter Anstieg der Kraftänderung mehr beobachtet, sodass davon ausgegangen werden kann, dass hier keine weitere Kraftzunahme mit weiterer Steigerung der Carbacholkonzentration erzielt werden kann. Die Konzentration mit halbmaximalem Effekt, die  $ED_{50}$ , wird bei einer Carbacholkonzentration von 2,5 µM ermittelt.

#### 4.1.2. Einfluss des rho – Kinase – Inhibitor Y 27632

Der rho – Kinase – Inhibitor Y 27632 führt zu einer Verringerung der Kontraktionskraft. Während Carbacholdosen von 0,1  $\mu\text{M}$  und 0,4  $\mu\text{M}$  bei alleiniger Gabe eine deutlich messbare Kontraktion (9 %, 36 %) auslösen, sind bei vorheriger Gabe von Y 27632 die Kontraktionen für diese Carbacholkonzentrationen im Fehlerbereich und als nicht signifikant verschieden von 0 % zu werten. Signifikant verringerte Kontraktionen werden bei vorheriger Gabe von Y 27632 und Carbacholdosen von 1  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$  ermittelt. Die  $\text{ED}_{50}$  für Carbachol mit vorheriger Gabe von Y 27632 beträgt 4  $\mu\text{M}$  (Abb. 6).



**Abb. 6 Vergleich der Dosis – Wirkungsbeziehung von Carbachol mit und ohne rho – Kinase – Inhibitor Y 27632.**

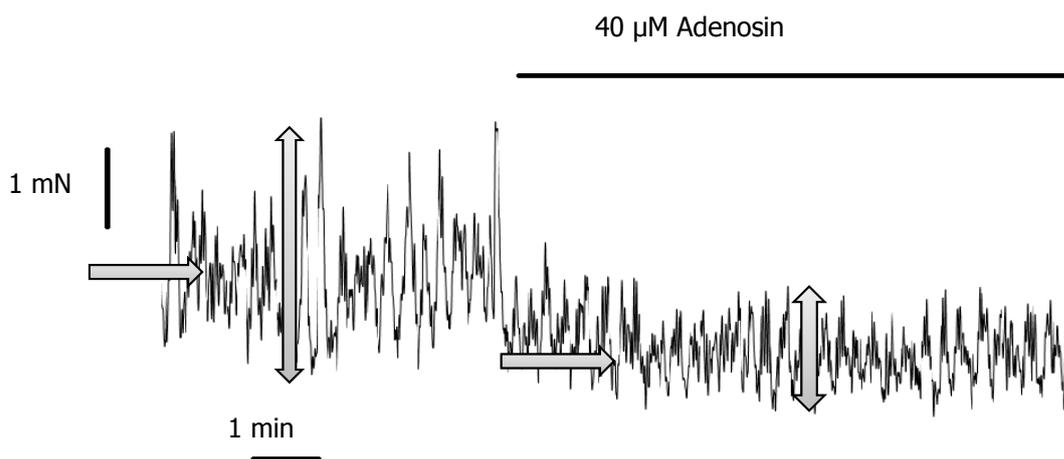
Mit Inhibitor Y 27632 ist eine Rechtsverschiebung ( $\text{ED}_{50}$  ohne Y 27632: 2,5  $\mu\text{M}$  vs.  $\text{ED}_{50}$  mit Y 27632: 4  $\mu\text{M}$ ) sowie eine Verringerung der Maximalkraft ( $F_{\text{max}}$  ohne Y 27632: 185  $\mu\text{M}$  vs.  $F_{\text{max}}$  mit Y 27632: 155  $\mu\text{M}$ ) zu erkennen.

n = 4 mit Y 27632

n = 8 ohne Y 27632

### 4.1.3. Wirkung von Adenosin

Zu Beginn wird der Einfluss von Adenosin auf den Grundtonus der Blasenmuskulatur überprüft. Dabei zeigen sich nur bei Konzentrationen ab  $40 \mu\text{M}$  Effekte. Diese sind jedoch sehr gering und nicht reproduzierbar. Bei einigen Präparaten zeigt sich ein Einfluss von Adenosin auf den Grundrhythmus. Die phasische Komponente verringert ihre Amplitude (Abb. 7), insofern als dass sich die Spannweite der Spontanaktivität vermindert.



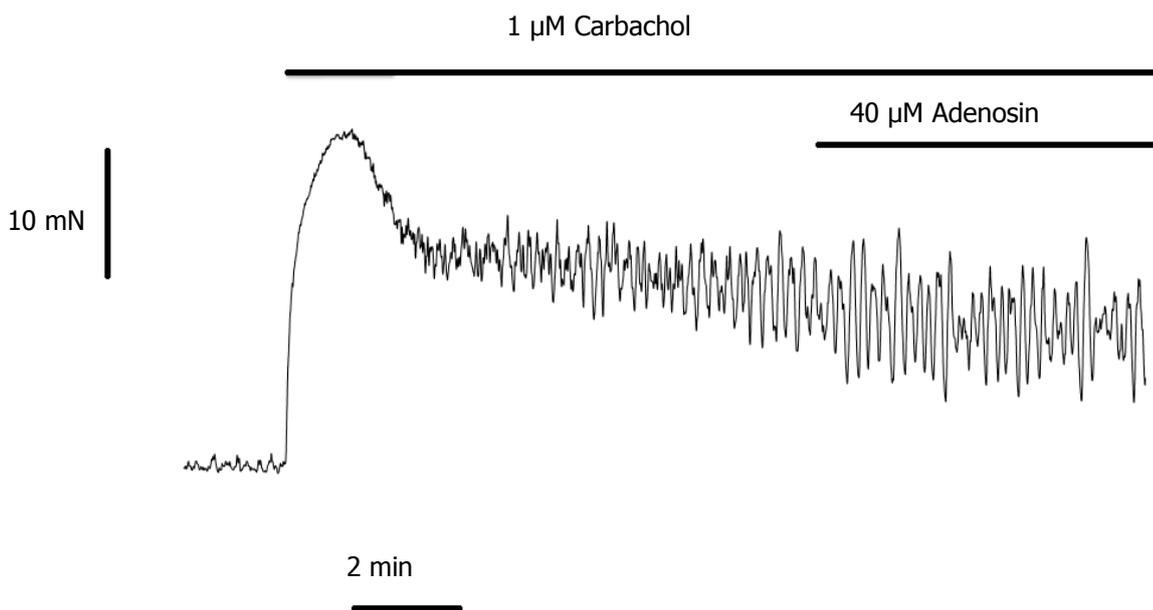
**Abb. 7** Verlauf der tonischen und der phasischen Komponente in Ruhe bei Zugabe von Adenosin zum Erreichen einer Konzentration von  $40 \mu\text{M}$  im Organbad.

Zu erkennen ist eine Verringerung sowohl des Tonus (horizontale Pfeile) als auch der phasischen (vertikale Doppelpfeile) Komponente.

Nach Gabe von  $40 \mu\text{M}$  Adenosin ist eine Tonusverminderung von etwa  $1 \text{ mN}$  des Grundrhythmus zu verzeichnen. Hieraus entwickelt sich die Überlegung, ob die Wirkung des Adenosins bei vorheriger Kontraktion der Blasenfragmente eventuell sogar noch besser zu beobachten ist.

Als Kontraktionsauslösendes Agens wird nach den oben beschriebenen Ergebnissen Carbachol gewählt. Als Carbacholdosis wird dabei  $1 \mu\text{M}$  ausgewählt. Diese Konzentration liegt, wie zuvor in den Versuchen bestimmt, nahe der  $\text{ED}_{50}$ . Es kann ein schnelles Erreichen der Plateauphase der Kontraktion angenommen werden ohne zuvor jedoch eine überschießende Kontraktion zu verursachen. Diese hätte durch den Verlust der phasischen Komponente keine Rückschlüsse auf eventuelle Veränderungen jener phasischen

Komponente durch Adenosin zugelassen. Es zeigt sich, dass nach Gabe von Carbachol der Grundrhythmus stark in seiner Amplitude steigt. Diese starken phasischen Kontraktionen mit Amplituden bis zu 8 mN überdecken jedoch den vermuteten Effekt von Adenosin. Die Aufzeichnung der Kraft lässt vermuten, dass Adenosin eine relaxierende Wirkung hat, jedoch ist das Signal nicht sicher auswertbar und eine quantitative Aussage daher nicht möglich (Abb. 8).

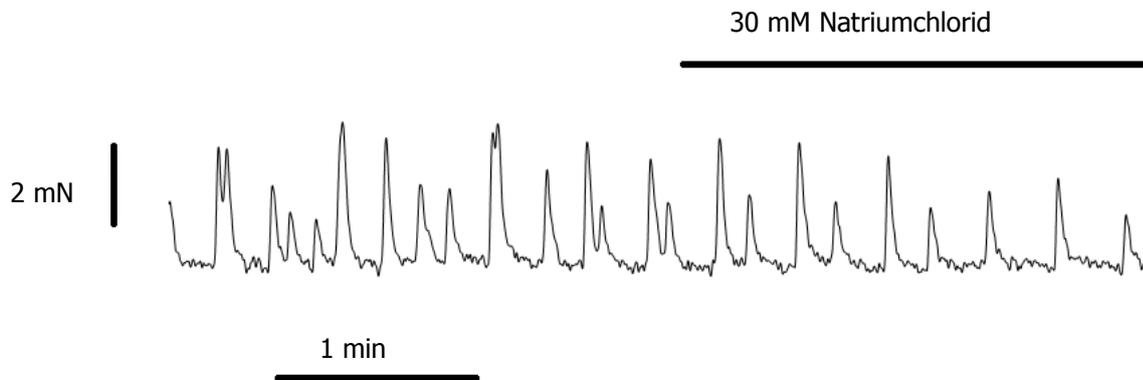


**Abb. 8** Verlauf der Kontraktionskraft bei Zugabe von Adenosin nach Carbacholgabe.

Die zunächst ausgelöste Kontraktion verläuft nach dem unter Punkt 4.1.1 beschriebenen Schema. Die Zugabe von Adenosin lässt einen leichten Tonusverlust vermuten, allerdings ist die phasische Komponente der Kontraktion so groß, dass ein Effekt nicht sicher auswertbar ist.

Anders stellt sich die Wirkung von Adenosin bei vorheriger Gabe von Kaliumchlorid dar. Eine Konzentration von 30 mM wird als standardisierte Konzentration zur Vorkontraktion gewählt. Der Kontraktionsverlauf bei dieser Konzentration entspricht im zeitlichen Verlauf und der Amplitude etwa der durch 1 µM Carbachol ausgelösten Kontraktion (Abb. 10). Um einen Einfluss der erhöhten Osmolalität der Lösung auszuschließen, erfolgen Versuche mit gleich konzentrierter Natriumchloridlösung. Natriumchlorid hat hierbei nur einen Effekt auf

den Grundrhythmus. Die Frequenz der spontanen, undulierenden Kontraktionen der Gewebefragmente nimmt im Zeitverlauf ab und kommt nach 5 bis 10 Minuten zum Erliegen (Abb. 9). Nach Austausch der Organbadlösung kehren die Spontankontraktionen zurück. Adenosingabe nach oder vor Natriumchlorid hat keinen zusätzlichen Effekt.



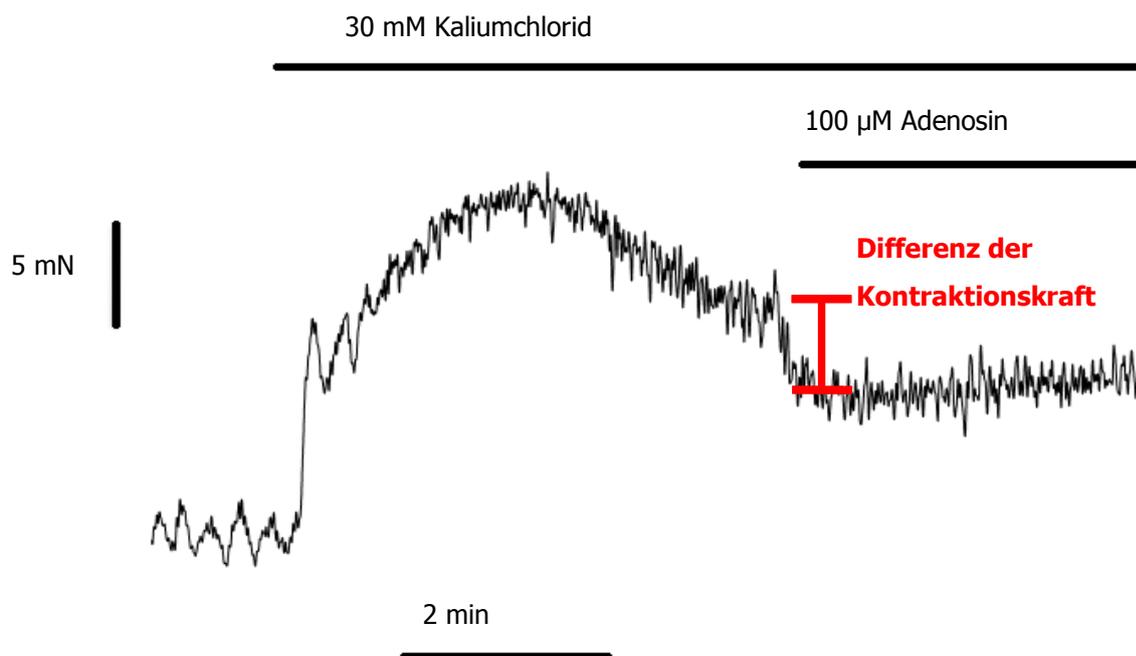
**Abb. 9** Verlauf der Kontraktionskraft während der Osmolalitätskontrolle.

Die Erhöhung der Osmolalität mittels Natriumchlorid um 30 mosmol/l hat keinen Einfluss auf den Tonus der Muskulatur des Detrusors. Die phasische Komponente ist über einen Zeitraum von ca. 10 Minuten rückläufig.

#### 4.1.4. Adenosingabe nach Kaliumchloridapplikation

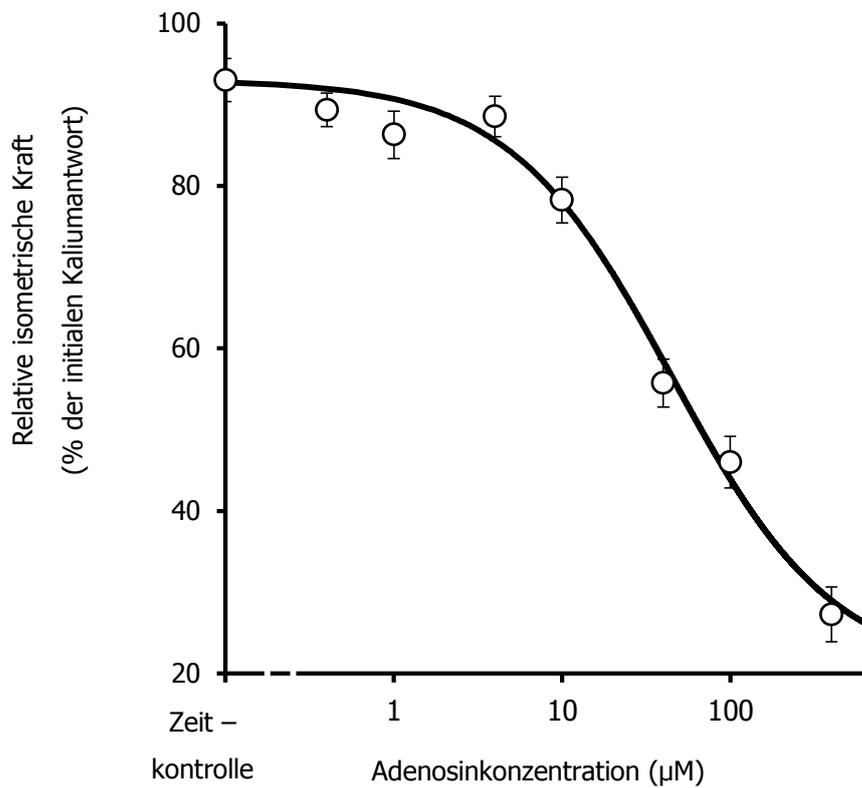
Die Applikation von Adenosin nach vorheriger Kontraktion durch Kaliumchlorid verursacht eine sofortige, spätestens jedoch nach 10 Sekunden, einsetzende Relaxation, die nach maximal 1 Minute ihre volle Ausprägung erreicht. Es wurden Adenosinkonzentrationen von 0,4  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 400  $\mu\text{M}$  untersucht. Dabei zeigt sich ein Zusammenhang zwischen Adenosinkonzentration und Ausmaß der Kraftänderung.

Die stärkste Verminderung der Kraft zeigt sich bei einer Konzentration von 400  $\mu\text{M}$  Adenosin (Abb. 11). Im Mittel beträgt die Restkraft hier 46 % ( $\pm 4$  %). Bei einer Adenosinkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  zeigt sich eine Restkraft von 58 % ( $\pm 3$  %) der vorhergehenden Kontraktion (Abb. 10). Die Restkräfte steigen auf 69 % ( $\pm 3$  %) bei 40  $\mu\text{M}$  und erreichen 89 % ( $\pm 1$  %) bei 4  $\mu\text{M}$  Adenosin. Bei der minimalen Adenosinkonzentration von 0,4  $\mu\text{M}$  beträgt sie 92 % ( $\pm 2$  %). Im Vergleich dazu beträgt die bei den Zeitkontrollpräparaten gemessene Restkraft ohne Gabe von Adenosin 92 % ( $\pm 1$  %). Die ermittelte  $\text{ED}_{50}$  beträgt hier 50  $\mu\text{M}$  (Abb. 11).



**Abb. 10 Kontraktionsverlauf bei Gabe von Kaliumchlorid und anschließender Gabe von Adenosin.**

Nach Erreichen eines erhöhten Kontraktionsniveaus erfolgt die Zugabe von Adenosin. Kurz nach Erhöhung der Adenosinkonzentration in der Kammer fällt die Kontraktionskraft ab. Die phasische Komponente bleibt annähernd gleich.



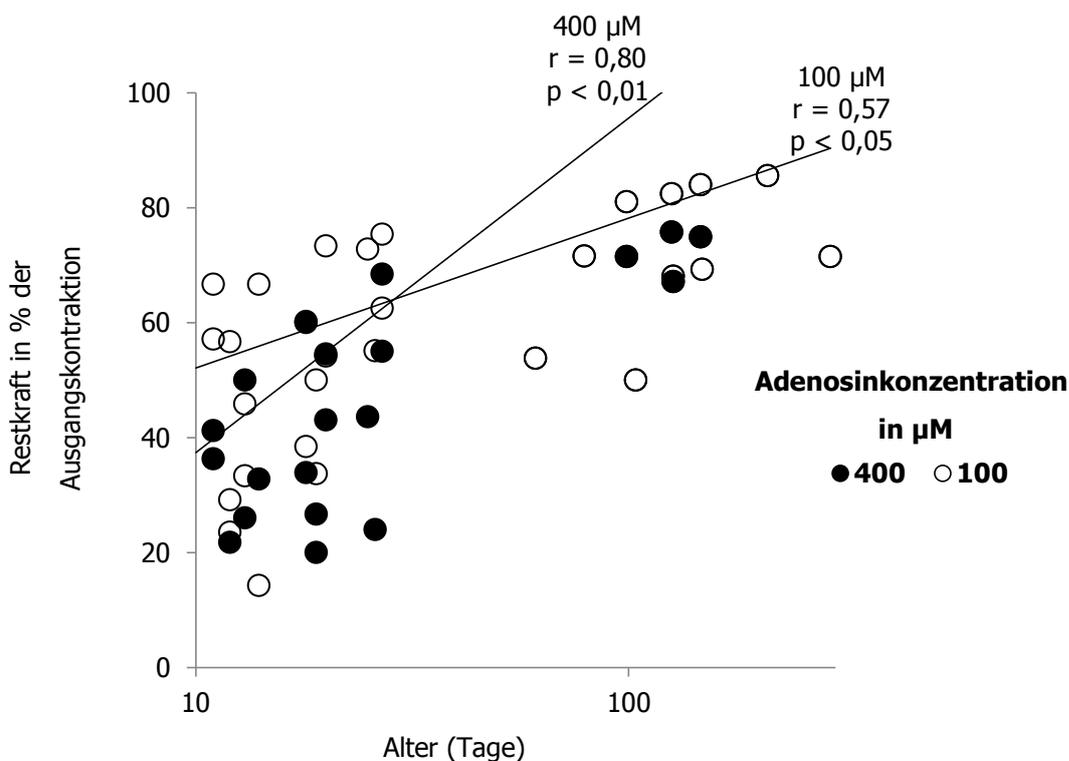
**Abb. 11 Dosis – Wirkungskurve der durch Adenosin verursachten Relaxation nach Vorkontraktion durch KCl (30 mM).**

n = 43 Tiere, ED<sub>50</sub> = 50 µM

Hierbei wird nicht zwischen unterschiedlichem Alter der Versuchstiere unterschieden, alle erhobenen Daten fließen mit ein. In den einzelnen Versuchen wird auffällig, dass sich die Restkräfte zwischen jüngeren Tieren und älteren Tieren voneinander unterscheiden. Es wird die Hypothese erhoben, dass sich die Wirkung von Adenosin auf die Blasenmuskulatur junger Tiere von der Wirkung auf die Muskulatur der älteren Tiere quantitativ unterscheidet.

#### 4.1.4.1. Korrelationen von Alter und Restkontraktion

Um die oben genannte Hypothese zu überprüfen, erfolgt eine Untersuchung der Korrelation zwischen Restkraft und Alter der Tiere, getrennt nach zugegebener Adenosinkonzentration. Es bestehen signifikante Zusammenhänge für alle verwendeten Adenosinkonzentrationen, von 0,4  $\mu\text{M}$  bis hin zu 400  $\mu\text{M}$ . Die mit  $r = 0,8$  ( $p < 0,01$ ) größte Korrelation zwischen Alter des Versuchstieres und der Restkraft zeigt sich bei einer Adenosinkonzentration von 400  $\mu\text{M}$ . (Abb. 12).



**Abb. 12** Darstellung der Restkraft nach Adenosingabe in Abhängigkeit vom Alter der Tiere für die Adenosinkonzentrationen 400  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$ .

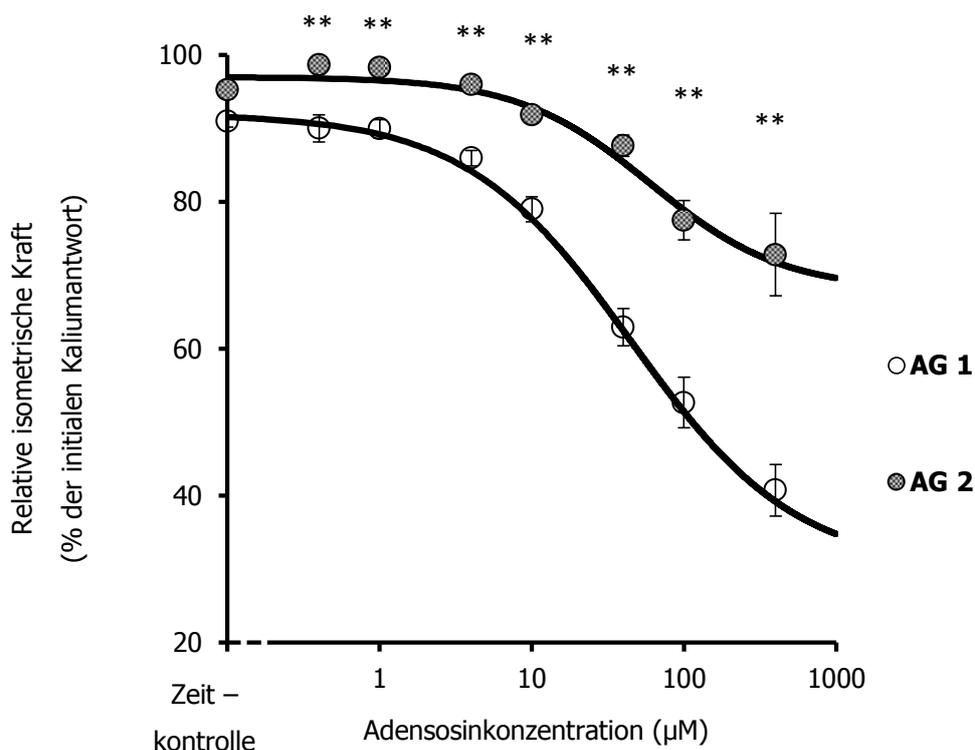
Diese beiden Konzentrationen werden stellvertretend gezeigt. Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen der Restkraft nach Adenosingabe und dem Alter der Tiere für die Adenosinkonzentrationen 400  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$ . Diese beiden Konzentrationen werden stellvertretend gezeigt.

400  $\mu\text{M}$ :  $n = 24$

100  $\mu\text{M}$ :  $n = 39$

Die Altersgrenze wird bei 30 Tagen gezogen. Tiere bis zu einem Alter von 30 Tagen werden als jung definiert und in Altersgruppe 1 (AG 1) zusammengefasst, Tiere älter als 30 Tage werden als alt klassifiziert und Altersgruppe 2 (AG 2) zugeordnet.

#### 4.1.4.2. Restkraft in Abhängigkeit der Altersgruppen



**Abb. 13 Dosis – Wirkungskurven für die zwei betrachteten Altersgruppen abhängig von der Adenosinkonzentration.**

Die Werte für alle verwendeten Adenosinkonzentrationen sind zwischen jungen Tieren (10 – 30 Tage alt) und alten Tieren (> 30 Tagen) signifikant verschieden (\*\*  $p < 0,01$ ).

Junge Tiere:  $n = 23$  Tiere,  $ED_{50} = 45 \mu\text{M}$

Alte Tiere:  $n = 10$  Tiere,  $ED_{50} = 60 \mu\text{M}$

Es zeigen sich quantitativ größere Differenzen im Vergleich der beiden Altersgruppen bei höheren Adenosinkonzentrationen, vor allem bei 400  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$ .

Die verbliebene Kraft beträgt in AG 1 bei maximaler Adenosinkonzentration von 400  $\mu\text{M}$  40 % ( $\pm 4$  %). Bei geringeren Adenosinkonzentrationen steigen die Restkontraktionen nach Adenosingabe auf 62 % ( $\pm 3$  %) bei 40  $\mu\text{M}$  und weiter auf schließlich 89 % ( $\pm 2$  %) bei 0,4  $\mu\text{M}$ . Die mittlere Restkraft der Zeitkontrolle, d. h. ohne Applikation von Adenosin liegt bei nahe 91 % (Abb. 13).

Die Restkräfte in der AG 2 sind hingegen deutlich größer. Minimal wird die Restkraft bei einer Adenosinkonzentration von 400  $\mu\text{M}$ . Hier liegt die verbleibende Kraft bei 72 %. Wie in AG 1 steigen auch in AG 2 die Restkräfte mit abnehmender Adenosinkonzentration. Ab einer

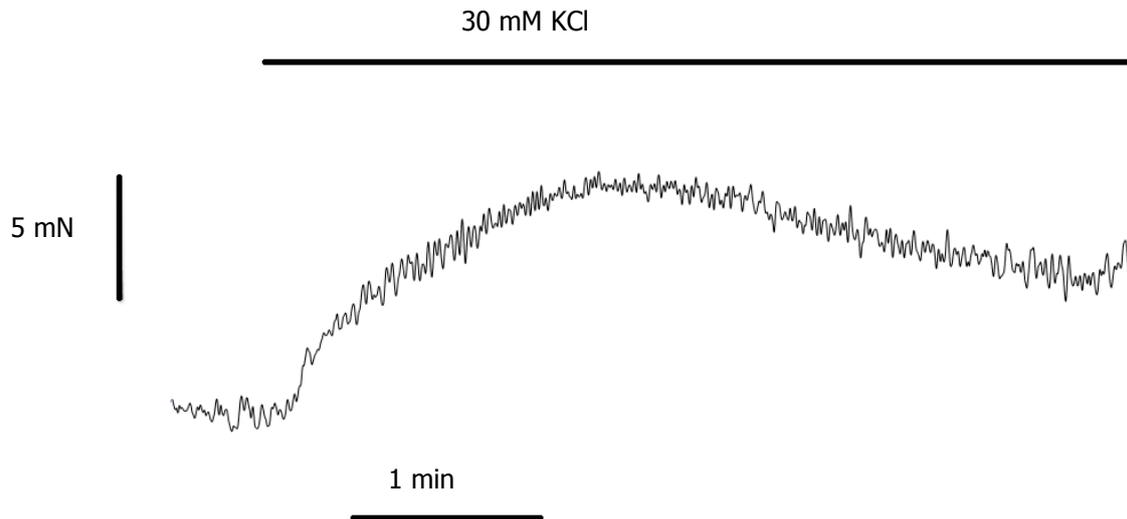
Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  und kleiner betragen die Restkräfte mehr als 90 % der Kontrollkontraktion. Neben einer Verringerung des maximalen Adenosineffektes in der AG 2 kommt es zusätzlich zu einer Rechtsverschiebung des Graphen hin zu größeren Adenosindosen ( $\text{ED}_{50}$  von 45  $\mu\text{M}$  in der AG 1 zu 60  $\mu\text{M}$  in der AG 2) (Abb. 13).

Die Kraftänderungen bei Konzentrationen von 400  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$  sowie 10  $\mu\text{M}$  unterscheiden sich in der Altersgruppe 1 signifikant von der Zeitkontrollkontraktion ( $p < 0,05$ ). In der Altersgruppe 2 sind die Restkontraktionen bei den Adenosinkonzentrationen von 400  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$  von der mittleren Restkontraktion der TC verschieden ( $p < 0,05$ ).

Bei Betrachtung der Unterschiede bezüglich der Altersgruppen stellt sich heraus, dass die relaxierende Wirkung gleicher Adenosinkonzentrationen bei den jüngeren Tieren größer ist als bei den Tieren der AG 2. Dieser Unterschied ist signifikant bei allen gegebenen Adenosinkonzentrationen von 0,4  $\mu\text{M}$  bis 400  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ). Auch die Zeitkontrollversuche zeigen einen signifikanten Unterschied der Kontraktionskraft im Hinblick auf das Alter ( $p < 0,01$ ).

#### **4.1.5. Adenosingabe vor Kaliumchloridapplikation**

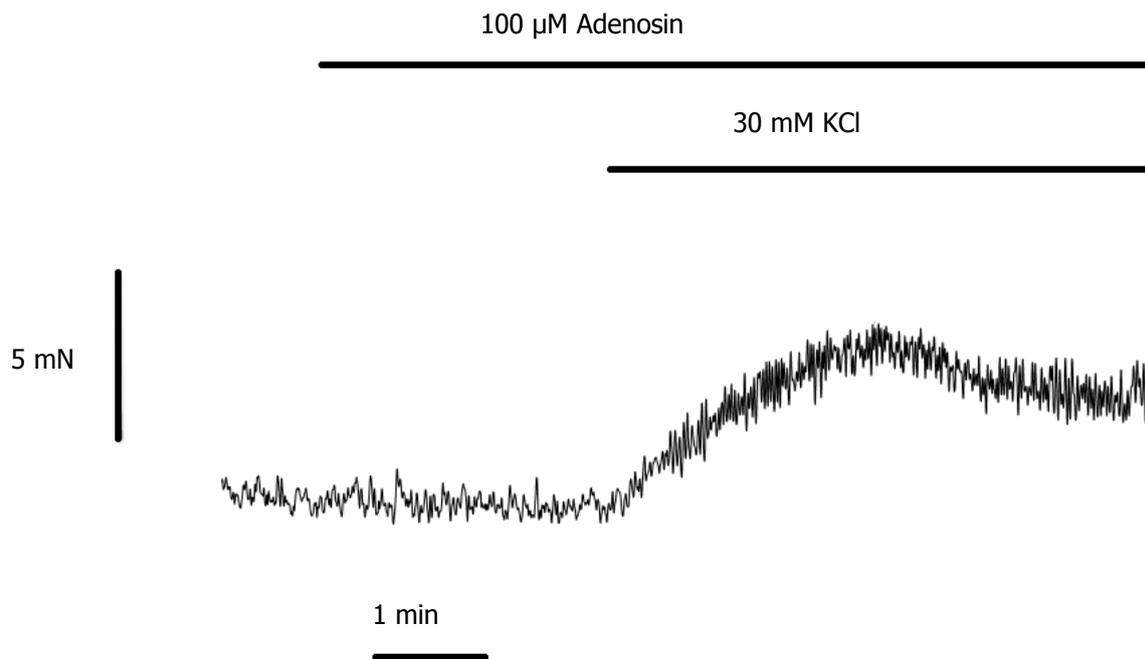
Weiterhin wird betrachtet, ob die Gabe von Adenosin vor Kaliumchloridgabe einen Effekt auf die Kontraktionskraft hat. Dazu werden die zuvor beschriebenen Adenosinkonzentrationen im Organbad hergestellt. Nach 3 Minuten erfolgt die Zugabe von Kaliumchlorid. Die Prozentangaben der Restkontraktionen beziehen sich dabei auf eine zu Beginn des Versuches durchgeführte Kontraktion mit 30 mM Kaliumchloridlösung. In der Abbildung 14 ist beispielhaft eine dieser Bezugskontraktionen gezeigt. Nach zwei Minuten erreicht die Kontraktion ihr Maximum, danach nimmt die Kraft ab. Die Beobachtungszeit beträgt 8 Minuten.



**Abb. 14 Bezugskontraktion ausgelöst durch 30 mM Kaliumchlorid ohne Gabe von Adenosin.**

Diese Kontraktionen sind über die gesamte Zeit des Versuches wiederholt gleichförmig und von annähernd konstanter Maximalkraft.

Eine typische Kontraktion bei einer Adenosinkonzentration von 100  $\mu$ M und nachfolgender Kaliumchloridgabe ist in Abbildung 15 zu sehen. Der zeitliche Kontraktionsverlauf ist nicht auffallend verschieden von den Bezugskontraktionen (vergl. Abb. 14 und Abb. 15). Um einen Einfluss der Zeit auf die Kontraktionskraft auszuschließen werden bei jedem Versuch wiederum Zeitkontrollversuche durchgeführt. Es zeigt sich hierbei ein Abfall der Kontraktionskraft von etwa 4 % vom ersten bis hin zum sechsten Versuch. Über die ersten drei Durchgänge bleibt die Kraft nahezu konstant. Während der abschließenden drei Durchgänge fällt sie um die zuvor genannten 4 % ab. Diese Änderung tritt in allen Versuchen, ob mit Adosin-gabe oder in den Zeitkontrollversuchen auf und wird deshalb als vernachlässigbar angesehen. Weiterhin wird die Konzentration des Adenosins zufällig ausgewählt, sodass der Effekt der verringerten Kraftänderung auf alle betrachteten Adenosinkonzentrationen einwirkt.

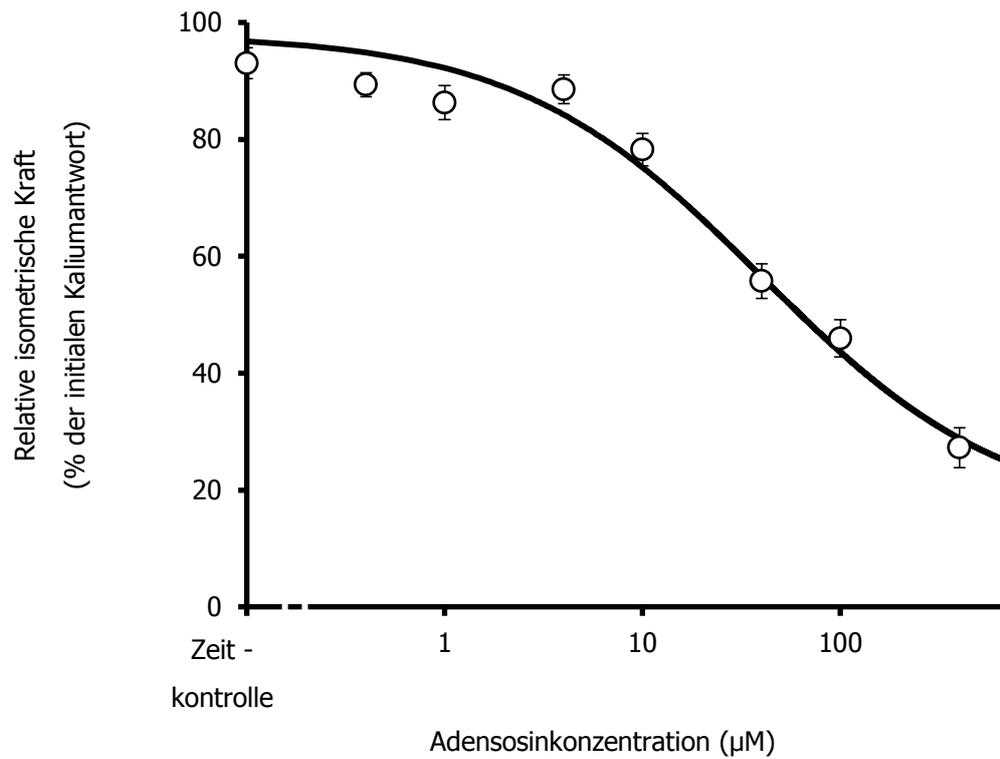


**Abb. 15** Verlauf der Kontraktion nach 100 µM Adenosin und nachfolgender Gabe von Kaliumchlorid.

Die hier ermittelte maximale Kontraktionskraft wird mit der initialen, durch alleinige Gabe von 30 mM Kaliumchlorid ausgelösten Kontraktion (Abb. 14) verglichen.

Unabhängig vom Alter der Versuchstiere ergibt sich für eine Adenosinkonzentration von 400 µM eine verbleibende Restkontraktion von 27 % ( $\pm 4$  %) und für 100 µM eine Restkontraktion von 35 % ( $\pm 1$  %). Bis zu einer Adenosinkonzentration von 4 µM steigt die Restkontraktion bis auf 88 % ( $\pm 4$  %). Bei geringeren Adenosinkonzentrationen ist eine Stagnation auf etwa diesem Niveau zu beobachten.

Bei den Zeitkontrollversuchen wird im Mittel eine Restkontraktion von 93 % ( $\pm 7$  %) erreicht (Abb. 16). Wie zuvor bei Adenosingabe nach Kontraktion gesehen, besteht auch bei der vorherigen Adenosingabe ein Dosis – Wirkungs – Zusammenhang. Die Unterschiede zwischen den Restkontraktionen bei Vorinkubation mit Adenosinkonzentrationen von 400 µM, 100 µM, 40 µM, 10 µM und 4 µM sind jeweils signifikant voneinander verschieden.



**Abb. 16 Dosis – abhängige Reduktion der Kontraktionskraft durch Adenosingabe vor Kaliumchlorid.**

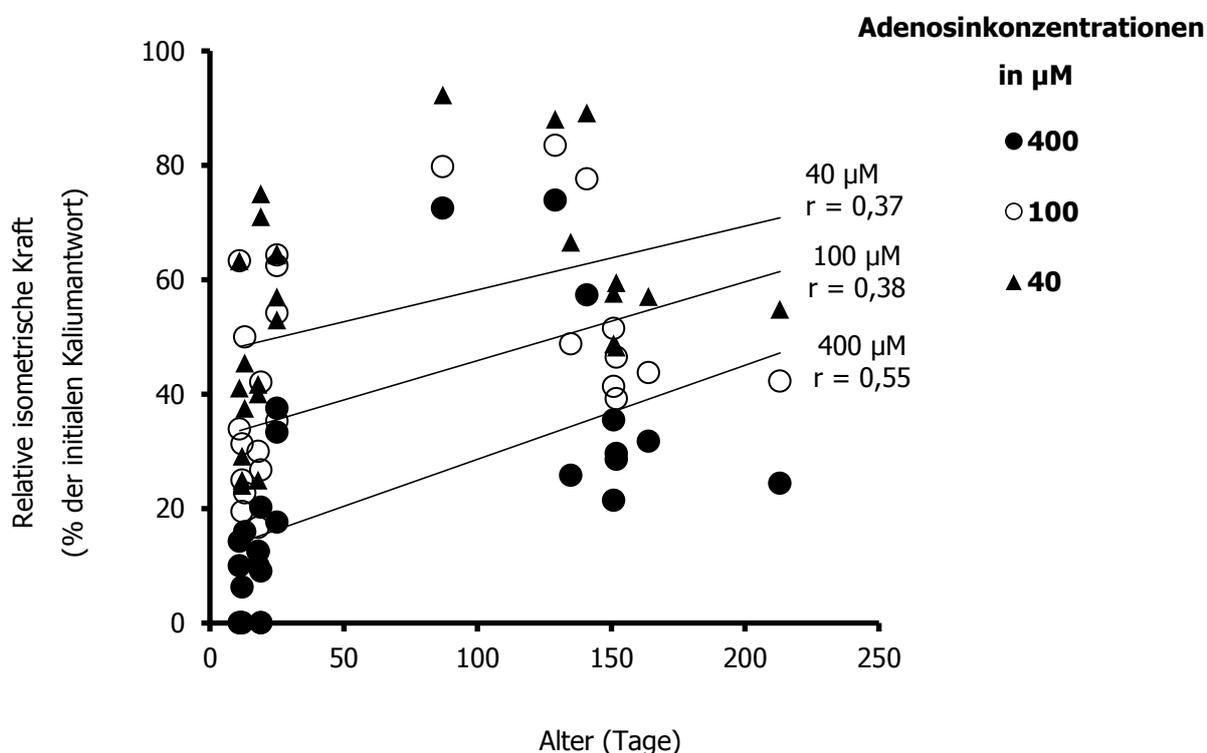
Ebenso wie bei Behandlung der glatten Muskulatur nach Kontraktion ist auch bei Behandlung des Gewebes mit Adenosin vor Kontraktion ein deutlicher Zusammenhang zwischen Adenosindosis und verbleibender Kontraktionskraft zu erkennen.

n = 30 Tiere

Bei Adenosinkonzentrationen von 400  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$  und von 1  $\mu\text{M}$  sind die Restkontraktionen von denen der Zeitkontrollversuche signifikant verschieden. Ab einer Adenosinkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  und höher kann daher von einer zuverlässigen Wirkung gesprochen werden kann.

#### 4.1.5.1. Korrelationen von Alter und Restkontraktion

Für die höchsten verwendeten Adenosinkonzentrationen von 400  $\mu\text{M}$  ( $r = 0,55$ ;  $p < 0,01$ ) und 100  $\mu\text{M}$  ( $r = 0,38$ ;  $p < 0,05$ ) ergeben sich signifikante Korrelationen nach Pearson zwischen Alter und Kraftänderung, beruhend auf der Adenosinwirkung.



**Abb. 17** Darstellung der Restkraft nach Adenosingabe in Abhängigkeit vom Alter der Tiere für die Adenosinkonzentrationen 400  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$ .

Für die höchsten verwendeten Adenosinkonzentrationen 400  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$  bestehen sichere Altersunterschiede der quantitativen Adenosinwirkung.

400  $\mu\text{M}$ :  $n = 26$

100  $\mu\text{M}$ :  $n = 30$

40  $\mu\text{M}$ :  $n = 32$

Für die geringeren verwendeten Konzentrationen ergibt sich allenfalls für eine Lösung mit 40  $\mu\text{M}$  Adenosin noch eine erkennbare Korrelation zwischen Alter der Versuchstiere und der Restkontraktion. Der Korrelationskoeffizient beträgt hier  $r = 0,37$ , jedoch ist dieser nicht signifikant ( $p = 0,052$ ). Bei allen übrigen verwendeten Konzentrationen kleiner 40  $\mu\text{M}$  zeigen sich keine relevanten Korrelationen.

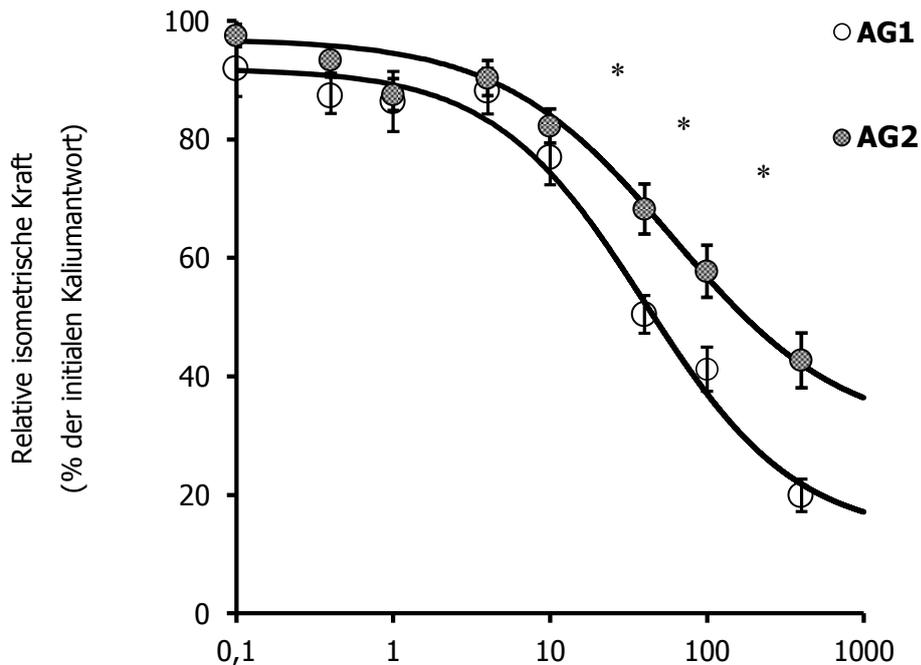
#### 4.1.5.2. Restkraft in Abhängigkeit der Altersgruppen

Wiederum steht die Hypothese, dass sich die Wirkung von Adenosin auf das Gewebe zwischen Tieren in den verschiedenen Altersgruppen unterscheidet (Kapitel 4.1.4).

Die Mittelwerte der Restkontraktionen nach Vorinkubation mit Adenosin liegen in der Altersgruppe 1 bei 12 % ( $\pm 3$  %) bei einer Adenosinkonzentration von 400  $\mu\text{M}$ . Sie steigen auf Werte von 33 % ( $\pm 5$  %) bei 100  $\mu\text{M}$  Adenosin und weiter auf 72 % ( $\pm 5$  %) bei 10  $\mu\text{M}$  Adenosin. Die Restkontraktionen sind weiter ansteigend und erreichen maximal 83 % ( $\pm 4$  %) bei einer Adenosinkonzentration von 0,4  $\mu\text{M}$ . Die Zeitkontrollversuche zeigen eine durchschnittliche verbleibende Kontraktionskraft von 92 % ( $\pm 4$  %). Dabei sind die auftretenden Kräfte bei Adenosinkonzentrationen von 400  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$  von der Zeitkontrolle signifikant verschieden ( $p < 0,01$ ).

In der Altersgruppe 2 liegen die Mittelwerte der Restkontraktionen minimal bei 35 % ( $\pm 5$  %) bei einer Adenosinkonzentration von 400  $\mu\text{M}$ . Bei Adenosin-konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$  steigen sie auf Werte von 52 % ( $\pm 5$  %) bzw. 64 % ( $\pm 5$  %). Bei geringeren Adenosinkonzentrationen erfolgt noch ein weiterer Anstieg der Kontraktionen bis auf 89 % ( $\pm 3$  %) bei 0,4  $\mu\text{M}$ . Der Mittelwert der Restkontraktionen der Zeitkontrollversuche ist 97 % ( $\pm 8$  %) in der Altersgruppe 2. Die Kontraktionskraft bei einer Adenosinkonzentrationen von 400  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$  unterscheiden sich signifikant von der Zeitkontrolle ( $p < 0,05$ ).

Insgesamt sind die Kontraktionskräfte nach Vorinkubation mit Adenosin bei gleichen Dosen in der Altersgruppe 1 kleiner als in der Altersgruppe 2. Die entwickelten Kräfte unterscheiden sich signifikant bei Adenosinkonzentrationen von 400  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ). Bei den geringeren verwendeten Adenosinkonzentrationen ( $< 40 \mu\text{M}$ ) ergeben sich keine verwertbaren Unterschiede (Abb. 18).



**Abb. 18 Dosis – Wirkungskurve bei Vorbehandlung mit verschiedenen Dosen Adenosin.**

Die Werte für die verwendeten Adenosinkonzentrationen 400 µM, 100 µM und 40 µM sind zwischen Tieren der AG 1 und Tieren der AG 2 signifikant verschieden (\*  $p < 0,05$ ).

Ebenso zeigt sich neben verringertem Maximaleffekt eine Verschiebung der  $ED_{50}$  hin zu höheren Adenosinkonzentrationen von AG 1 zu AG 2.

AG 1:  $n = 23 - 32$  für jede Adenosinkonzentration,  $ED_{50} = 40 \mu\text{M}$

AG 2:  $n = 19 - 29$  für jede Adenosinkonzentration,  $ED_{50} = 60 \mu\text{M}$

#### 4.1.6. Vergleich des Zeitpunktes der Adenosinapplikation

##### *Altersgruppe 1*

In beiden Altersgruppen werden bei nachfolgender Gabe von Adenosin auf Kaliumchlorid höhere Restkontraktionen erreicht, verglichen mit Restkontraktionen, die sich bei Gabe von Adenosin vor Kaliumchloridapplikation, ergaben. Diese Unterschiede in der Restkontraktion sind in beiden Versuchabläufen besonders bei höheren Adenosinkonzentrationen ( $> 40 \mu\text{M}$ ) ausgeprägt. Im Vergleich der Mittelwerte der Altersgruppe 1 ergeben sich signifikante Unterschiede bei Adenosinkonzentrationen von 400 µM, 100 µM und 40 µM ( $p < 0,05$ ). Die Restkontraktionen der übrigen Adenosinkonzentrationen sind nicht signifikant verschieden.

### *Altersgruppe 2*

In der Altersgruppe 2 fällt der Unterschied in der Reaktion auf Adenosin noch deutlicher aus. Hier sind die Restkontraktionen bei allen verwendeten Adenosinkonzentrationen signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ). Allein die Restkräfte der Zeitkontrolle weisen keinen signifikanten Unterschied auf.

Bei Vergleichen der Restkontraktionen in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt des Adenosins ergeben sich für beide Altersgruppen Unterschiede, wie oben aufgeführt. Zieht man jedoch die Differenz der Restkontraktionen zwischen Altersgruppe 1 und 2 als abhängige Variable heran, sind recht vergleichbare Werte zu verzeichnen. Es scheinen demnach allenfalls Unterschiede in der Wirksamkeit des Adenosins je nach Applikationszeitpunkt aufzutreten. Der Unterschied der Adenosinwirkung zwischen AG 1 und AG 2 ist nicht verschieden abhängig vom Applikationszeitpunkt.

## **4.2. Polymerase – Kettenreaktion**

Aus den Versuchen im Organbad ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Wirkung von Adenosin auf das Blasengewebe von jüngeren und älteren Tieren, sowohl bei Adenosingabe vor und nach KCl. Als Folge hiervon stellt sich die Frage, ob sich dieser Unterschied auch auf genomischer Ebene nachweisen lassen lässt. Die Arbeitshypothese ist hierbei, dass ein Unterschied in der Expression der Adenosinrezeptoren  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  und  $A_3$  in Abhängigkeit des Alters bestehe. Um einen großen Pool von Tieren unterschiedlichen Alters zu erhalten, werden die bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefrorenen Proben der Blasenpräparate der Tiere, die im Organbad untersucht worden waren, durch weitere Tiere ergänzt.

Die Aufteilung erfolgt wie zuvor in 2 Altersgruppen erstellt: Altersgruppe 1 fasst Tiere zusammen, die 10 bis 30 Tage alt waren, Altersgruppe 2 Tiere im Alter von 31 bis 211 Tagen.

Die Altersgruppe 1 umfasst 10 Tiere, die Altersgruppe 2 11 Tiere. In Altersgruppe 1 beträgt der Mittelwert des Alters 19 Tage ( $\pm 8$  d), minimal 10 Tage, maximal 28 Tage. Das Alter der Tiere in Altersgruppe 2 beträgt im Mittel 122 Tage alt ( $\pm 34$  d), minimal 87 und maximal 211 Tage.

### 4.2.1. Vergleich der verschiedenen Rezeptorsubtypen in Abhängigkeit der House – keeping – Gene

Beim Vergleich der einzelnen Subtypen lassen sich quantitative Unterschiede erkennen. Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurde eine relative Expressionsstärke bezogen auf die beiden House – keeping – Gene errechnet.

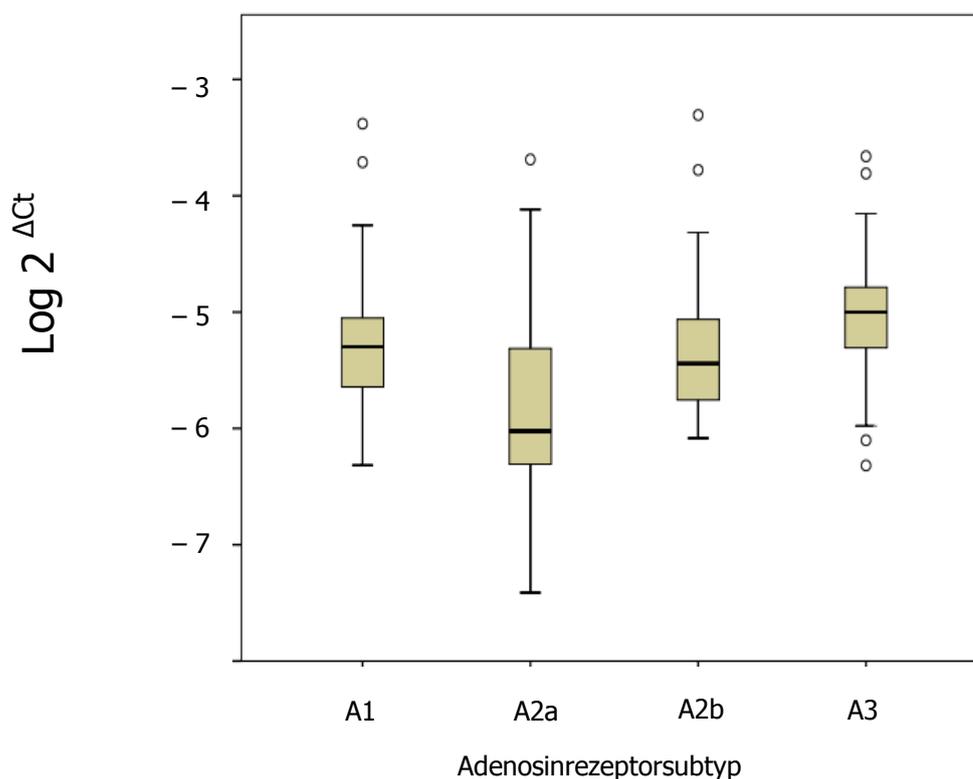
**Tab. 3 Mittelwerte und Standardabweichung der Ct – Werte der untersuchten Gene.**

Gen	A <sub>1</sub>	A <sub>2A</sub>	A <sub>2B</sub>	A <sub>3</sub>	S-18	GAPDH
Mittelwert Der Ct – Werte	24,8	27	24,9	24,3	8,4	21,3
Standardabweichung der Ct – Werte	1,6	1,8	1,7	1,4	1,9	1,7

Zu erkennen sind die für alle betrachteten Gene etwa gleich große Standardabweichungen, bei deutlichen Unterschieden der mittleren Ct – Werte. Besonders der Ct – Mittelwert des HKG S – 18 zeigt einen deutlichen Abstand zu den restlichen Mittelwerten, was einen starken Unterschied in der absoluten Expression der Gene bedeutet.

**4.2.1.1. House – keeping – Gen:**  
**ribosomale S – 18 Untereinheit (S – 18)**

Bezogen auf das House – keeping – Gen S – 18 über alle Altersgruppen hinweg, ist kein deutlicher Unterschied in der Expressionsstärke zwischen den einzelnen Rezeptoren zu erkennen. Die Werte liegen alle in einem Bereich von  $4,0 \times 10^{-8}$  bis  $5,0 \times 10^{-4}$ , der Mittelwert beträgt  $3,3 \times 10^{-5}$ . Diese geringen Zahlen lassen sich durch eine ubiquitäre, deutlich starke Expression der ribosomalen S – 18 – Untereinheit erklären. Der durchschnittliche Ct – Wert liegt mit 8,4 deutlich geringer als die ermittelten mittleren Ct – Werte der Adenosinrezeptoren (Tab. 3). Auf eine Kopie des Zielgens kommen also im Mittel  $3,3 \times 10^5$  Kopien des House – keeping – Gens S – 18.



**Abb. 19 Vergleich der relativen Expression der Adenosinrezeptoren bezogen auf House – keeping – Gen S – 18.**

Zu erkennen sind hohe Schwankungsbreiten. Es bestehen keine Signifikanzen im Hinblick auf Expressionsunterschiede.

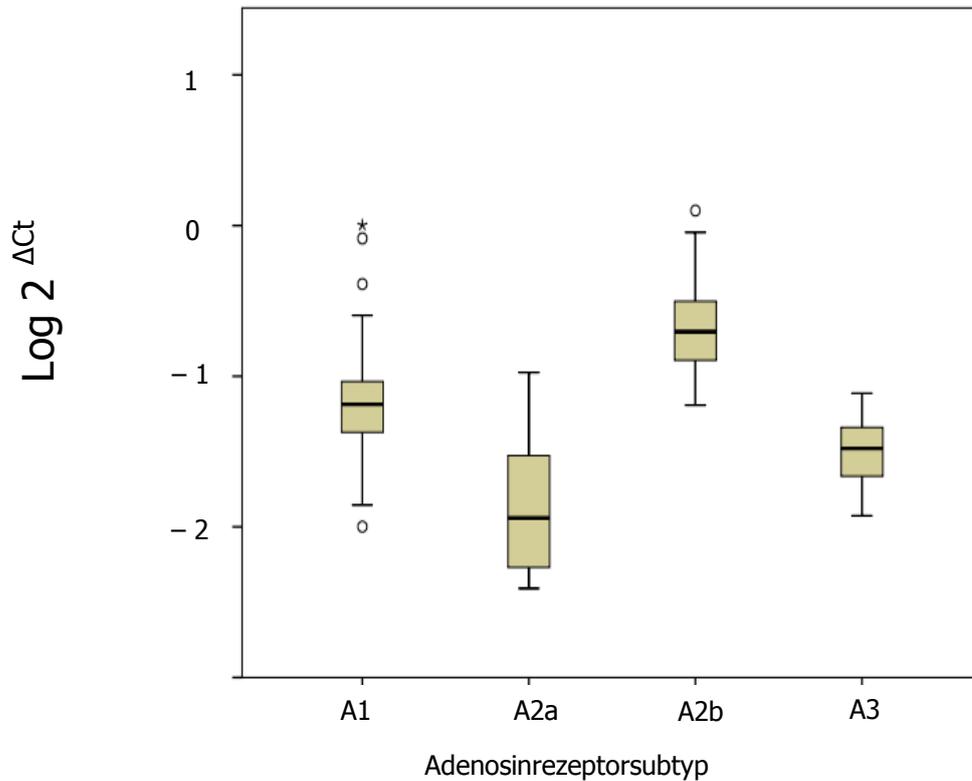
n = 21 für jeden Rezeptor

Die Mittelwerte der relativen Expression liegen für die Adenosinrezeptoren A<sub>1</sub>, A<sub>2B</sub> und A<sub>3</sub> nah beieinander. Die Mittelwerte der relativen Expression betragen für den A<sub>1</sub>R  $3,7 \times 10^{-5}$  ( $\pm 2,1 \times 10^{-5}$ ), für den A<sub>2B</sub>R  $3,8 \times 10^{-5}$  ( $\pm 2,4 \times 10^{-5}$ ) und den A<sub>3</sub>R  $3,0 \times 10^{-5}$  ( $\pm 1,2 \times 10^{-5}$ ). Für den A<sub>2A</sub> – Rezeptor ergibt sich ein Mittelwert mit  $1,6 \times 10^{-5}$  ( $\pm 1,0 \times 10^{-5}$ ). Alle Einzelwerte weisen eine Streuung im Bereich von  $2 \times 10^{-8}$  bis  $2 \times 10^{-4}$  auf. Somit lässt sich schon beim Betrachten der Messwerte vermuten, was statistisch bestätigt wird. Zwischen den Expressionsmittelwerten der Rezeptoren zeigen sich im Vergleich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 19).

#### **4.2.1.2. House – keeping – Gen:**

##### ***Glycerinaldehyd – 3 – Phosphat – Dehydrogenase (GAPDH)***

In der Normierung auf GAPDH als House – keeping – Gen zeigt sich eine andere Konstellation der relativen Expressionen der Adenosinrezeptorsubtypen. Die Werte liegen im Gesamten höher, im Bereich  $4 \times 10^{-3}$  und 1,2. Die größeren Zahlenwerte der relativen Expression sind auf die geringere Anzahl von mRNA – Kopien der Glycerinaldehyd – 3 – Phosphat – Dehydrogenase zurückzuführen. Der Mittelwert der Ct – Werte für GAPDH in der rt PCR beträgt hier 21,3. Die Spannweite der Werte ist kleiner als die der Normierung auf S – 18. Es zeigt sich, dass der Mittelwert der relativen Expression des A<sub>2B</sub> – Rezeptors mit  $0,3 (\pm 0,06)$  über denen der Rezeptoren A<sub>1</sub> mit  $0,16 (\pm 0,06)$ , A<sub>2A</sub>R mit  $0,02 (\pm 6 \times 10^{-3})$  und A<sub>3</sub> mit  $0,04 (\pm 4,5 \times 10^{-5})$  liegt (Abb. 20).



**Abb. 20 Vergleich der relativen Expressionen der Adenosinrezeptoren bezogen auf das HKG GAPDH.**

Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied im Verhältnis der Rezeptorexpression zueinander. Der  $A_{2B}$  – Rezeptor, vorrangig für die Relaxation verantwortlich, ist signifikant stärker exprimiert als die Rezeptoren  $A_{2A}$  und  $A_{2B}$  ( $p < 0,05$ ).

$n = 21$  für  $A_1$ ,  $A_{2A}$  und  $A_{2B}$ ,

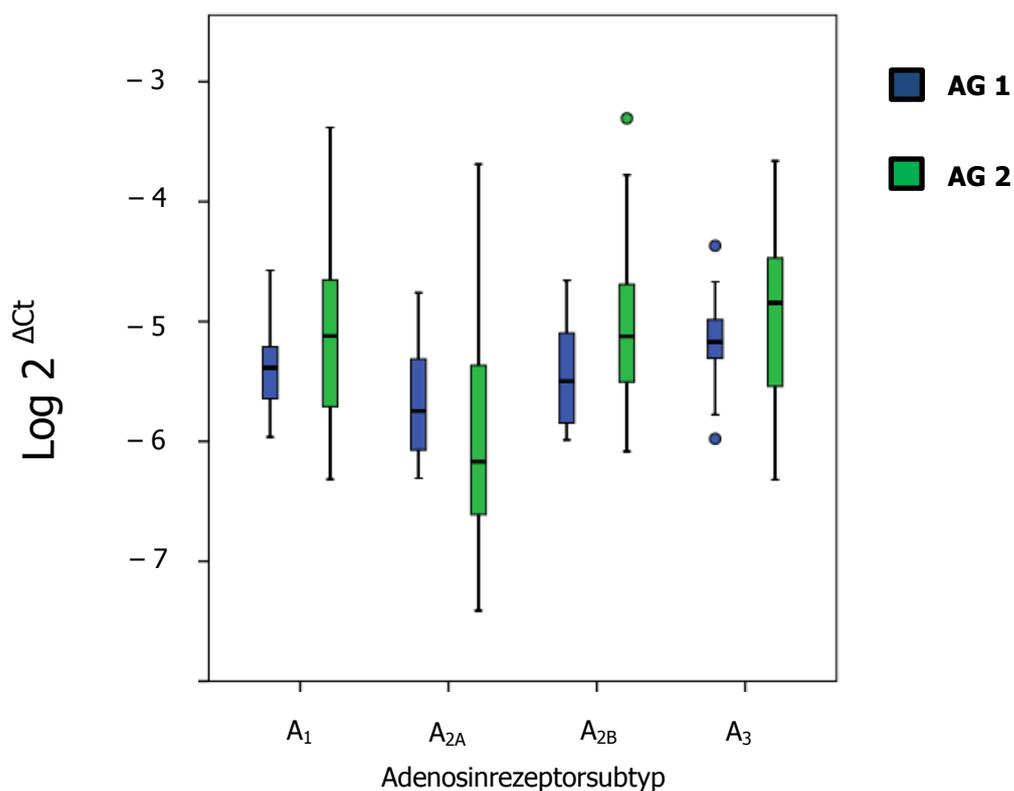
$n = 20$  für  $A_3$

Im Vergleich der mittleren Expressionen ergeben sich signifikante Differenzen ( $p < 0,05$ ) des  $A_{2B}$  – Rezeptors zu den Rezeptorsubtypen  $A_{2A}$  und  $A_3$ . Der Vergleich der Mittelwerte der Subtypen  $A_1$ ,  $A_{2A}$  und  $A_3$  zeigen keinen signifikanten Unterschied. Es bestätigen sich die Ergebnisse von Stehle et al. Der  $A_{2B}$  – Rezeptor wird am stärksten exprimiert.

## 4.2.2. Vergleich der verschiedenen Rezeptorsubtypen in Abhängigkeit der Altersgruppen

### 4.2.2.1. House – keeping – Gen: ribosomale S – 18 Untereinheit

Beim Vergleich der relativen Expression der Adenosinrezeptoren über die zwei Altersgruppen zeigt sich ein Anstieg der mittleren Expression aller vier Rezeptorsubtypen (Abb. 21). Besonders in der Altersgruppe 2 sind für alle Rezeptoren größere Varianzen der ermittelten Expressionen zu erkennen. Die Konfidenzintervalle sind insgesamt größer als in der Gesamtbetrachtung zuvor.



**Abb. 21 Vergleich der relativen Expressionen der Adenosinrezeptoren der zwei Altersgruppen bezogen auf das HKG S – 18.**

Es besteht kein deutlicher Unterschied im Verhältnis der Rezeptorexpression.

n = 10 für alle Rezeptoren in AG 1

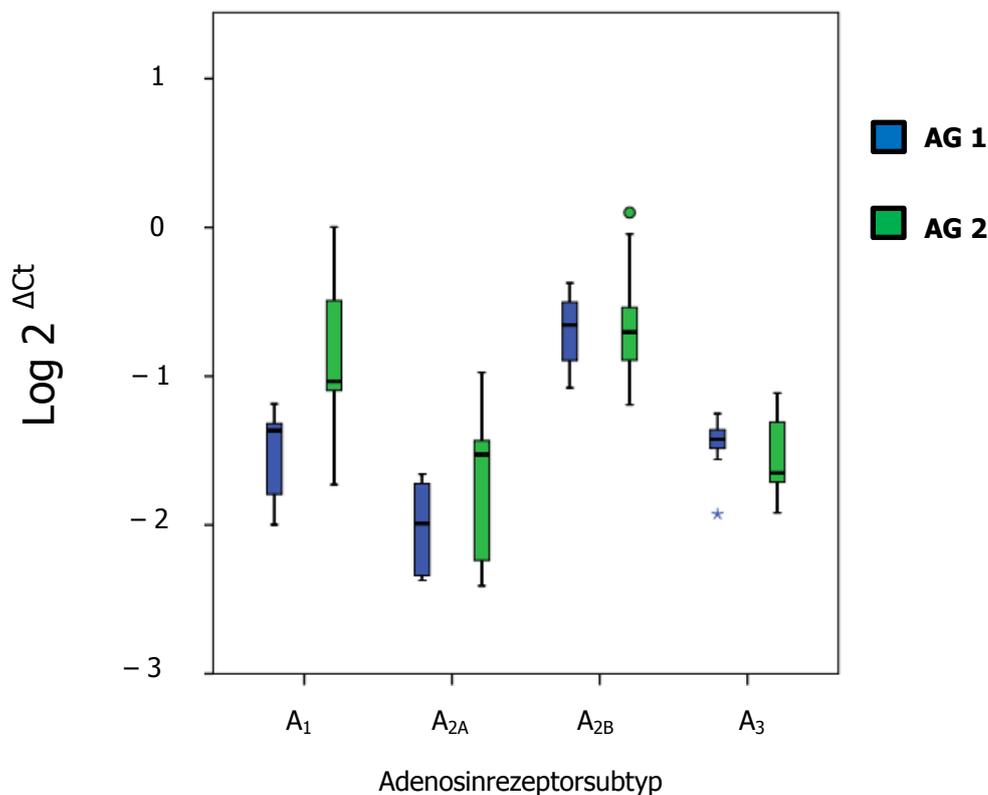
n = 11 für alle Rezeptoren in AG 2

Die mittleren Expressionswerte der Rezeptoren liegen bezogen auf jeweils eine Altersgruppe auf ähnlichem Niveau. Die Vergleiche der Expressionsstärken der einzelnen Adenosinrezeptoren in den zwei Altersgruppen zeigen keine Signifikanz. Wie auch schon bei der Betrachtung zuvor lässt sich keine verstärkte Expression eines einzelnen Adenosinrezeptors ermitteln.

#### 4.2.2.2. *House - keeping - Gen:*

##### *Glycerinaldehyd - 3 - Phosphat - Dehydrogenase (GAPDH)*

Auch bei Normierung auf GAPDH zeigen sich in der Betrachtung der relativen Expressionsstärke in den einzelnen Altersgruppen eine ähnliche Verteilungen wie in der Analyse ohne Unterteilung nach Alter. Im Gegensatz zur Normierung auf S – 18 lässt sich hier ein deutlicher Unterschied in Verteilung der Expression der Rezeptoren erkennen. In beiden Altersgruppen liegen die Mittelwerte des A<sub>2B</sub> – Rezeptors höher als die der anderen Rezeptoren (Abb. 21).



**Abb. 22 Vergleich der relativen Expressionen der Adenosinrezeptoren der zwei Altersgruppen bezogen auf das HKG GAPDH.**

Es besteht ein deutlicher Unterschied im Verhältnis der Rezeptorexpression, besonders in der Altersgruppe 1. In Altersgruppe 2 sind die Unterschiede bei größeren Schwankungsbreiten geringer.

n = 10 für A<sub>1</sub>R , A<sub>2A</sub>R und A<sub>2B</sub>R, n = 9 für A<sub>3</sub>R in AG 1

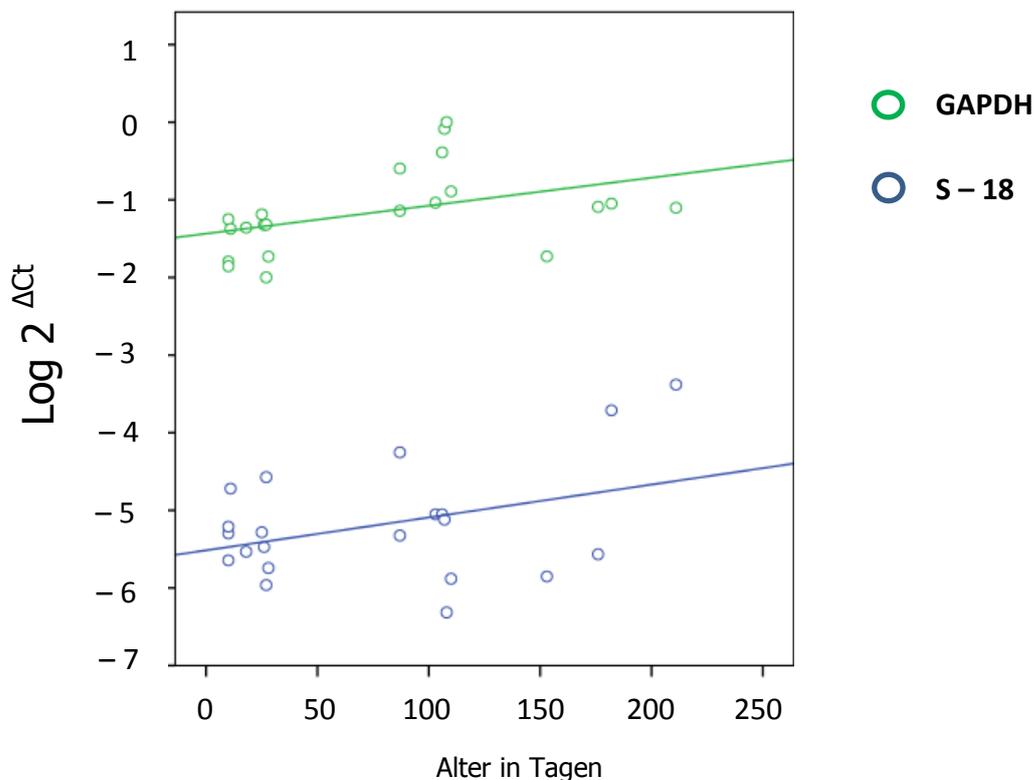
n = 11 für alle Rezeptoren in AG 2

Die relativen Expressionen nehmen für die Rezeptorsubtypen A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> und A<sub>2B</sub> in der AG 2 auch hier zu. Für den A<sub>3</sub>R bleibt die relative Expression unabhängig von der Altersgruppe konstant. Bei Vergleich der relativen Expressionsstärken der vier Adenosinrezeptoren zeigen sich zwischen A<sub>1</sub> – , A<sub>2A</sub> – und A<sub>3</sub> – Rezeptor keine signifikanten Unterschiede in beiden

Altersgruppen. Der  $A_{2B}$  – Rezeptor ist in Altersgruppe 1 signifikant stärker exprimiert als die anderen drei, in Altersgruppe 2 zeigt sich ein signifikanter Unterschied zu der mittleren Expression der Rezeptoren  $A_{2A}$  und  $A_3$  (Abb. 22).

### 4.2.3. Betrachtung der einzelnen Adenosinrezeptoren

#### 4.2.3.1. Der Adenosin – 1 – Rezeptor



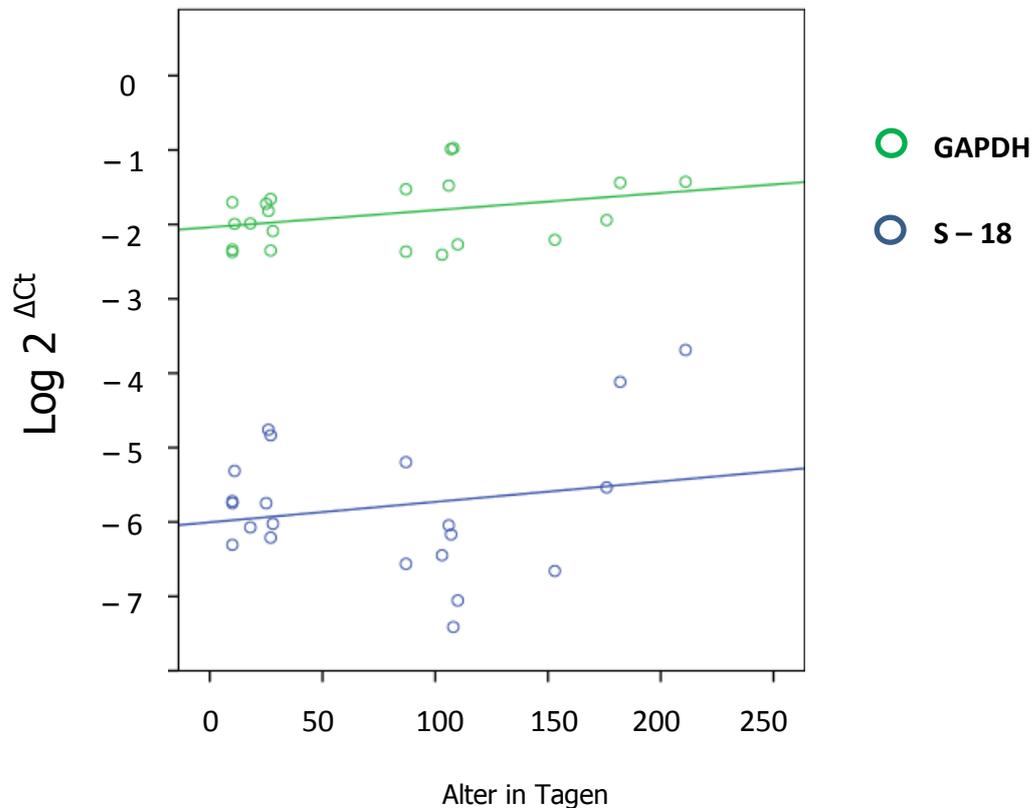
**Abb. 23 Einzelwerte der relativen Expression des  $A_1$  – Rezeptors bezogen auf S – 18 und GAPDH.**

Die Einzelwerte zeigen einen leichten Anstieg der relativen Expression. Die Regressionsgerade für die Normierung auf S – 18 ist zwar ansteigend jedoch ohne Signifikanz. Die Regressionsgerade ist für die Normierung auf GAPDH signifikant ansteigend ( $r = 0,609$  ( $p < 0,05$ )).

Die Expression für den  $A_1$  – Rezeptor zeigt sowohl bei Normierung auf S – 18 als auch auf GAPDH mit zunehmendem Alter ansteigende Werte. Bei Bestimmtheitsmaßen von 0,14 bzw. 0,183 ist davon auszugehen, dass kein linearer Zusammenhang zwischen Alter und relativer Expression vorliegt. Die Korrelation nach Spearman zwischen Expression des  $A_1R$  normiert auf S – 18 und Alter beträgt  $r = 0,07$  ( $p > 0,05$ ), normiert auf GAPDH zeigt sich eine Korrelation von 0,609 ( $p < 0,05$ ).

Während in der Normierung auf S-18 kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten in beiden Altersgruppen besteht ( $7,4 \times 10^{-6}$  in AG 1 vs.  $6,4 \times 10^{-5}$  in AG 2;  $p > 0,05$ ), ergibt sich in der Normierung auf das House-keeping-Gen GAPDH ein statistisch sicherer Unterschied. Die Mittelwerte für die Expression des A<sub>1</sub>-Rezeptors steigen von  $0,036 (\pm 0,006)$  in AG 1 auf  $0,277 (\pm 0,10)$  in AG 2 ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3.2. Der Adenosin-2A-Rezeptor



**Abb. 24 Einzelwerte der relativen Expression des A<sub>2A</sub>-Rezeptors bezogen auf S-18 und GAPDH.**

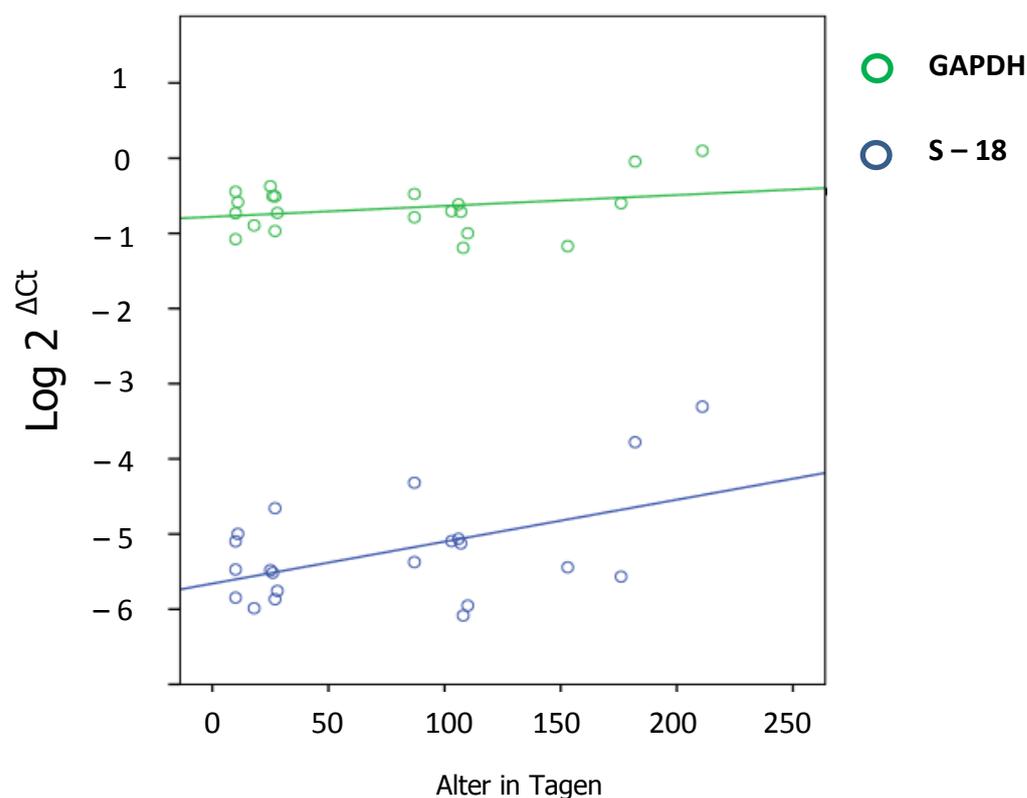
Die Einzelwerte zeigen einen leichten Anstieg der relativen Expression. Die Regressionsgerade für die Normierung auf S-18 ist zwar ansteigend jedoch ohne Signifikanz. Für die Normierung auf GAPDH ergibt sich  $r = 0,502$  ( $p < 0,05$ ).

Für den Adenosin-2A-Rezeptor stellt sich die Situation ähnlich wie für den zuvor betrachteten Adenosin-1-Rezeptor dar. Es lässt sich zumindest für die Normierung auf GAPDH wieder eine signifikante Korrelation nach Spearman mit 0,502 ermitteln ( $p < 0,05$ ). Für die Normierung auf S-18 ergibt sich ein Wert von  $-0,052$  ( $p > 0,05$ ) (Abb. 24). Die Mittelwerte in den beiden Altersgruppen steigen an, jedoch sind sie nicht signifikant verschieden. Für die Normierung auf S-18 ergeben sich folgende Werte: Der Mittelwert beträgt in der AG 1  $4,5 \times 10^{-6} (\pm 2,0 \times 10^{-6})$ , in der AG 2 steigt der

Mittelwert auf  $2,7 \times 10^5$  ( $\pm 1,9 \times 10^5$ ). Gerade in der AG 2 besteht eine größere Streuung der Werte, deutlich größer als in AG 1 (Abb. 21).

In der Normierung auf das zweite House – keeping – Gen GAPDH steigen die Mittelwerte von AG 1 zu AG 2 hin an. In der AG 1 beträgt er  $0,12$  ( $\pm 0,002$ ), in der AG 2  $0,34$  ( $\pm 0,01$ ). Die Spannweite in der Altersgruppe 2 ist größer als die der jüngeren Altersgruppe. Im Vergleich der relativen Expressionen für beide Normierungen ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der beiden Altersgruppen zu verzeichnen.

#### 4.2.3.3. Der Adenosin – 2B – Rezeptor



**Abb. 25 Einzelwerte der relativen Expression des A<sub>2B</sub> – Rezeptors bezogen auf S – 18 und GAPDH.**

Die Einzelwerte zeigen einen leichten Anstieg der relativen Expression.

S – 18:  $r = 0,21$  ( $p > 0,05$ )

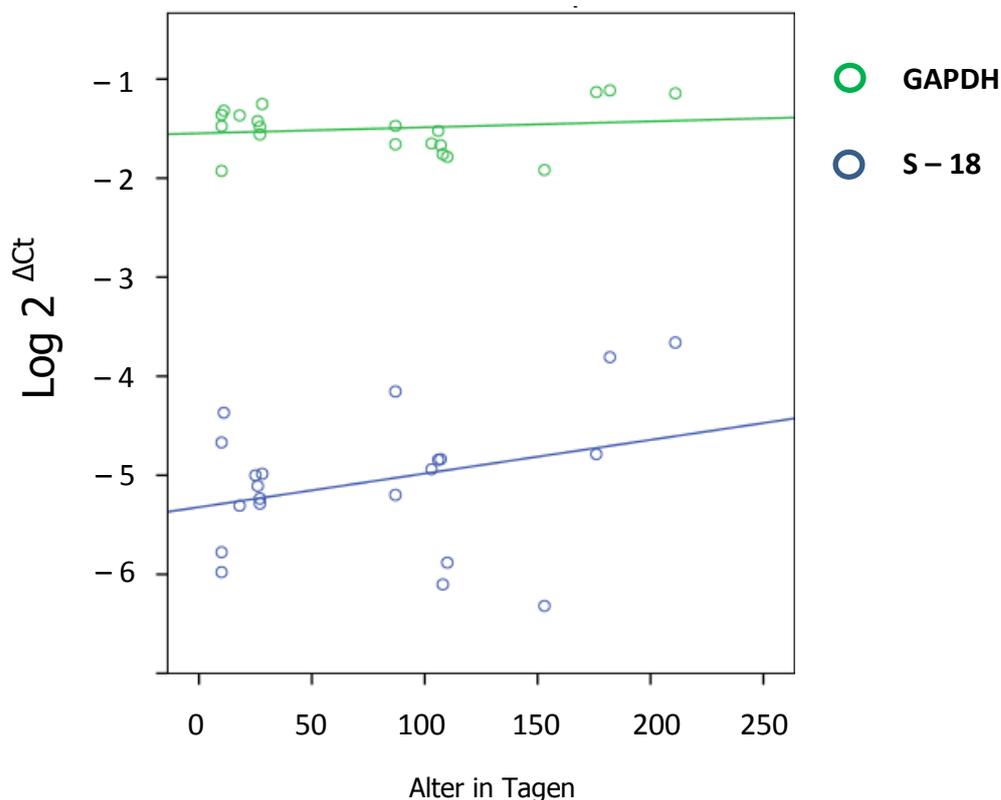
GAPDH:  $r = 0,044$  ( $p > 0,05$ )

Es folgt die Betrachtung der Ergebnisse bezüglich des Adenosin – 2B – Rezeptors. Die Korrelation nach Spearman zwischen Expression normiert auf S – 18 und Alter beträgt  $r = 0,210$  ( $p > 0,05$ ), auf GAPDH normiert  $r = 0,044$  ( $p > 0,05$ ) (Abb. 25). Für keine der beiden Normierungen bestehen somit signifikante Zusammenhänge zwischen Alter und Rezeptorexpression.

Die Mittelwerte der auf S – 18 normierten Expressionswerte zeigen sich ansteigend mit zunehmendem Alter. Der Mittelwert für die AG 1 beträgt  $1,1 \times 10^{-5}$  ( $\pm 4,0 \times 10^{-6}$ ). In der AG 2 steigt der Mittelwert auf  $4,6 \times 10^{-5}$  ( $\pm 2,2 \times 10^{-5}$ ) an. In beiden Altersgruppen weisen die Daten ähnliche Spannweiten auf. Die Medianwerte sind ebenso von Altersgruppe 1 zu Altersgruppe 2 hin ansteigend.

In der Darstellung der Expressionswerte in der Normierung auf GAPDH als HKG zeigen sich die Mittelwerte in den Altersgruppen ebenso ansteigend, von 0,24 ( $\pm 0,04$ ) in der AG 1 zu 0,34 ( $\pm 0,11$ ) in der AG 2. Im Vergleich mittels t – Test bestätigt sich, dass für keine der Normierungen der Unterschied zwischen den Altersgruppen signifikant ist.

#### 4.2.3.4. Der Adenosin – 3 – Rezeptor



**Abb. 26 Einzelwerte der relativen Expression des A<sub>3</sub> – Rezeptors bezogen auf S – 18 und GAPDH.**

Die Regressionsgeraden steigen beide leicht an.

S – 18:  $r = 0,22$  ( $p > 0,05$ )

GAPDH:  $r = 0,05$  ( $p > 0,05$ )

Die Mittelwerte in der Normierung auf das HKG S – 18 steigen von  $1,1 \times 10^{-5}$  ( $\pm 4,0 \times 10^{-6}$ ) in AG 1 auf  $4,6 \times 10^{-5}$  ( $\pm 2,2 \times 10^{-5}$ ) in AG 2. Besonders in der Altersgruppe 2 besteht eine hohe Spannweite der Werte. In der Altersgruppe 1 sind 2 Extremwerte zu verzeichnen. Die Mediane verhalten sich analog zu den Mittelwerten. Sie nehmen von  $6,8 \times 10^{-6}$  in der AG 1 auf  $1,4 \times 10^{-5}$  in der AG 2 zu (Abb. 21).

In der Normierung auf GAPDH fallen deutlich kleinere Spannbreiten und höhere absoluten Zahlen der relativen Expression auf. Die Mittelwerte der zwei Altersgruppen liegen nah beieinander mit  $3,7 \times 10^{-2}$  in AG 1 und  $3,6 \times 10^{-2}$  in AG 2. (Abb. 22).

Die Mittelwerte der relativen Expression der zwei Altersgruppen sind in der Normierung auf die HKG nicht signifikant voneinander verschieden. Eher lässt sich in der Normierung auf GAPDH ein leichter Abfall vermuten (Abb. 26).

## 5. Diskussion

### *Funktionelle Untersuchungen*

Adenosin ist ein endogener Transmitter, der vielfältige Funktionen im Körper übernimmt, von kardial (Bonney et al. 2014), über Modulation von Homöostase und Modulation auf synaptischem Niveau im Zentralnervensystem (Cunha 2001) bis hin zu Wirkung auf die glatte Muskulatur (Polosa und Blackburn 2009; Werkström und Andersson 2005). In der Blase wurden alle 4 Adenosinrezeptoren nachgewiesen, wobei die Verteilung der Rezeptoren im Organ nicht homogen ist.

Die funktionellen Versuche mit der Methode des Organbades zeigen diese relaxierende Wirkung. In den durchgeführten Versuchen ist bei hohen verabreichten Adenosin – konzentrationen (100  $\mu$ M und 400  $\mu$ M) in der Mehrzahl der Versuche ein Abfallen des Ruhetonus beobachten (Kapitel 4.1.4.1). Dieser Abfall des Tonus ist jedoch nicht sicher quantifizierbar. Zudem fehlt die Möglichkeit die unterschiedlichen absoluten Kontraktionskräfte der einzelnen Präparate so zu normieren, dass ein interindividueller Vergleich möglich wird. Eine Kontraktionsauslösung mit dem Acetylcholinagonisten Carbachol wird ebenso versucht, jedoch ist aus den in Kapitel 4.1.3 genannten Punkten eine sichere Ermittlung der Adenosinwirkung nicht möglich. Wahrscheinlich ist durch die Kontraktionsauslösung über metabolische Wege via M – Rezeptoren die Einflussmöglichkeit von Adenosin auf die kontraktionsauslösenden Prozesse verringert möglich. Da M – Rezeptoren an  $G_i$  – Proteine gekoppelt sind (Alzheimer et al. 2009) wirkt Adenosin über die  $A_{2a}$  – und  $A_{2b}$  – Rezeptoren antagonistisch zu Acetylcholin.

Daher folgt der Entschluss einer Kontraktionsauslösung mittels KCl-Konzentrationserhöhung und damit die Auslösung einer Kontraktion via Depolarisation der Zellen. Diese Kontraktion ist dank standardisierter KCl-Konzentrationsanhebung auf 30 mM zuverlässig reproduzierbar und wird als interindividuell vergleichbar angesehen. Zudem besteht keine Interaktion mit G – Protein – gekoppelten Rezeptoren, sodass eine unmaskierte Adenosinwirkung angenommen werden kann. Es erfolgt zunächst eine Kontraktionsauslösung und darauffolgend die Gabe des Adenosins. Der Tonusabfall kann prozentual zur vorherigen Kontraktion erfasst werden.

Der von Werkström und Andersson beschriebene Tonusverlust von maximal 72 % konnte in den Versuchen auch bei der glatten Muskulatur der Harnblase des hier verwendeten Rattenmodells nachvollzogen werden (Werkström und Andersson 2005).

Bei Gabe von Adenosin nach einer Vorkontraktion mit KCl zeigt sich eine dosisabhängige Verminderung der Restkontraktion der Muskulatur. Die minimale Restkontraktion nach Adenosingabe beträgt 55 % der vorherigen Kontraktion mit 30 mM Kaliumchlorid (Abb. 11). Dies bedeutet eine Relaxation von 45 %. Die ermittelte Adenosindosis mit halbmaximaler Wirkung ( $ED_{50}$ ) beträgt 50  $\mu$ M.

Im Altersvergleich zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen AG 1 und AG 2. Für die jungen Tiere wird eine  $ED_{50}$  vom 40  $\mu$ M ermittelt, bei den älteren Tieren liegt dieser Wert bei 60  $\mu$ M. Die maximale Relaxation liegt in der Altersgruppe 1 bei 55 % und in der AG 2 bei 25 %. Diese Werte liegen jeweils recht nah an dem durch Extrapolation vermutetem und dem durch Werkström beschriebenem Maximaleffekt. In Folge dessen wurde auf die Gabe höherer Adenosinkonzentrationen verzichtet. Ein vollständiger Tonusverlust ist nach Adenosingabe nicht zu erwarten. Die Relaxation wird über cAMP und schließlich über die Proteinkinase A vermittelt und kann daher die Kontraktionsvorgänge nur metabolisch modifizieren. Eine vollständige Auslöschung der KCl – Antwort kann durch Blockade des Calcium – Einstromes z.B. durch Einsatz von Calciumkanal – Blockern erfolgen (Alzheimer et al. 2009)

Ähnliche Werte werden für die Restkontraktion bei der Gabe von Adenosin vor Kaliumchlorid – Gabe erfasst. Bei maximaler Dosis von 400  $\mu$ M Adenosin beträgt die verbliebene Kontraktion noch 25 % der Referenzkontraktion. Die  $ED_{50}$  – Werte von 40  $\mu$ M bei jungen Tieren, beziehungsweise 60  $\mu$ M bei den älteren Tieren entsprechen etwa den bei Adenosingabe nach KCl – Gabe ermittelten  $ED_{50}$  – Werten (Abb. 13). Somit ist eine unterschiedliche Wirksamkeit von Adenosin in Abhängigkeit des Alters der Versuchstiere zu vermuten. Zudem deuten die Unterschiede in den  $ED_{50}$  – Werten zwischen Altersgruppe 1 (45  $\mu$ M) und Altersgruppe 2 (60  $\mu$ M) auf eine veränderte Potenz des Adenosins mit dem Alter hin. Mit steigender  $ED_{50}$  sind höhere Dosen an Adenosin erforderlich, um eine gleiche Wirkung zu erzielen. Gleichzeitig zeigt sich auch ein rückläufiger Maximaleffekt. Diese Unterschiede in der Wirksamkeit des Adenosins sind in allen applizierten Dosen zu erkennen. Insgesamt zeigt sich also eine signifikant geringere Wirkung des Adenosins auf die

Harnblasenmuskulatur der älteren Versuchstiere (Abb. 13). Der Unterschied in der Wirksamkeit von Adenosin ist sowohl bei Applikation vor, als auch nach KCl sicher reproduzierbar und weist in beiden Abläufen signifikante Unterschiede bei Adenosinkonzentrationen von 40  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$  auf. Der Zeitpunkt der Gabe, ob nach oder vor der Kontraktion durch Kaliumchlorid, spielt also keine Rolle für die Wirksamkeit von Adenosin.

Im Vergleich der Altersgruppen nimmt die Restkraft bei Gabe von Adenosin nach KCl von ca. 40 % in der AG 1 auf 72 % in der AG 2 für eine Adenosinkonzentration von 400  $\mu\text{M}$  zu. Wenn Adenosin vor KCl appliziert wird, ist die Zunahme der Restkraft auch zu beobachten, jedoch steigt der Wert von etwa 12 % auf 35 %. Auch die Differenzen der Kraftänderungen der anderen Adenosindosen weisen nur geringe Unterschiede in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt auf. Die Abnahme der Wirksamkeit von Adenosin von AG 1 zu AG 2 ist also unabhängig vom Zeitpunkt der Applikation. In der Altersgruppe 1 sind die Restkontraktionskräfte bei Adenosinkonzentrationen von 40  $\mu\text{M}$  und höher signifikant verschieden im Hinblick auf die Applikationsreihenfolge von Adenosin und Kaliumchlorid. In der Altersgruppe 2 ergeben sich bei sämtlichen verwendeten Adenosinkonzentrationen signifikante Unterschiede in der verbleibenden Restkraft.

Für die Vorinkubation besteht also eine deutlich stärkere Wirkung des Adenosins auf die nachfolgende Kontraktion. Eine mögliche Erklärung könnte hierfür das Zeitintervall zwischen Applikation von Adenosin und Kaliumchlorid sein. In den drei Minuten vor Zugabe des Kaliumchlorids gelangt das Adenosin in das Gewebe und kann in Folge dessen tiefergelegene Gewebsschichten erreichen. Adenosin kann also an mehr Adenosinrezeptoren bzw. an tiefergelegene Rezeptoren binden. Hier befinden sich vor allem die für die Relaxation verantwortlichen  $A_{2B}$  – Rezeptoren (Weiqun Yu 2006). Der Effekt der quantitativ stärkeren Wirkung lässt bei kleineren Adenosinkonzentrationen ( $\leq 10 \mu\text{M}$ ) nach und ist in der AG 1 bei Konzentrationen  $< 10 \mu\text{M}$  nicht mehr zu beobachten. Verantwortlich könnten mehrere Mechanismen sein. Durch den geringeren Konzentrationsunterschied zwischen zugegebener Adenosinlösung und Organbadlösung ist der Diffusionsgradient geringer und es dauert länger bis die Adenosinkonzentration im Gewebe angestiegen ist. Eine andere Möglichkeit wäre, dass bei geringerer Adenosinmenge durch enzymatische Aktivität die effektive Adenosinkonzentration weiter reduziert wird (Kurata et al 1995).

Zeitabstände zwischen Adenosin – und KCl – Applikation von 5 und 10 Minuten wurden erprobt. Bei 5 Minuten Zeitabstand fällt die Wirkung schwächer aus, mit 10 Minuten Zeitabstand ist die Wirkung nicht sicher messbar. Bei längerer Wartezeit wird das zugegebene Adenosin wahrscheinlich von ubiquitär vorhandenen Adenosin – Desaminasen desaminiert (Kurata 1995). Das entstehende Inosin hat eine weitaus geringere Affinität zu den Adenosinrezeptoren (Fredholm et al. 2011). Eine andere Möglichkeit besteht in der Phosphorylierung von Adenosin zu AMP durch Kinasen. Das AMP hat keine Wirkung auf die Adenosinrezeptoren (Fredholm et al. 2001).

Die Schwankungsbreiten der Messwerte sind bei Applikation von Adenosin vor KCl erkennbar größer. Offensichtlich ist die Wirksamkeit von Adenosin nach Kontraktion konstanter als die bei Gabe des Adenosins vor der Kontraktionsauslösung. Ein Grund für die inkonstantere Wirkung ist eventuell die mangelnde Stabilität aufgrund der Metabolisierung durch Desaminasen oder Kinasen des Adenosins im Organbad (Kurata 1995; Podgorska et al. 2005). Dies spielt in der Gabe nach KCl kaum eine Rolle, da die Wirkung innerhalb von Sekunden bis wenigen Minuten maximal ausgeprägt ist. Bei Vorinkubation jedoch vergehen 3 Minuten bis zur Gabe von KCl. Dieses Zeitfenster gibt die Möglichkeit, dass sich das Adenosin zum einen in der Organbadlösung frei verteilen kann, zum anderen besteht ein längerer Einwirkzeitraum für die oben beschriebenen enzymatischen Prozesse (Adenosindesaminasen, Nukletid – Kinasen, Desensitivierungsprozesse) um auf die effektive Adenosindosis Einfluss zu nehmen. Ein weiterer Grund für die größeren Konfidenzintervalle ist durch die Tatsache gegeben, dass die mit Adenosin modulierten Kontraktionen auf eine Ausgangskontraktion bezogen werden. Obwohl sichergestellt wird, dass die Homöostase gewahrt bleibt, die Temperatur konstant und die Kontraktionen vergleichbar sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass wegen der anhaltenden fehlenden Perfusion die Kontraktionsmechanismen negativ beeinflusst werden. Immer wieder durchgeführte Standardbezugskontraktionen vor Versuchskontraktionen könnten diesen Einfluss minimieren, sind jedoch zeitlich aufwendig und nur mit einer höheren Anzahl an Versuchstieren durchführbar.

Adenosinkonzentrationen von bis zu 4  $\mu\text{M}$  verursachen weder bei älteren, noch bei jüngeren Tieren, eine signifikante Veränderung der Kontraktionskraft verglichen mit der Zeitkontrolle. Die berichteten Affinitäten der untersuchten Adenosinrezeptoren  $A_1$ ,  $A_{2A}$ , und  $A_3$  ( $K_i$  für Rezeptoren  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_3$ : 100 – 310 nM) (Fredholm et al. 2011) liegen in diesem Bereich. Die bisher berichteten physiologischen Adenosinkonzentrationen liegen im Bereich  $< 4 \mu\text{M}$ . Im ZNS sind Adenosinkonzentrationen von 40 – 460 nM mittels Mikrodialyse nachgewiesen worden. Ballarín et al. und Andiné et al. berichten, dass Adenosinkonzentrationen von bis zu 1  $\mu\text{M}$  1 Stunde nach Einsetzen einer Ischämie nachgewiesen werden konnten (Andiné et al. 1990).

Aus den erhobenen Werten mit  $\text{ED}_{50}$  – Werten von 40 – 60  $\mu\text{M}$  Adenosin kann geschlussfolgert werden, dass die relaxierende bzw. kontraktionshemmende Wirkung des applizierten Adenosins am ehesten auf die  $A_{2B}$  – Rezeptoren zurückzuführen ist. Die  $A_{2B}$  – Rezeptoren weisen nur im Vergleich mit den anderen Adenosinrezeptoren eine geringe Affinität zu Adenosin auf ( $K_i = 15 \mu\text{M}$ ) (Fredholm et al. 2011). Im Organbad war eine sichere Wirkung erst ab 4  $\mu\text{M}$  zu verzeichnen. Diese Konzentrationen von 4  $\mu\text{M}$  liegen aber deutlich höher als die von Ballarín et al. postulierten extrazellulären Adenosinkonzentrationen. Die experimentell verwendeten Adenosinkonzentrationen werden prinzipiell in der gesamten Kammer des Organbades hergestellt. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Applikation des Adenosins von oben mittels Pipette in das Organbad erfolgt. Durch Begasung und dadurch ausgelöste Konvektion verteilt sich die applizierte Substanz relativ schnell. Ein Zeitraum dieser Verteilung kann jedoch nicht genau terminiert werden. Möglicherweise finden während dieser Latenz zwischen Zugabezeitpunkt und Zeitpunkt des Erreichens einer gleichmäßigen Pharmakonkonzentration Desensitivierungsprozesse statt. So wären die supraphysiologischen Adenosinkonzentrationen erklärbar, die notwendig sind um die beobachteten Vorgänge auszulösen. Die Diskrepanz zwischen berichteten Adenosin – konzentrationen und verwendeten Konzentrationen könnte auch auf der räumlich nahen Freisetzung von Adenosin zu den Rezeptoren in vivo beruhen. Beschrieben ist, dass die Adenosinfreisetzung durch Connexine (Okada et al. 2006) oder durch Hydrolyse durch membranständige Nukleotidasen direkt an der Zellmembran (Knight et al. 2002; Yu et al. 2011) stattfindet. Die Latenzzeit wäre deutlich geringer mit resultierender verminderter Desensitivierung.

Bei Adenosingabe nach Vorkontraktion liegen die Mittelwerte der Restkontraktionen bei den verwendeten Adenosinkonzentrationen 0,4  $\mu\text{M}$  bis 4  $\mu\text{M}$  leicht über denen der Zeitkontrollversuche. (Abb. 13, vergl. Restkraft der TC und der Adenosindosen 0,4 mM und 1  $\mu\text{M}$ ). Die Adenosinkonzentrationen liegen damit näher am  $K_i$ -Wert des für die Kontraktion verantwortlich gemachten des  $A_1$ -Rezeptors ( $K_i = 100 \text{ nM}$ ) (Fredholm et al. 2011). Die Tonuszunahme bei den geringen getesteten Adenosindosen ist allerdings nicht signifikant und kann nicht zuverlässig reproduziert werden. Eine Wirkung dieser Rezeptoren kann also allenfalls vermutet werden und wird möglicherweise teilweise durch die relaxierende Wirkung des  $A_{2b}$ -Rezeptors überdeckt.

### *Molekulargenetische Untersuchung mittels real time Polymerasekettenreaktion*

Im funktionellen Teil der Arbeit zeigt sich, dass die relaxierende Wirkung des Adenosins mit dem Alter der Versuchstiere abnimmt. Als Annahme für die PCR stand somit, dass entweder die Expression der kontraktionsauslösenden Rezeptoren zunimmt, oder dass die der kontraktionshemmenden Rezeptoren abnimmt. Mittels real time PCR (rt PCR) und in-situ-Hybridisierung sind alle 4 Adenosinrezeptorsubklassen in der Harnblase der Ratte nachgewiesen. Die  $A_1$ -Rezeptoren finden sich vor allem an apikalen Schichten die anderen 3 Rezeptoren sind in allen Schichten des Urothels nachweisbar. In der Muskulatur des Detrusor findet sich vor allem der  $A_{2B}$ -Rezeptor (Weiqun Yu 2006). Das Verhältnis der Subtypen weist eine stärkere Expression von  $A_{2A}$  und  $A_{2B}$  auf, verglichen mit dem  $A_1$ - und dem  $A_3$ -Rezeptorsubtyp (Dixon et al. 1996). Northern-Blot-Analysen zeigen das Überwiegen des  $A_{2B}$ -Subtyps (Stehle et al. 1992). Ähnliches konnte in der durchgeführten real time PCR nachgewiesen werden. In der Normierung auf GAPDH zeigt sich, dass der  $A_{2B}$ -Rezeptor stärker exprimiert wird sowie der  $A_{2A}$ -Rezeptor vermindert. Zwischen den anderen Rezeptoren ( $A_1$  und  $A_3$ ) bestehen keine Unterschiede in der qualitativen Expression. In Bezug auf das House-keeping-Gen S-18 zeigen sich dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Expressionen der Rezeptoren. Die Ergebnisse von Dixon et al. und Stehle et al. konnten also, zumindest teilweise, bestätigt werden. Vor allem durch das Überwiegen der  $A_{2B}$ -Rezeptoren lässt sich die relaxierende Wirkung des Adenosins erklären. Wie der  $A_{2A}$ -Rezeptor interagiert auch der  $A_{2B}$ -Rezeptor mit  $G_s$ -Proteinen. Pharmakologische Bestätigung gelang in weiteren Experimenten mittels des spezifischen  $A_{2B}$ -Rezeptor-Agonisten BAY 60-6583.

Im Gewebe von jungen Ratten ließen sich die durch KCl ausgelösten Kontraktion signifikant vermindern, wohingegen das Gewebe von alten Versuchstieren weniger sensitiv auf den  $A_{2B}$  – Rezeptor – Agonisten BAY 60 – 6583 reagierte (Weller et al. 2015).

Signifikante Zunahmen mit geringer Korrelation sind in der Normierung auf GAPDH für den  $A_1$  – Rezeptor und dem Alter erkennbar (Abb. 23). In der Normierung auf das House – keeping – Gen  $S - 18$  sind für alle vier Adenosinrezeptoren keine signifikanten Korrelationen zwischen Expressionen und Alter zu erkennen (Kapitel 4.2.3). Es lässt sich also feststellen, dass mit dem Alter alleinig der  $A_1$  – Rezeptor in Bezug auf ein HKG eine signifikante Veränderung seiner Expression zeigt. Prinzipiell wäre ein verminderte relaxierende Wirkung von Adenosin so zu erklären. Bei weitestgehend konstanter Expression der relaxierend wirkenden Rezeptoren  $A_{2A}$  und  $A_{2B}$  und zunehmender Expression des kontrahierend wirkenden Rezeptors  $A_1$  überwiegen die prokontraktile Wirkungen. Die schon zuvor beschriebene prokontraktile Wirkung des Adenosins, die bei geringen Dosen auch bei den Tieren der Altersgruppe 1 beobachtet werden konnte, ist in der Altersgruppe 2 stärker als in der Altersgruppe 1 ausgeprägt (Kap. 4.1.4.1, Abb. 13).

Wie schon angesprochen ist neben der Expression der Adenosinrezeptoren auch ihre Affinität, die zugehörige Kopplung an G – Proteine und die Kompetenz diese G – Proteine zu beeinflussen, ungemein wichtig für die effektive Wirkung. Die Affinität von Adenosin zum  $A_{2B}$  – Rezeptor ist geringer als zum  $A_{2A}$  – Rezeptor, die Fähigkeit den cAMP – Spiegel zu modifizieren, ist bei Bindung an den  $A_{2B}$  – Subtyp mehr als 50 – fach geringer im Vergleich zum  $A_{2A}$  – Subtyp (Fredholm et al. 2001). Somit ist bei physiologischen Adenosinkonzentrationen wie sie von Andiné et al. beschrieben wurden, nur eine sehr geringe Bindung des Adenosins an diese Rezeptoren zu erwarten. Somit sind die hohen, supraphysiologischen notwendigen Dosen, die zur Relaxationsauslösung notwendig sind, erklärbar. Konzentrationen bis  $4 \mu\text{M}$  wirken bei Gabe nach Vorkontraktion nur schwach relaxierend. Diese geringen Adenosinkonzentrationen binden wahrscheinlich eher an die kontrahierend wirkenden  $A_1$  – und/oder  $A_3$  – Rezeptoren, denn an den niedrigaffinen  $A_{2B}$  – Rezeptor. Vesela et al. 2011 beschreiben auch eine relaxierende Wirkung des  $A_1$  – Rezeptors, ohne dass jedoch der Wirkungsmechanismus geklärt ist, da sowohl der  $A_1$  – als auch der  $A_3$  – Rezeptor mit  $G_{i/o}$  – Proteinen und somit einem Abfall des cAMP – Spiegels verbunden sind (Müller und Jacobson 2011; Vesela et al. 2011).

Bei dieser Konstellation wäre eher eine Kontraktion als Antwort auf die Bindung an den  $A_1$  – Rezeptor zu erwarten (Jenner und Rose'Meyer 2006).

Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor für die unterschiedlichen erfassten Wirksamkeiten bei den Versuchsabläufen ist die Verteilung der Rezeptoren im Gewebe. Aufgrund der Präparationsmethode enthalten das Präparat im Organbad sowie die Probe, die für die PCR verwendet wird Urothel, Mucosa, glatte Muskulatur und Bindegewebe. Die Serosa wurde soweit wie möglich entfernt, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch hier vorhandene Adenosinrezeptoren eine Wirkung auf das gesamte Organ haben. Weiqun Yu et al. zeigen, dass die Verteilung der Adenosinrezeptoren nicht gleichmäßig über alle Gewebe der Blase ist. Der Adenosin – 1 – Rezeptor findet sich vorrangig an den apikalen Membranen der Deckzellen sowie in den oberen Schichten des Epithels. Der  $A_{2A}$  – Rezeptor kann im Zytoplasma aller drei beschriebenen Schichten des Urothels (Deckzellen, Intermediärzellen und Basalzellen) nachgewiesen werden, ist jedoch besonders im subepithelialen Gewebe exprimiert. Der  $A_{2B}$  – Rezeptor findet sich ebenso zytoplasmal in den Epithelzellen. Dieser Rezeptor ist aber auch vornehmlich im Gewebe der glatten Muskulatur des Detrusors nachweisbar. Der Adenosin – 3 – Rezeptor zeigt eine Expression im Epithel, jedoch weder submucosal noch in der Tunica muscularis (Weiqun Yu 2006; Stehle et al. 1992). Die Verteilung der Rezeptoren birgt eine Erklärung für die ausgesprochen relaxierende Wirkung des Adenosins. Die Muskulatur besitzt vor allem  $A_{2B}$  – Rezeptoren (Fredholm et al. 2001). Die relaxierende Wirkung des Adenosins ist trotz der relativ geringen Affinität des  $A_{2B}$  – Rezeptors gegenüber Adenosin dieser Situation geschuldet. Die Wirkung des mit  $G_s$  – Proteinen gekoppelten  $A_{2B}$  – Rezeptors kann in der Muskelzelle unmittelbaren Einfluss auf die kontraktile Vorgänge haben.

In der Betrachtung der Gabe von Adenosin nach Kaliumchlorid ist bei Dosen von 0,4 – 4  $\mu$ M wie schon zuvor beschrieben eine Zunahme der Kontraktionskraft zu beobachten. Diese Zunahme ist deutlich nicht – signifikant, jedoch könnte sie als Hinweis auf eine Adenosin – 1 – Rezeptor vermittelte Kontraktion zu werten sein (Müller und Jacobson 2011). Neben den schon beschriebenen physikalischen und pharmakologischen Faktoren für diese Wirkung kann die kontrahierende Wirkung auch auf der Verteilung der Rezeptoren in der Harnblase beruhen. Wie von Weiqun Yu et al. beschrieben, finden sich die prokontraktile  $A_1$  – Rezeptoren vorrangig epithelial.

Bei geringen Konzentrationen bindet Adenosin an diese oberflächlichen Rezeptoren. Diese Wirkung von kleinen Dosen Adenosin kann im zweiten Versuchsablauf, der vorherigen Gabe Adenosins und nachfolgender Kontraktion ausgelöst durch Kaliumchlorid, nicht beobachtet werden. Im Zeitfenster zwischen der Adenosin – und der KCl – Gabe unterliegt das Adenosin den schon zuvor besprochenen Prozessen. Es wird zum einen metabolisiert, zum anderen diffundiert es in das Blasengewebe und bindet hier an die eher von Myozyten exprimierten  $A_{2B}$  – Rezeptoren. Zusätzlich wird durch die vorgezogene Adenosingabe die Diffusion dieses in das Blasengewebe ermöglicht. Daraus ergibt sich eine Verringerung der Adenosinkonzentration im Organbad. Diese Vorgänge sind mögliche Ursachen, weshalb geringe Dosen Adenosin bei Gabe nach KCl zum Teil kontraktil wirken, bei Gabe vor KCl und längerer Einwirkzeit eher relaxationsfördernd.

Weitere kontraktionsinhibierende Mechanismen der glatten Muskulatur lassen sich wahrscheinlich auf eine Aktivierung von ATP – sensiblen  $K^+$  – Kanälen zurückzuführen. Diese wurden von Gopalakrishnan et al. beschrieben. Aufgrund des beschriebenen Wegs werden second messenger, vor allem cAMP und Calciumionen, im Sinne einer Relaxation beeinflusst (Abb. 2). Der  $A_{2B}$  – Rezeptor weist zusätzlich eine Kopplung an die Phospholipase C auf (Fredholm et al. 2001). Durch deren Aktivierung kommt es zu einem Anstieg der 3,4,5 – Inositoltriphosphat – Konzentration und in der Folge dessen zu einem Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels. Diese kontraktile Wirkung wird jedoch wahrscheinlich durch die relaxierenden Prozesse überdeckt.

Bei verminderter Relaxation ist eine verminderte Expression der  $A_2$  – Rezeptoren bzw. eine gesteigerte Expression der  $A_1$  – oder  $A_3$  – Rezeptoren zu erwarten. In beiden beobachteten Altersgruppen ist jedoch ein gleichbleibendes Verhältnis der Rezeptoren zueinander zu beobachten. Der Verlust der relaxierenden Wirkung kann daher nicht mit einer Änderung des Rezeptorenverhältnisses erklärt werden. In weiterführenden Experimenten mit humanem Gewebe konnte zwar kein Zusammenhang der Expression von kontrahierend – wirkenden  $A_1$  – oder  $A_3$  – Rezeptoren gezeigt werden, jedoch ist mit steigendem Alter ein signifikanter Rückgang der Expression von  $A_{2B}$  – Rezeptoren zu verzeichnen. Dies würde den verminderten Effekt von Adenosin erklären (Weller et al. 2015).

Owen et al. beschreiben neben einem Rückgang der relaxierenden Wirkung des beta – adrenergen Agonisten Isoprenalin auch einen Rückgang der relaxierenden Wirkung von Adenosin. Dieses Ergebnis wird durch weitere Studien bestätigt und auf eine Verminderung

der Kontraktion erweitert (Tugay et al. 2003, Owen et al. 2012, Wuest et al. 2008). So kann auch im Fall von Adenosin eine verminderte relaxierende Wirkung festgestellt werden. Als Grund für diese Veränderungen wurde eine Änderung in der Ausstattung mit G – Proteinen der Zellen vermutet. Allenfalls eine Zunahme der  $G_i$  – Proteine konnte nachgewiesen werden, nicht jedoch quantitative Veränderungen der  $G_s$  – oder  $G_i$  – Proteine. Schneider et al. 2005 registrierten keine Veränderung der G – Proteinkonzentrationen in Bezug auf das Alter. Im Falle der nachlassenden adenosinergen Relaxation könnte die Veränderung im geänderten Verhältnis der G – Proteine begründet liegen. Die verminderte Relaxation könnte mit einem Anstieg der  $G_i$  – Proteine bei gleichzeitigem Abfall der  $G_s$  – Proteine in Zusammenhang stehen. Dies kann im Zusammenhang mit den hier untersuchten Adenosinrezeptoren aber nicht geklärt werden.

Als weiteren Faktor der geänderten Adenosinwirkung spielen Alterungsprozesse der Gewebe eine Rolle. Jungdliches Gewebe scheint insgesamt stärker auf pharmakologische Beeinflussung zu reagieren als das Gewebe ausgewachsener Tiere. Die erhöhte Resistenz könnte auf degenerativen Prozessen beruhen, die mit steigendem Alter zunehmen. Bei Untersuchungen an humanem Gewebe konnte gezeigt werden, dass das Volumen von glatter Muskulatur zu Gunsten von Bindegewebe abnimmt (Lepor et al. 1992). Dieses Bindegewebe hat keine kontraktile Fähigkeiten und eine eventuelle Bindung von Adenosin an Rezeptoren dieser Zellen kann so keinen Einfluss auf den Muskeltonus haben. Ebenso führen infravesikale Obstruktionen zu einer Verschiebung des Verhältnisses von Bindegewebe zu Muskulatur zu Ungunsten der Muskulatur (Inui et al. 1999). So könnte eine verstärkte Fibrosierung der Blasenwand als normaler Alterungsprozess geringere Antworten sowohl auf relaxierende Transmitter, als auch auf kontrahierende Botenstoffe erklären (Tugay et al. 2003, Owen et al. 2012, Wuest et al. 2008). Eine erhöhte Rezeptorexpression könnte somit als sekundärer Prozess zu betrachten sein um auf die Abnahme der Compliance zu reagieren. Die verminderte Compliance und erhöhte intravesikale Drücke wirken sich möglicherweise auch auf die Mikrozirkulation aus. Bei Episoden der Ischämie treten zudem immer Schäden bei Reperfusion auf (Depre und Taegtmeyer 2000). Adenosin scheint bei solchen Episoden einen protektiven Effekt zu haben, sodass eine erhöhte Adenosinrezeptordichte als Schutzmechanismus gewertet wird (Khaliulin et al. 2014; Zhou et al. 2014). Bei Dehnung setzt das Endothel ATP bzw. Adenosin frei (Knight et al. 2002).

Diese Stoffe dienen zum einen für afferente Neuronen als Transmitter (Dunning – Davies et al. 2013), zum anderen führt Adenosin wie beschrieben zu einer Relaxation des Gewebes. Die Relaxation durch Adenosin könnte auch in der Harnblase ein Schutzmechanismus sein bzw. zur Eigenschaft der Urinspeicherung beitragen.

### *Evaluation der house keeping Gene*

Bezüglich der relativen Expression der Adenosinrezeptoren sind große Unsicherheiten der Messwerte festzustellen, gezeigt durch die Spannweite der Werte. Diese sind vor allem in der Relativierung auf die HKG begründet. Die Ct – Werte der Adenosinrezeptoren weisen nur geringe Schwankungen auf und auch die Ct – Werte für die S – 18 – Untereinheit (S – 18 – UE) liegen recht konstant, jedoch liegen diese mit 8,4 deutlich niedriger als die mit den Ct – Werten der Adenosinrezeptoren (Tab. 3). Dies spricht für eine deutlich stärkere Expression der S – 18 – Untereinheit verglichen mit den Adenosinrezeptoren. Die Standardabweichung liegt zwar für alle beobachteten Gene etwa im gleichen Bereich zwischen 1,4 und 1,9. Jedoch beträgt die Standardabweichung für die S – 18 – UE ca. 20 % des mittleren Ct – Werte. Dadurch entstehen in der Normierung starke Abweichungen. Die relative Expression schwankt nach Berechnung mittels der  $\Delta\Delta$  – Ct – Methode bis zu  $10^{-4}$  und  $10^{-7}$ . Im Gegensatz zu der S – 18 – UE hat sich GAPDH als House – keeping – Gen bewährt. Die Ct – Werte für GAPDH liegen mit 21,3 deutlich näher an denen der Adenosinrezeptoren (Tab. 3). So ergeben sich rechnerisch geringere relative Varianzen und somit auch geringere Varianzen für die relative Expression der Adenosinrezeptoren (Abb. 20). Die Normierung auf GAPDH als HKG ergibt bei selber Berechnung deutlich höhere Werte, die im Bereich von  $10^{-2}$  bis 1 liegen. In Folge dessen weisen die errechneten relativen Expressionen deutlich geringere Spannweiten auf. Dies gilt insbesondere für die Untersuchung innerhalb der Altersgruppen, da hier geringere Untersuchungszahlen vorliegen (Vergl. Abb. 21 vs. Abb. 22).

Schlussfolgernd stellt sich die ribosomale Untereinheit S – 18 nicht als ideales HKG zur Betrachtung der Adenosinrezeptoren dar. Durch große Expressionsunterschiede ergeben sich die oben genannten Probleme, wodurch keine statistisch belastbaren Ergebnisse erreicht werden. Mit der Glycerinaldehyd – 3 – Phosphat – Dehydrogenase bestehen zwar auch noch einige Unsicherheiten, aber es sind statistische Aussagen bezüglich der relativen Adenosinrezeptorexpression möglich.

In Hinblick auf die überreaktive Blase muss gesagt werden, dass das Tiermodell mit nachlassender Relaxation bei Adenosinabgabe mit zunehmendem Alter einen Forschungsansatz für weitere pharmakologische Therapieoptionen darstellen kann. Möglich wären selektive Adenosin –  $A_{2b}$  – Rezeptorantagonisten, die über diesen Rezeptor zu einer Relaxation des Detrusors führen könnten. Da jedoch der  $A_{2b}$  – Rezeptor vielfach im Körper exprimiert ist, sind vielfältige Nebenwirkungen zu erwarten. Ein neuer Therapieansatz ist daher durch die Beeinflussung des equilibrativen Nucleosidtransporters (ENT1) als pharmakologisches Ziel gegeben (Baldwin et al. 2004; Lu et al. 2002). Ein Block dieses Transmembrantransporters mittels KW – 7158 führt zur Erhöhung der extrazellulären Adenosinkonzentration und vermindert die Zahl der spontanen Detrusorkontraktionen im *in vitro* – Versuch (Nishiya et al. 2014). Die Inhibition des ENT1 als indirekter Adenosinagonist wurde in Zusammenhang mit 4 – AP – sensitiven  $K^+$  – Kanälen beschrieben (Liu et al. 2004). Vermutet wird eine Regulation des Adenosinlevels durch ENT1, Adenosindesaminasen und Adenosinkinasen. Eventuell ergibt sich hiermit eine Möglichkeit zur Therapie der OAB unter Vermeidung der starken Nebenwirkungen, die bei der heutigen Therapie mit anti – muskarinergen Substanzen auftreten. Bisher finden diese neuen Substanzen allen vor allem in der Tumorthherapie Anwendung. Hier verspricht man sich durch vorherige Analyse die mögliche Responsivität verschiedener Tumorentitäten auf Chemotherapeutika zu erschließen (North et al. 2014, Wu et al. 2014)

## 6. Zusammenfassung

Adenosin wirkt dosisabhängig relaxierend auf die Blasenmuskulatur. Maximal kann eine Relaxation von 75 % bei Applikation von 400  $\mu\text{M}$  Adenosin beobachtet werden. Die effektive Dosis unterscheidet sich hierbei zwischen jungen und alten Tieren ( $\text{EC}_{50}$  alt vs. jung: 60  $\mu\text{M}$  vs. 40  $\mu\text{M}$ ). Kleinere Dosen scheinen dagegen eher kontrahierende Wirkung zu haben, was auf eine Bindung an die höheraffinen  $A_1$  – und  $A_3$  – Rezeptoren zurückzuführen sein könnte. Der Applikationszeitpunkt hat dabei nur geringen Einfluss auf den maximalen Effekt, eventuell hervorgerufen durch die Verteilung der Rezeptoren in der Blasenwand. Vier Adenosinrezeptoren wurden in der Literatur beschrieben. Alle konnten im Rahmen dieser Arbeit mittels real time PCR bestätigt werden. Die Rezeptoren  $A_1$ ,  $A_{2A}$  und  $A_3$  zeigen keine großen quantitativen Unterschiede in ihrer relativen Expression. Bestätigt werden konnte eine stärkere Expression des  $A_{2B}$  – Rezeptors (Owen et al. 2012). Der  $A_1$  – Rezeptor zeigt eine altersabhängige Veränderung in der relativen Expression bezogen auf das HKG GAPDH. Mit zunehmendem Alter besteht ein Anstieg der Expression des  $A_1$  – Rezeptors ( $r = 0,61$ ,  $p < 0,05$ ). Bezogen auf das House – keeping – Gen S – 18 sind für alle Rezeptoren Zunahmen in der Expression zu beobachten. Allerdings erweist sich S – 18 als House – keeping – Gen ungeeignet, da die Expressionsunterschiede zwischen dem HKG und den Adenosinrezeptoren sehr groß sind. So ergeben sich große interindividuelle Unterschiede mit geringer Verlässlichkeit. Obwohl also die Wirkung des Adenosins in vitro abnimmt, wird allenfalls die Zunahme von prokontrahierenden Rezeptoren beobachtet. Ob der Wirkungsverlust von Adenosin auf geringere Konzentrationslevel von Adenosin oder auf einer veränderten Signalübertragung intrazellulär begründet ist, sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

## 7. Literaturverzeichnis

Abbracchio, M. P.; Brambilla, R.; Ceruti, S.; Kim, H. O.; von Lubitz, D K; Jacobson, K. A.; Cattabeni, F. (1995): G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain. In: *Mol. Pharmacol.* 48 (6), S. 1038–1045.

Alzheimer, Christian; Hescheler, Jürgen; Köhling, Rüdiger; Speckmann, Erwin-Josef; Speckmann-Hescheler-Köhling (2009): Physiologie. [mit dem Plus im Web]. 5. Aufl., [2. Nachdr.]. München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer.

Andersson, Karl-Erik (2004): Antimuscarinics for treatment of overactive bladder. In: *Lancet Neurol* 3 (1), S. 46–53.

Andiné, P.; Rudolphi, K. A.; Fredholm, B. B.; Hagberg, H. (1990): Effect of propentofylline (HWA 285) on extracellular purines and excitatory amino acids in CA1 of rat hippocampus during transient ischaemia. In: *Br. J. Pharmacol.* 100 (4), S. 814–818.

Aronsson, Patrik; Andersson, Michael; Ericsson, Therese; Giglio, Daniel (2010): Assessment and characterization of purinergic contractions and relaxations in the rat urinary bladder. In: *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 107 (1), S. 603–613. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2010.00554.x.

Baldwin, Stephen A.; Beal, Paul R.; Yao, Sylvia Y. M.; King, Anne E.; Cass, Carol E.; Young, James D. (2004): The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. In: *Pflugers Arch.* 447 (5), S. 735–743. DOI: 10.1007/s00424-003-1103-2.

Ballarín, M.; Fredholm, B. B.; Ambrosio, S.; Mahy, N. (1991): Extracellular levels of adenosine and its metabolites in the striatum of awake rats: inhibition of uptake and metabolism. In: *Acta Physiol. Scand.* 142 (1), S. 97–103. DOI: 10.1111/j.1748-1716.1991.tb09133.x.

Baraldi, P. G.; Cacciari, B.; Romagnoli, R.; Merighi, S.; Varani, K.; Borea, P. A.; Spalluto, G. (2000): A(3) adenosine receptor ligands: history and perspectives. In: *Med Res Rev* 20 (2), S. 103–128.

Bonney, Stephanie; Hughes, Kelly; Eckle, Tobias (2014): Anesthetic Cardioprotection: The Role of Adenosine. In: *Curr. Pharm. Des* 20 (36) S. 5690–5695.

Cunha, R. A. (2001): Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. In: *Neurochem. Int.* 38 (2), S. 107–125.

Depre, C.; Taegtmeyer, H. (2000): Metabolic aspects of programmed cell survival and cell death in the heart. In: *Cardiovasc. Res.* 45 (3), S. 538–548.

Dixon, A. K.; Gubitz, A. K.; Sirinathsinghji, D. J.; Richardson, P. J.; Freeman, T. C. (1996): Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. In: *Br. J. Pharmacol.* 118 (6), S. 1461–1468.

Dunning–Davies, Bryony M.; Fry, Christopher H.; Mansour, Dina; Ferguson, Douglas R. (2013): The regulation of ATP release from the urothelium by adenosine and transepithelial potential. In: *BJU Int.* 111 (3), S. 505–513. DOI: 10.1111/j.1464–410X.2012.11421.x.

Elliott, Michael R.; Chekeni, Faraaz B.; Trampont, Paul C.; Lazarowski, Eduardo R.; Kadl, Alexandra; Walk, Scott F. et al. (2009): Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. In: *Nature* 461 (7261), S. 282–286. DOI: 10.1038/nature08296.

Fredholm, B. B.; IJzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Klotz, K. N.; Linden, J. (2001): International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. In: *Pharmacol. Rev.* 53 (4), S. 527–552.

Fredholm, Bertil B.; IJzerman, Adriaan P.; Jacobson, Kenneth A.; Linden, Joel; Müller, Christa E. (2011): International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors—an update. In: *Pharmacol. Rev.* 63 (1), S. 1–34. DOI: 10.1124/pr.110.003285.

Garcia, Guilherme J M; Picher, Maryse; Zuo, Peiying; Okada, Seiko F.; Lazarowski, Eduardo R.; Button, Brian et al. (2011): Computational model for the regulation of extracellular ATP and adenosine in airway epithelia. In: *Subcell. Biochem.* 55, S. 51–74. DOI: 10.1007/978–94–007–1217–1\_3.

Gopalakrishnan, Sujatha M.; Buckner, Steven A.; Milicic, Ivan; Groebe, Duncan R.; Whiteaker, Kristi L.; Burns, David J. et al. (2002): Functional characterization of adenosine receptors and coupling to ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in Guinea pig urinary bladder smooth muscle. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300 (3), S. 910–917.

Griebing, Tomas L. (2013): Overactive bladder in elderly men: epidemiology, evaluation, clinical effects, and management. In: *Curr Urol Rep* 14 (5), S. 418–425. DOI: 10.1007/s11934–013–0367–0.

Hautmann, Richard; Huland, Hartwig (2006): Urologie. Mit 176 Tabellen. 3., überarb. Aufl. Heidelberg: Springer (Springer–Lehrbuch).

Inui, E.; Ochiai, A.; Naya, Y.; Ukimura, O.; Kojima, M. (1999): Comparative morphometric study of bladder detrusor between patients with benign prostatic hyperplasia and controls. In: *J. Urol.* 161 (3), S. 827–830.

Jenner, Tamsin L.; Rose'Meyer, Roselyn B. (2006): Loss of vascular adenosine A1 receptors with age in the rat heart. In: *Vascul. Pharmacol.* 45 (6), S. 341–349. DOI: 10.1016/j.vph.2006.05.005.

Khaliulin, Igor; Halestrap, Andrew P.; Bryant, Simon M.; Dudley, Declan J.; James, Andrew F.; Suleiman, M–Saadeh (2014): Clinically–relevant consecutive treatment with isoproterenol and adenosine protects the failing heart against ischaemia and reperfusion. In: *J Transl Med* 12 (1), S. 139. DOI: 10.1186/1479–5876–12–139.

Kim, Insook; Yang, Dongjin; Tang, Xinyu; Carroll, John L. (2011): Reference gene validation for qPCR in rat carotid body during postnatal development. In: *BMC Res Notes* 4, S. 440. DOI: 10.1186/1756–0500–4–440.

King, Anne E.; Ackley, Michael A.; Cass, Carol E.; Young, James D.; Baldwin, Stephen A. (2006): Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. In: *Trends Pharmacol. Sci.* 27 (8), S. 416–425. DOI: 10.1016/j.tips.2006.06.004.

Knight, G. E.; Bodin, P.; Groat, W. C. de; Burnstock, G. (2002): ATP is released from guinea pig ureter epithelium on distension. In: *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282 (2), S. F281–8. DOI: 10.1152/ajprenal.00293.2000.

Kurata, N. (1995): Adenosine deaminase. In: *Nippon Rinsho* 53 (5), S. 1178–1183.

Lepor, H.; Sunaryadi, I.; Hartanto, V.; Shapiro, E. (1992): Quantitative morphometry of the adult human bladder. In: *J. Urol.* 148 (2 Pt 1), S. 414–417.

Liu, Tao; Fujita, Tsugumi; Kawasaki, Yasuhiko; Kumamoto, Eiichi (2004): Regulation by equilibrative nucleoside transporter of adenosine outward currents in adult rat spinal dorsal horn neurons. In: *Brain Res. Bull.* 64 (1), S. 75–83. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2004.05.002.

Lu, Shing–Hwa; Yamagata, Tsuyoshi; Atsuki, Kaoru; Sun, Lushen; Smith, Christopher P.; Yoshimura, Naoki et al. (2002): Effect of KW–7158, a putative afferent nerve inhibitor, on bladder and vesico–vascular reflexes in rats. In: *Brain Res.* 946 (1), S. 72–78.

Moll, Karl-Josef; Moll, Michaela (2000): Anatomie. Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog. 16., überarb. Aufl. München, Jena: Urban und Fischer (GK 1).

Müller, Christa E.; Jacobson, Kenneth A. (2011): Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1808 (5), S. 1290–1308. DOI: 10.1016/j.bbamem.2010.12.017.

Nagy, A. K.; Knowles, A. F.; Nagami, G. T. (1998): Molecular cloning of the chicken oviduct ecto-ATP-diphosphohydrolase. In: *J. Biol. Chem.* 273 (26), S. 16043–16049.

Nishiya, Yoichi; Yamagata, Tsuyoshi; Fukuda, Ayumu; Yokokawa, Sachiko; Seishi, Takashi; Sakuma, Takashi et al. (2014): The anti-overactive bladder activity of KW-7158 is mediated by blocking equilibrative nucleoside transporter-1. In: *Biol. Pharm. Bull.* 37 (1), S. 130–136.

North, Scott; El-Gehani, Faraj; Santos, Cheryl; Ghosh, Sunita; Lai, Raymond; Cass, Carol E.; Mackey, John R. (2014): Expression of nucleoside transporters and deoxycytidine kinase proteins in muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder: correlation with pathological response to neoadjuvant platinum/gemcitabine combination chemotherapy. In: *The Journal of urology* 191 (1), S. 35–39. DOI: 10.1016/j.juro.2013.07.006.

Okada, Seiko F.; Nicholas, Robert A.; Kreda, Silvia M.; Lazarowski, Eduardo R.; Boucher, Richard C. (2006): Physiological regulation of ATP release at the apical surface of human airway epithelia. In: *J. Biol. Chem.* 281 (32), S. 22992–23002. DOI: 10.1074/jbc.M603019200.

Owen, Suzanne J.; Massa, Helen H.; Rose-Meyer, Roselyn B. (2012): Loss of adenosine A2B receptor mediated relaxant responses in the aged female rat bladder; effects of dietary phytoestrogens. In: *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 385 (5), S. 539–549. DOI: 10.1007/s00210-011-0722-y.

Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic Acids Res.* 29 (9), S. e45.

Pinna, Christian; Glass, Rainer; Knight, Gillian E.; Bolego, Chiara; Puglisi, Lina; Burnstock, Geoffrey (2005): Purine- and pyrimidine-induced responses and P2Y receptor characterization in the hamster proximal urethra. In: *Br. J. Pharmacol.* 144 (4), S. 510–518. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706047.

Podgorska, Marzena; Kocbuch, Katarzyna; Pawelczyk, Tadeusz (2005): Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. In: *Acta Biochim. Pol.* 52 (4), S. 749–758.

Polosa, Riccardo; Blackburn, Michael R. (2009): Adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. In: *Trends Pharmacol. Sci.* 30 (10), S. 528–535. DOI: 10.1016/j.tips.2009.07.005.

Robson, Simon C.; Wu, Yan; Sun, Xiaofeng; Knosalla, Christoph; Dwyer, Karen; Enyoji, Keiichi (2005): Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. In: *Semin. Thromb. Hemost.* 31 (2), S. 217–233. DOI: 10.1055/s-2005-869527.

Ronquist, G.; Brody, I. (1985): The prostasome: its secretion and function in man. In: *Biochim. Biophys. Acta* 822 (2), S. 203–218.

Schneider, Tim; Hein, Peter; Michel-Reher, Martina B.; Michel, Martin C. (2005): Effects of ageing on muscarinic receptor subtypes and function in rat urinary bladder. In: *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 372 (1), S. 71–78. DOI: 10.1007/s00210-005-1084-0.

Schumacher, S. (2006): Epidemiologie und Pathophysiologie der überaktiven Blase. In: *Urologe A* 45 (7), S. 822–825. DOI: 10.1007/s00120-006-1076-9.

Spray, David C.; Ye, Zu-Cheng; Ransom, Bruce R. (2006): Functional connexin “hemichannels”: A critical appraisal. In: *Glia* 54 (7), S. 758–773. DOI: 10.1002/glia.20429.

Stehle, J. H.; Rivkees, S. A.; Lee, J. J.; Weaver, D. R.; Deeds, J. D.; Reppert, S. M. (1992): Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A<sub>2</sub>-adenosine receptor subtype. In: *Mol. Endocrinol.* 6 (3), S. 384–393.

Strobel, R. S.; Nagy, A. K.; Knowles, A. F.; Buegel, J.; Rosenberg, M. D. (1996): Chicken oviductal ecto-ATP-diphosphohydrolase. Purification and characterization. In: *J. Biol. Chem.* 271 (27), S. 16323–16331.

Tugay, Melih; Yildiz, Fürüzan; Utkan, Tijen; Gacar, Nejat; Ulak, Güner; Erden, Faruk (2003): Age-related smooth muscle reactivity changes in the rat bladder: an in vitro study. In: *Pharmacol. Res.* 48 (4), S. 329–334.

Turner, W. H.; Brading, A. F. (1997): Smooth muscle of the bladder in the normal and the diseased state: pathophysiology, diagnosis and treatment. In: *Pharmacol. Ther.* 75 (2), S. 77–110.

Vesela, Renata; Aronsson, Patrik; Tobin, Gunnar (2011): Functional and morphological examinations of P1A1 purinoceptors in the normal and inflamed urinary bladder of the rat. In: *Auton Neurosci* 159 (1–2), S. 26–31. DOI: 10.1016/j.autneu.2010.07.008.

Weiqun Yu, Lefteris C. Zacharia Edwin K. Jackson and Gerard Apodaca (2006): Adenosine receptor expression and function in bladder uroepithelium. In: *AJP: Cell Physiology* 291 (2), S. C254. DOI: 10.1152/ajpcell.00025.2006.

Weller, Johannes; Pose, Manuela; Protzel, Chris; Mader, Felix; Porath, Katrin; Köhling, Rüdiger et al. (2015): Age-related decrease of adenosine-mediated relaxation in rat detrusor is a result of A2B receptor downregulation. In: *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* 22 (3), S. 322–329. DOI: 10.1111/iju.12679.

Werkström, Viktoria; Andersson, Karl-Erik (2005): ATP- and adenosine-induced relaxation of the smooth muscle of the pig urethra. In: *BJU Int.* 96 (9), S. 1386–1391. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2005.05853.x.

Wu, Fenglei; Zhang, Jian; Hu, Nan; Wang, Huiyu; Xu, Tongpeng; Liu, Yi; Zheng, Yitong (2014): Effect of hENT1 polymorphism G-706C on clinical outcomes of gemcitabine-containing chemotherapy for Chinese non-small-cell lung cancer patients. In: *Cancer epidemiology* 38 (6), S. 728–732. DOI: 10.1016/j.canep.2014.08.008.

Wuest, Melinda; Eichhorn, Birgit; Braeter, Manfred; Strugala, Gerhard; Michel, Martin C.; Ravens, Ursula (2008): Muscarinic receptor expression and receptor-mediated detrusor contraction: comparison of juvenile and adult porcine tissue. In: *Pflugers Arch.* 456 (2), S. 349–358. DOI: 10.1007/s00424-007-0407-z.

Wuest, Melinda; Morgenstern, Kathrin; Graf, Eva-Maria; Braeter, Manfred; Hakenberg, Oliver W.; Wirth, Manfred P.; Ravens, Ursula (2005): Cholinergic and purinergic responses in isolated human detrusor in relation to age. In: *J. Urol.* 173 (6), S. 2182–2189. DOI: 10.1097/01.ju.0000158126.53702.e4.

Yamanishi, Tomonori; Chapple, Christopher R.; Yasuda, Kosaku; Yoshida, Kenichiro; Chess–Williams, Russell (2002): The role of beta(3)–adrenoceptors in mediating relaxation of porcine detrusor muscle. In: *Br. J. Pharmacol.* 135 (1), S. 129–134. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704470.

Yoshida, M.; Homma, Y.; Inadome, A.; Yono, M.; Seshita, H.; Miyamoto, Y. et al. (2001): Age–related changes in cholinergic and purinergic neurotransmission in human isolated bladder smooth muscles. In: *Exp. Gerontol.* 36 (1), S. 99–109.

Yu, Weiqun; Robson, Simon C.; Hill, Warren G.; Chadwick, Brian P. (2011): Expression and Distribution of Ectonucleotidases in Mouse Urinary Bladder. In: *PLoS ONE* 6 (4), S. e18704. DOI: 10.1371/journal.pone.0018704.

Zhang, Q.; Li, Y.; Tsien, R. W. (2009): The Dynamic Control of Kiss–And–Run and Vesicular Reuse Probed with Single Nanoparticles. In: *Science* 323 (5920), S. 1448–1453. DOI: 10.1126/science.1167373.

Zhou, Juan; Zimmermann, Katrin; Krieg, Thomas; Soltow, Marieke; Pavlovic, Dragan; Cerny, Vladimir; Lehmann, Christian (2014): Adenosine receptor activation improves microcirculation in experimental intestinal ischemia/reperfusion. In: *Clin. Hemorheol. Microcirc.* DOI: 10.3233/CH–141846.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

2 – APB	2 – Aminoethoxydiphenyl – Borat
2 – Me – S – ADP	2 – Methylthioadenosindiphosphat
$\alpha, \beta$ – Me – ATP	$\alpha, \beta$ – Methylenadenosin – 5' – triphosphat
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromol/l
A <sub>1</sub> – Rezeptor	Adenosin – 1 – Rezeptor
A <sub>2A</sub> – Rezeptor	Adenosin – 2A – Rezeptor
A <sub>2B</sub> – Rezeptor	Adenosin – 2B – Rezeptor
A <sub>3</sub> – Rezeptor	Adenosin – 3 – Rezeptor
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
ADP	Adenosin – 5' – diphosphat
AG	Altersgruppe
AMP	Adenosin – 5' – monophosphat
aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosin – 5' – triphosphat
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium – 2+ – Ionen
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches 3',5' – Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ED <sub>50</sub>	Konzentration des halbmaximalen Effektes
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
GDP	Guanosin – 5' – diphosphat
G <sub>i/o</sub>	inhibitorisches G – Protein
G <sub>q/11</sub>	Phospholipase C stimulierendes G – Protein
G <sub>s</sub>	Adenylatcyclase stimulierendes G – Protein
G – Protein	Guaninnukleotid – bindendes Protein
GTP	Guanosin – 5' – triphosphat
IP <sub>3</sub>	Inositol – 1,4,5 – triphosphat
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
M.	Musculus
M	Mol/l
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minuten
ml	Milliliter
MLCK	Myosin – leichte – Ketten – Kinase
MLCP	Myosin – leichte – Ketten – Phosphatase
mM	Millimol/l
mN	Millinewton
M – Rezeptor	muskarinerges Acetylcholinrezeptor
mRNA	Messenger – RNA

mV	Millivolt
n	Anzahl
nM	nanomol/l
Na <sup>+</sup>	Natrium – Ionen
NANC	non – adrenergic – non – cholinergic transmitter
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
OAB	overactive bladder (überaktive Blase)
p	Wahrscheinlichkeit
P <sub>2</sub> XR	Purinrezeptor
PCR	Polymerase – Ketten – Reaktion
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol – 4,5 – bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
pM	pikomol/l
RNA	Ribonukleinsäure
S.	Seite
s, sek	Sekunden
Tab.	Tabelle
Y 27632 – Dichlorid	(R) – (+) – trans – 4 – (1 – Aminoethyl) – N – (4 – Pyridyl)cyclohexanecarboxamide – Dihydrochlorid
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 9. Abbildungs – und Tabellenverzeichnis

Abb. 1	Die vegetative Innervation der Blase.	S. 5
Abb. 2	Darstellung der Adenosinrezeptoren und deren second messenger.	S. 7
Abb. 3	Aufzeichnung des Verlaufes von Spontankontraktionen im Ruhetonus eines Blasenfragmentes im Organbad.	S. 24
Abb. 4	Verlauf der Kontraktionskraft nach Zugabe von Carbachol (Organbadkonzentration von 100 $\mu\text{M}$ ).	S. 25
Abb. 5	Verlauf der Kontraktionskraft nach Zugabe von Carbachol (Organbadkonzentration von 0,1 $\mu\text{M}$ ).	S. 26
Abb. 6	Vergleich der Dosis – Wirkungsbeziehung von Carbachol mit und ohne rho – Kinase – Inhibitor Y27632.	S. 27
Abb. 7	Verlauf der tonischen und der phasischen Komponente in Ruhe bei Zugabe von Adenosin zum Erreichen einer Konzentration von 40 $\mu\text{M}$ im Organbad.	S. 28
Abb. 8	Verlauf der Kontraktionskraft bei Zugabe von Adenosin nach Carbacholgabe.	S. 29
Abb. 9	Verlauf der Kontraktionskraft während der Osmolalitätskontrolle.	S. 30
Abb. 10	Kontraktionsverlauf bei Gabe von Kaliumchlorid und anschließender Gabe von Adenosin.	S. 31
Abb. 11	Dosis – Wirkungskurve der durch Adenosin verursachten Relaxation nach Vorkontraktion durch KCl.	S. 32
Abb. 12	Restkraft nach Adenosingabe in Abhängigkeit vom Alter der Tiere für die Adenosinkonzentrationen 400 $\mu\text{M}$ und 100 $\mu\text{M}$ .	S. 33
Abb. 13	Dosis – Wirkungskurven für die zwei betrachteten Altersgruppen abhängig von der Adenosinkonzentration.	S. 34
Abb. 14	Bezugskontraktion ausgelöst durch 30 mM Kaliumchlorid ohne Gabe von Adenosin.	S. 36

Abb. 15	Verlauf der Kontraktion nach 100 $\mu$ M Adenosin und nachfolgender Gabe von Kaliumchlorid.	S. 37
Abb. 16	Dosis – abhängige Reduktion der Kontraktionskraft durch Adenosingabe vor Kaliumchlorid.	S. 38
Abb. 17	Darstellung der Restkraft nach Adenosingabe in Abhängigkeit vom Alter der Tiere für die Adenosinkonzentrationen 400 $\mu$ M, 100 $\mu$ M und 40 $\mu$ M.	S. 39
Abb. 18	Dosis – Wirkungskurve der Kontraktionskraft bei Vorbehandlung mit verschiedenen Dosen Adenosin.	S. 41
Abb. 19	Vergleich der relativen Expression der Adenosinrezeptoren bezogen auf das House – keeping – Gen S – 18.	S. 44
Abb. 20	Vergleich der relativen Expressionen der Adenosinrezeptoren bezogen auf das House – keeping – Gen GAPDH.	S. 46
Abb. 21	Vergleich der relativen Expressionen der Adenosinrezeptoren der zwei Altersgruppen bezogen auf das HKG S – 18.	S. 47
Abb. 22	Vergleich der relativen Expressionen der Adenosinrezeptoren der zwei Altersgruppen bezogen auf das HKG GAPDH.	S. 48
Abb. 23	Einzelwerte der relativen Expression des A <sub>1</sub> – Rezeptors bezogen auf S – 18 und GAPDH.	S. 49
Abb. 24	Einzelwerte der relativen Expression des A <sub>2A</sub> – Rezeptors bezogen auf S – 18 und GAPDH.	S. 50
Abb. 25	Einzelwerte der relativen Expression des A <sub>2B</sub> – Rezeptors bezogen auf S – 18 und GAPDH.	S. 51
Abb. 26	Einzelwerte der relativen Expression des A <sub>3</sub> – Rezeptors bezogen auf S – 18 und GAPDH.	S. 52
Tab. 1	Basensequenz der zur PCR genutzten Primer.	S. 13
Tab. 2	Verwendete Chemikalien und Auflistung der Konzentrationen mit resultierenden Konzentrationen im Organbad.	S. 18

Tab. 3	Mittelwerte und Standardabweichung der Ct – Werte der untersuchten Gene.	S. 43
Gleichung 1	Boltzmannfunktion	S. 20
Gleichung 2	Effizienzbestimmung	S. 23
Gleichung 3	Normierung des Zielgens auf das house – keeping – Gen	S. 23

## **Danksagung**

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herr Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling für die Bereitstellung des Projektes am Oscar Langendorff Institut für Physiologie an der Universität Rostock bedanken.

Mein besonderer Dank gebührt Herr PD Dr. med. Timo Kirschstein für die Überlassung des interessanten Themas, die fachliche Unterstützung, für die vielen wertvollen Anregungen und Diskussionen sowie die konstruktive Kritik beim Erstellen dieser Arbeit.

Herzlich danken möchte ich Dipl. – Biol. Marco Rohde, Dipl. – Chem. Katrin Porath, Dipl. – Biol. Tina Sellmann, Silvia Haase, Bernd Memmener, Felix Mader und allen weiteren Mitarbeitern des physiologischen Institutes für die praktische Unterstützung und stets freundliche Hilfe bei allen Fragestellungen.

## Anlage 1

### **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema „**Altersabhängige Adenosin – vermittelte Relaxation des Musculus detrusor vesicae der Ratte**“ selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall durch Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Ich erkläre hiermit weiterhin, dass ich meine wissenschaftlichen Arbeiten nach den Prinzipien der guten wissenschaftlichen Praxis gemäß der gültigen „Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zur Vermeidung wissenschaftlichen Fehlverhaltens“ an der Universität Rostock angefertigt habe.

Cottbus, den 25.05.2016

Unterschrift: