

OSCAR LANGENDORFF INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE

DIREKTOR: PROF. DR. RÜDIGER KÖHLING

DIE BEDEUTUNG DES TRPM7 - KANALS
FÜR DIE SPONTANAKTIVITÄT DER GLATTEN MUSKULATUR

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER MEDIZIN

DER

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON

CAROLIN MESTERMANN GEB. ADAMS | GEB. AM 18.10.1990 IN WARSTEIN

AUS WARSTEIN-HIRSCHBERG

ROSTOCK | JUNI 2020

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00003389

GUTACHTER:

ERSTGUTACHTER: PROF. DR. THOMAS NOACK

EINRICHTUNG: OSCAR LANGENDORFF INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE, ROSTOCK

ZWEITGUTACHTER: PD DR. RER. NAT. THOMAS BITTORF

EINRICHTUNG: INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE BIOCHEMIE UND MOLEKULARBIOLOGIE, ROSTOCK

DRITTGUTACHTER: PROF. DR. MED. RALF CZYMEK

EINRICHTUNG: KLINIKUM HOCHSAUERLAND, KLINIK FÜR ALLGEMEIN-, VISZERAL- UND MINIMALINVASIVE CHIRURGIE

EINREICHUNG: JUNI 2020

VERTEIDIGUNG: APRIL 2021

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
1.1	SPONTANAKTIVITÄT DES GLATTEN MUSKELS	2
1.2	SMC UND ICC - EIN NETZWERK	3
1.3	SPONTANAKTIVITÄT IN UNTERSCHIEDLICHEN ORGANEN	5
1.4	THEORIEN ZUM PACEMAKING	6
1.5	TRPM7 UND PACEMAKING.....	7
1.6	PHARMAKOLOGISCHE MODULATION DES TRPM7-KANALS	9
1.7	FRAGESTELLUNG UND METHODISCHER ANSATZ.....	14
II.	MATERIAL UND METHODEN.....	16
2.1	MESSUNG DER SPONTANEN AKTIVITÄT IM ORGANBAD.....	16
2.2	KONFOKALMIKROSKOPIE	23
2.3	STATISTIK	30
III.	ERGEBNISSE.....	31
3.1	MECHANISCHE MESSUNGEN	31
3.1.1	MESSUNGEN IN KREBSLÖSUNG	31
3.1.2	MESSUNGEN IN PHOSPHATFREIER HEPES-GEPUFFERTER LÖSUNG	33
3.1.3	UTERUS UNTER OXYTOCIN.....	33
3.1.4	KOPPLUNGSRESERVE	34
3.1.5	EFFEKTE DES POLYAMINS SPERMIN.....	36
3.1.5.1	EFFEKTE AUF DIE SPONTANAKTIVITÄT.....	36
3.1.5.2	EFFEKTE AUF DIE KONTRAKTILITÄT	40
3.1.6	EFFEKTE DES IONISIERTEN LANTHANS	42
3.1.6.1	EFFEKTE AUF DIE SPONTANAKTIVITÄT.....	43
3.1.6.2	EFFEKTE AUF DIE KONTRAKTILITÄT	46
3.1.7	EFFEKTE DURCH FLUFENAMINSÄURE	47
3.1.7.1	EFFEKTE AUF DIE SPONTANAKTIVITÄT.....	47
3.1.7.2	EFFEKTE AUF DIE KONTRAKTILITÄT	52

3.1.8	EFFEKTE DES CHINIDINS	54
3.1.8.1	EFFEKTE AUF DIE SPONTANAKTIVITÄT	54
3.1.8.2	EFFEKTE AUF DIE KONTRAKTILITÄT	58
3.2	FUNKTIONELLE MESSUNGEN AM KONFOKALMIKROSKOP	60
3.2.1	MORPHOLOGIE DER ZELLEN DER PRIMÄRKULTUR	60
3.2.2	SPONTANAKTIVITÄT UNTER NORMALBEDINGUNGEN	62
3.2.3	VERGLEICH SPONTANAKTIV OSZILLIERENDER REGIONEN	63
3.2.4	EINFLÜSSE DER TESTSUBSTANZ SPERMIN AUF DIE SPONTANAKTIVITÄT	64
3.2.5	EINFLÜSSE DER TESTSUBSTANZ LANTHAN AUF DIE SPONTANAKTIVITÄT	65
3.2.6	EINFLUSS DER TESTSUBSTANZEN AUF DEN KCL-INDUZIERTEN KALZIUMANSTIEG	66
IV.	DISKUSSION	68
4.1	BEWERTUNG DER ERGEBNISSE IM ORGANBAD	68
4.1.1	INTERPRETATIONSANSATZ	68
4.1.2	MÖGLICHE ANGRIFFSORTE DER TESTSUBSTANZEN	69
4.1.3	VERGLEICH DER GEWEBESPEZIFISCHEN UNTERSCHIEDE	79
4.2	BEWERTUNG DER FLUORESCENZSMIKROSKOPISCHEN MESSUNGEN	80
4.2.1	ZELLMORPHOLOGIE	80
4.2.2	FREQUENZ UND RHYTHMIK	81
4.2.3	EFFEKTE DER TESTSUBSTANZEN AUF DIE SPONTANAKTIVITÄT	81
4.3	FEHLERQUELLEN UND LIMITATIONEN DER METHODIK	83
4.3.1	ORGANBAD	83
4.3.2	ZELLKULTUR	84
V.	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	85
VI.	LITERATUR	86
VII.	ANHANG	93
7.1	VERÖFFENTLICHUNGEN	93
7.2	LEBENS LAUF	94
7.3	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	95
7.4	DANKSAGUNG	96

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACh	Acetylcholin
AK	Antikörper
AM-E	Acetoxymethylester
ANO-1	Anoctamin-1
Aqua dest.	Aqua destillata
BOR	Basaler organeigener Rhythmus
C. elegans	Caenorhabditis. Elegans
CHO	Chinese Hamster Ovary
c-Kit	Tyrosinkinase KIT
COX	Cyclooxygenase
CPM	Cycles per Minute
DFS	Divalent free solution = Lösung ohne divalente Kationen
DMSO	Dimethylsulfoxid
ENS	enterisches Nervensystem
FFA	Flufenaminsäure
GJ	Gap Junctions
HEK-293	Human Embrionic Kidney-293
IBS	Irritable Bowel Syndrome
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
ICC	Interstitielle Zelle nach Cajal
IP ₃	Inositol 1,4,5 -triphosphat
KCl	Kaliumchlorid

K _d	Dissoziationskonstante
K _{ir}	Inward rectifier potassium Channel
La	Lanthan
LES	Lower Esophageal Sphincter
MCF	Michigan Cancer Foundation
MR	Minutenrhythmus
MSC	Multi Spike Komplex
NRK	Normal Rat Kidney Cells
NSCC	Nicht selektiver Kationenkanal
PMU	Pacemaker Unit
PP	Pacemaker Potential
PV	Portalvene
SDM	Standardabweichung des Mittelwertes
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SMC	Smooth Muscle Cell
SR	Sekundenrhythmus
THS	Tyrode's solution, HEPES buffered
TRPM7	Transient Receptor Potential Melastatin-like 7
UP	Unitary Potential
VDCC	Voltage Dependent Calcium Channel

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER KOPPLUNG VON ICC UND SMC	4
ABBILDUNG 2: HYPOTHETISCHES MODELL ZUR INTEGRATION DES TRPM7-KANALS IN DEN PROZESS DES PACEMAKING DER ICCs IM GLATTEN MUSKEL	9
ABBILDUNG 3: DARSTELLUNG DER ORGANE IM RATTENSITUS.....	19
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHER VERSUCHSAUFBAU DES ORGANBADES MODIFIZIERT NACH GOLENHOFEN 1983	20
ABBILDUNG 5: ALLGEMEINES VERSUCHSSCHEMA	21
ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHER AUFBAU DES KONFOKALMIKROSKOPS	26
ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHER VERSUCHSABLAUF AM KONFOKALEN MIKROSKOP	27
ABBILDUNG 8: SCHEMATISCHER VERSUCHSABLAUF BEI TESTUNG DER KCL RESPONSE	27
ABBILDUNG 9: SCHEMA ZUR AUSWERTUNG DER AUFGEZEICHNETEN DATEN.....	29
ABBILDUNG 10: REGISTRIERUNG DER SPONTANAKTIVITÄT GLATTMUSKULÄRER ORGANPRÄPARATE UNTER KONTROLLBEDINGUNGEN.....	32
ABBILDUNG 11: VERGLEICH DER AKTIVITÄT ZWEIER VERSCHIEDENER ANTRUMPRÄPARATE IN PHYSIOLOGISCHER KREBSLÖSUNG UND IN PHOSPHATFREIER LÖSUNG	33
ABBILDUNG 12: EFFEKTE DES OXYTOCIN AUF DIE SPONTANAKTIVITÄT DES UTERUS	34
ABBILDUNG 13: KOPPLUNGSRESERVE DER UNTERSUCHTEN ORGANE.....	35
ABBILDUNG 14: ORIGINALREGISTRIERUNG DER SPONTANAKTIVITÄT DER PORTALVENE UNTER EINFLUSS DER TESTSUBSTANZ SPERMIN.	36
ABBILDUNG 15: STATISTISCHE DARSTELLUNG DER EFFEKTE VON SPERMIN	39
ABBILDUNG 16: EFFEKTE VON SPERMIN AUF DIE KONTRAKTILITÄT DER ORGANE	41
ABBILDUNG 17: ORIGINALREGISTRIERUNG DER SPONTANAKTIVITÄT DES UTERUS	42
ABBILDUNG 18: STATISTISCHE DARSTELLUNG DER EFFEKTE VON LANTHAN.....	45
ABBILDUNG 19: EFFEKTE VON LANTHAN AUF DIE KONTRAKTILITÄT DER ORGANE.....	47
ABBILDUNG 20: ORIGINALREGISTRIERUNG DER SPONTANAKTIVITÄT DES COLONS UNTER EINFLUSS DER TESTSUBSTANZ FFA.....	48
ABBILDUNG 21: STATISTISCHE DARSTELLUNG DER EFFEKTE VON FFA	51
ABBILDUNG 22: EFFEKTE VON FFA AUF DIE KONTRAKTILITÄT DER ORGANE	53
ABBILDUNG 23: REGISTRIERUNG DER SPONTANAKTIVITÄT DER PORTALVENE UNTER EINFLUSS DER TESTSUBSTANZ CHINIDIN.....	54
ABBILDUNG 24: STATISTISCHE DARSTELLUNG DER EFFEKTE VON CHINIDIN	57
ABBILDUNG 25: EFFEKTE AUF DIE EXOGENE KONTRAHIERBARKEIT DURCH CHINIDIN	58
ABBILDUNG 26: DARSTELLUNG VON ZELLEN MIT SMC-ÄHNLICHER MORPHOLOGIE IM PHASENKONTRAST	60

ABBILDUNG 27: DARSTELLUNG VON ZELLEN MIT ICC-ÄHNLICHER MORPHOLOGIE IM PHASENKONTRAST	61
ABBILDUNG 28: DARSTELLUNG DES OSZILLIERENDEN INTRAZELLULÄREN Ca^{2+} -SIGNALS	62
ABBILDUNG 29: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER ZEITABHÄNGIGEN KALZIUMOSZILLATION DREIER MESSFELDER.....	64
ABBILDUNG 30: REGISTRIERUNG EINER REGION MIT STABILER OSZILLIERENDER AKTIVITÄT UNTER EINFLUSS VON SPERMIN AUS EINER ZELLKULTUR AUS DEM CORPUS DES MAGENS.....	64
ABBILDUNG 31: STATISTISCHE DARSTELLUNG DER ÄNDERUNG DER AKTIVITÄT UNTER DER TESTSUBSTANZ SPERMIN	65
ABBILDUNG 32: REGISTRIERUNG EINER REGION MIT STABILER OSZILLIERENDER AKTIVITÄT UNTER EINFLUSS VON LANTHAN.....	65
ABBILDUNG 33: VERÄNDERUNG VON FREQUENZ UND AMPLITUDE DURCH LANTHAN.....	66
ABBILDUNG 34: REAKTIVITÄT AUF KCL BEI EINER NICHT-SPONTANAKTIVEN ICC	67
ABBILDUNG 35: ANSATZ FÜR DIE INTERPRETATION DER ERGEBNISSE IM ORGANBAD	69
ABBILDUNG 36: POTENZIELLE ANGRIFFSORTE DER IONENKANALBLOCKER	70
ABBILDUNG 37: INTERPRETATION DER ERGEBNISSE MIT SPERMIN	74
ABBILDUNG 38: INTERPRETATION DER ERGEBNISSE MIT LANTHAN.....	76
ABBILDUNG 39: INTERPRETATION DER ERGEBNISSE MIT FFA.....	78
ABBILDUNG 40: INTERPRETATION DER ERGEBNISSE MIT CHINIDIN	79
ABBILDUNG 41: DARSTELLUNG DER GEMESSENEN ENDPUNKTE IN ORGANBAD UND KONFOKALMIKROSKOPIE	81

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: HEMMUNG DES TRPM7-KANALS DURCH SPERMIN.....	11
TABELLE 2: HEMMUNG DES TRPM7-KANALS DURCH LANTHAN	12
TABELLE 3: HEMMUNG DES TRPM7-KANALS DURCH FLUFENAMINSÄURE	13
TABELLE 4: HEMMUNG DES TRPM7-KANALS DURCH CHINIDIN	13
TABELLE 5: ZUSAMMENSETZUNG DER PRÄPARIERLÖSUNG II.....	16
TABELLE 6: ZUSAMMENSETZUNG DER PHYSIOLOGISCHEN KREBSLÖSUNG	17
TABELLE 7: ZUSAMMENSETZUNG DER PHOSPHAT-UND BICARBONATFREIEN LÖSUNG	17
TABELLE 8: INDIVIDUELLES KONZENTRATIONSSHEMA DER TESTSUBSTANZEN.....	22
TABELLE 9: ZUSAMMENSETZUNG DER LÖSUNGEN FÜR DIE ENZYMATISCHE VERDAUUNG	23
TABELLE 10: VERTEILUNG DER ZELLKERNE IN ZENTRUM UND PERIPHERIE DER ZELLKULTUR	61
TABELLE 11: ERWARTETE EFFEKTE EINER HEMMUNG AUSGEWÄHLTER IONENKANÄLE AUF DIE SPONTANAKTIVITÄT DER GLATTMUSKULÄREN PRÄPARATE	71
TABELLE 12: BEOBACHTETE KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DER EFFEKTE VON SPERMIN VERGLICHEN MIT BEKANNTEN EFFEKTEN AUF EINZELNE IONENKANÄLE.....	73
TABELLE 13: BEOBACHTETE KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DER EFFEKTE VON LANTHAN VERGLICHEN MIT BEKANNTEN EFFEKTEN AUF EINZELNE IONENKANÄLE.....	75
TABELLE 14: BEOBACHTETE KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DER EFFEKTE VON FLUFENAMINSÄURE VERGLICHEN MIT BEKANNTEN EFFEKTEN AUF EINZELNE IONENKANÄLE.	77
TABELLE 15: BEOBACHTETE KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DER EFFEKTE VON CHINIDIN VERGLICHEN MIT BEKANNTEN EFFEKTEN AUF EINZELNE IONENKANÄLE.....	78
TABELLE 16: VERGLEICH DER VERWENDETEN GEWEBE	83

I. EINLEITUNG

Glatte Muskulatur lässt sich in verschiedenen Organen wie den Gefäßen, dem Gastrointestinaltrakt oder dem Urogenitaltrakt finden. Sie erfüllt grundlegende Funktionen des Körpers, hierzu gehören z.B. die Regulation des Blutdruckes oder die Motilität des Gastrointestinaltraktes. Die Fähigkeit zur geregelten Kontraktion und Relaxation ist dabei essenziell für die Ausübung dieser Funktionen.

Die glatte Muskulatur ermöglicht verschiedene Formen der Kontraktion. Man differenziert im Wesentlichen zwischen tonischen und phasisch-rhythmischen Kontraktionen. Tonische Kontraktionen sind langanhaltende Kontraktionen wie sie für den Verschluss eines Sphinkters oder für die Aufrechterhaltung eines Flusswiderstandes notwendig sind. Beispielhaft befinden sie sich im unteren Ösophagus sphinkter (lower esophageal sphincter, LES) oder dem Sphinkter Oddi [1, 2]. Phasisch-rhythmische Kontraktionen erzeugen fließende Propulsionen, die sich sowohl in Ureter und Lymphgefäßen [3, 4] als auch in Gastrointestinaltrakt, Portalvene und Uterus [5–7] finden lassen. Eine Besonderheit ist, dass diese phasisch-rhythmische Aktivität des glatten Muskels auch unabhängig von neuralen Einflüssen existiert, der glatte Muskel in diesem Fall also spontanaktiv ist [8].

Dieses Phänomen der spontanen phasisch-rhythmischen Kontraktionen im glatten Muskel ist schon lange bekannt, aber der fundamentale Mechanismus dieser Aktivität ist bis heute nicht vollständig geklärt. Ein genaues Verständnis dieser biologischen Prozesse hat außerordentliche klinische Relevanz. Denn Störungen innerhalb dieser Kontraktionsmechanismen ziehen entsprechend ihrer lebenswichtigen Organfunktionen krankhafte Veränderungen als Folge nach sich. Insbesondere Motilitätsstörungen des Gastrointestinaltrakts wie Gastroparesen, chronische Obstipation und das Reizdarmsyndrom (irritable bowel syndrome, IBS) sind in der Bevölkerung weit verbreitet [9], aber auch Störungen der Spontanaktivität anderer Organe können zu schweren Funktionsstörungen im menschlichen Organismus führen (z.B. portale Hypertension, überaktive Blase u.v.m.) [10, 11]. Zur kausalen Therapie dieser unterschiedlichen Krankheitsbilder ist ein genaues Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen eine wichtige Voraussetzung, denn mögliche Angriffspunkte stellen in diesem Schrittmacherprozess involvierte Rezeptoren und Ionenkanäle dar [12].

Es gibt bereits zahlreiche Untersuchungen bezüglich der in den Schrittmacherprozess eingebundenen Ionenkanäle, allerdings weisen die bislang existierenden Konzepte noch beachtliche Lücken auf. In diesem Rahmen hat die vorliegende Arbeit den Anspruch, ein aktuelles

Konzept zum TRPM7-Kanal – Mitglied einer noch jungen Familie von Ionenkanälen – als zentrales Element des Pacemaking im glatten Muskel [13-15] genauer zu untersuchen und kritisch zu reflektieren.

Im Folgenden werden zunächst die gesicherten physiologischen Erkenntnisse zur Spontanaktivität im glatten Muskel erläutert und ein Überblick zu den wichtigsten derzeit bekannten Ionenkanälen im Schrittmacherprozess gegeben. Anschließend folgt eine Darstellung des existierenden Konzepts des TRPM7-Kanals im Pacemaking und dessen pharmakologischer Beeinflussbarkeit. Schließlich wird der zur Bearbeitung der Fragestellung gewählte Forschungsansatz vorgestellt und näher erläutert.

1.1 SPONTANAKTIVITÄT DES GLATTEN MUSKELS

Die spontanen Kontraktionen sind unmittelbar nach Präparation und Entnahme verschiedener glattmuskulärer Organe und deren Überführung in eine kalziumhaltige physiologische Lösung mit bloßem Auge direkt sichtbar. Diese sichtbare mechanische Spontanaktivität resultiert aus der elektrischen Spontanaktivität im glatten Muskel, die durch intra- oder extrazelluläre Potentialmessungen aufgezeichnet werden kann. Diese zeigen die sogenannten Slow Waves. Sie sind definiert als spontane Fluktuationen des Membranpotenzials der glatten Muskelzellen. Die Slow Waves bestehen aus einer schnellen aufsteigenden Phase, einem Plateau und der darauffolgenden Repolarisation [16]. Kommt es zu einer Aktivierung der ICC, z.B. durch exzitatorische Neurotransmitter wie Acetylcholin (ACh), erreichen diese spontanen Fluktuationen das Schwellenpotential der Myozyten. Es treten sog. Spikes auf, die sich in die Plateau Phase der Slow Waves einlagern. Diese führen zu einer weiteren Depolarisation der Zellmembran und Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle, die den für die Kontraktion nötigen Kalziumeinstrom liefern [17].

Lange Zeit wurde der Ursprung der Spontanaktivität des glatten Muskels kontrovers diskutiert und man ging davon aus, dass diese den glatten Muskelzellen (SMC) selbst entspringt, ihr Ursprung also "myogen" ist [5]. Erst umfangreiche Studien in den 80er Jahren ergaben, dass die Aktivität von interstitiellen Zellen (Interstitial Cells of Cajal, ICC) ausgeht [20]. Einen Überblick über zahlreiche weitere Untersuchungen zur Rolle der ICC geben *Sanders et al.* [21]. Die Expression des Protoonkogens c-Kit (kodierend für den Tyrosinkinase-rezeptor Kit) auf den ICC konnte durch den Einsatz von speziellen Antikörpern gegen c-Kit für die Identifizierung der ICC genutzt werden [22]. So konnten unterschiedliche ICC-Typen in den Schichten des glatten Muskels klassifiziert werden, wie z.B. intramuskuläre, mucosale oder myenterische

ICC. Cajalzellen lassen sich nicht nur im Gastrointestinaltrakt finden, sondern konnten bisweilen auch in Portalvene, Myometrium und Blase nachgewiesen werden [7-9].

Die in den ICCs gemessenen unter-schweligen Slow Waves werden innerhalb dieser Arbeit als Schrittmacherpotenziale (Pacemaker Potential, PP) bezeichnet. Im Gegensatz zu den im vorangegangenen beschriebenen überschwelligen Slow Waves in der SMC enthalten sie keine scharfen Spikes, da ICCs nicht in der Lage sind, Aktionspotenziale auszubilden [23].

1.2 SMC UND ICC - EIN NETZWERK

Bereits Cajal entdeckte 1889 die unmittelbare Nähe von ICC, Nervenendigungen und glatter Muskulatur [24], was die Annahme einer Interaktion dieser unterschiedlichen Zelltypen nahe legte.

Aufgrund der eingangs beschriebenen elektrischen Aktivität der ICC und SMC wird deutlich, dass für das Resultat der spontanaktiven glattmuskulären Kontraktion der Gewebepräparate eine Interaktion der einzelnen Zellen untereinander unabdingbar ist. Während ICCs zwar spontane Oszillationen des Membranpotenzials generieren, aber nicht in der Lage sind zu kontrahieren, können SMC zwar eine Kontraktion ausüben, allerdings nur wenn sie aktiv von anderen Zellen depolarisiert werden. Ferner reicht auch die Kontraktion einer Muskelzelle nicht aus, um eine sichtbare und wirksame Kontraktion auszulösen, sondern es bedarf einer synchronen Kontraktion mehrerer SMC.

Aus diesen Voraussetzungen, um eine geregelte spontane glattmuskuläre Kontraktion des makroskopischen Gewebepräparates zu generieren, ergeben sich drei Ebenen der Kopplung:

- Ebene 1: Kopplung der ICC untereinander durch GJ. Passiv elektrotonischer Transfer, wird von ICC zu ICC schwächer.
- Ebene 2: Kopplung zwischen ICC und SMC durch GJ. Passiv elektrotonischer Transfer. Depolarisation öffnet in SMC spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle. Sekundär auch Kopplung von SMC auf ICC, Spike-initiiertes interzelluläres elektrotonisches Transfer. Auf dieser Ebene kommt es zu einer Verstärkung bzw. Regeneration des Signals durch die Kalziumströme, welche der passiven Abschwächung entgegenwirkt.
- Ebene 3: Weiterleitung an benachbarte SMC durch GJ. Durch diese Kopplung untereinander kann es zu einer synchronisierten Kontraktion der SMC kommen. Die Reichweite ist vor allem abhängig von dem elektrischen Kopplungswiderstand im Gewebe und der Größe der Kalziumströme.

Durch diese komplexe Kopplung der Zellen bildet sich ein Netzwerk aus, im Sinne eines elektrischen Synzytiums, um synchronisierte Impulse an die glatten Muskelzellen (SMC) fortzuleiten [25]. Zu diesem Zweck sind die ICCs mit den benachbarten Muskelzellen der zirkulären und der longitudinalen Muskelschicht ebenfalls durch GJs verbunden [26, 27].

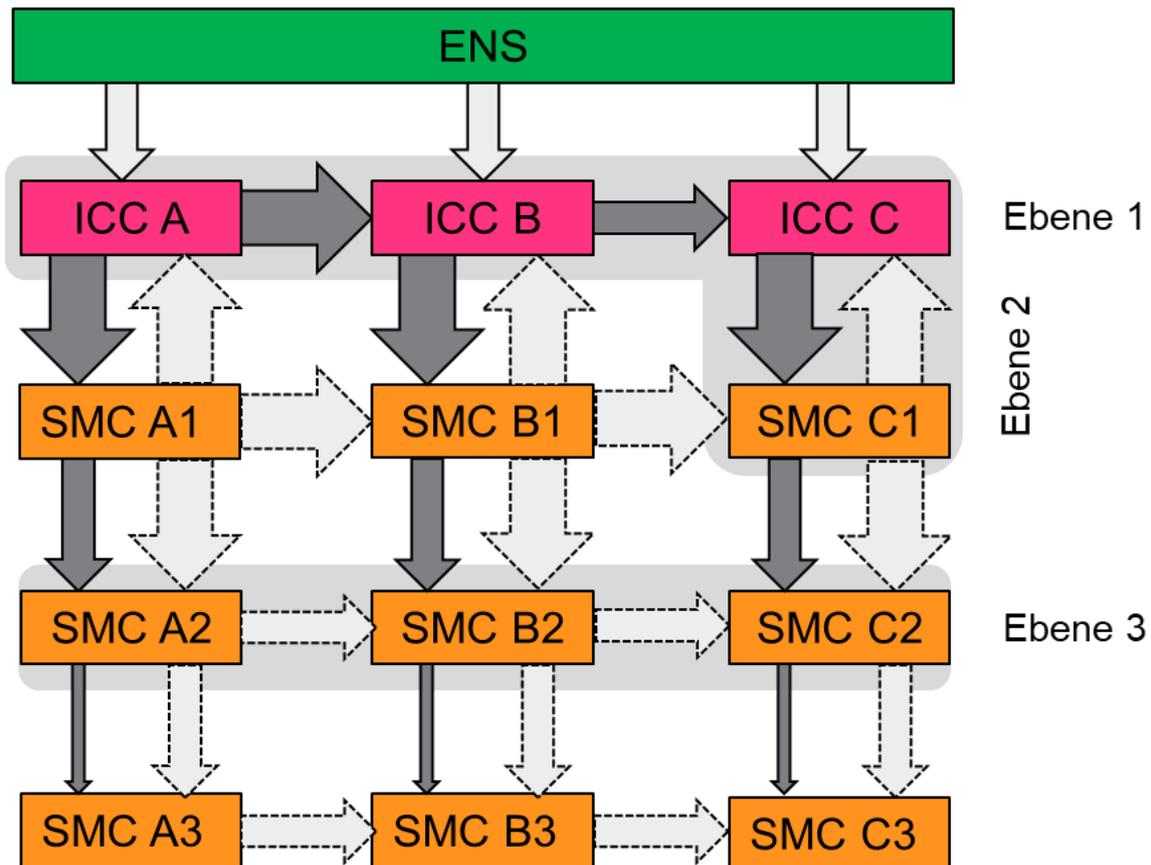


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kopplung von ICC und SMC

Die ICC (im Bild "ICC A") generieren elektrische Oszillationen, die durch Kopplung passiv an benachbarte ICC ("ICC B", "ICC C") und SMC ("SMC A1") weitergeleitet werden. Die Längskonstante definiert, wie weit eine Erregung elektrotonisch weitergeleitet werden kann. Auch die SMC bilden unter sich ein Netzwerk aus, was Grundlage für die synchronisierte Kontraktion ist (SMC A1-SMC A2 etc.). Im Falle einer überschweligen Erregung der SMC generieren diese Kalziumströme, welche die Ausbreitung der Erregung im Gewebe verstärken. Die Pfeile beschreiben die Weiterleitung der durch ICC und SMC erzeugten erregenden Ströme durch GJ. Die Farbintensität der Pfeile stellt die Stärke der Signalkopplung dar. Mit Zunahme der Distanz kommt es zu einer Dämpfung der Amplitude und schließlich zum Sistieren der Ausbreitung. Modulierend auf die Aktivität dieses Netzwerkes wirkt das ENS. So kann die Kontraktion entsprechend an die physiologischen Situationen angepasst werden.

Um die glattmuskulären Kontraktionen den entsprechenden physiologischen Gegebenheiten anzupassen, werden die ICC durch das enterische Nervensystem (ENS) entsprechend moduliert. Kommt es beispielsweise zur Nahrungsaufnahme, muss der Gastrointestinaltrakt stärker arbeiten und es kommt zu einer Erhöhung der Spontanaktivität.

Die Ausbreitungsdistanz ist abhängig von der Längskonstante der einzelnen Zellen. Es kommt zu einem exponentiellen Abfall der Potenzialamplitude. Je höher die Längskonstante, desto besser die Kopplung der Zellen untereinander [28, 29].

1.3 SPONTANAKTIVITÄT IN UNTERSCHIEDLICHEN ORGANEN

Die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebene Spontanaktivität findet sich in verschiedenen glattmuskulären Organen. Die in dieser Arbeit untersuchten Organe Antrum, Colon, Uterus und Portalvene bilden eine stabile Spontanaktivität aus und dienen daher als geeignete Präparate, um den Ursprung dieser Aktivität zu untersuchen. Entsprechend ihrer unterschiedlichen Funktionen im menschlichen Organismus zeigen diese Organe aber auch unterschiedliche Eigenschaften ihrer Aktivität, deren Kenntnis für die spätere Einordnung der Ergebnisse von außerordentlicher Relevanz ist.

Ein erster Unterschied der untersuchten Organe ist ihre Kontraktionsfrequenz. Während Antrum und Portalvene mit einer Frequenz von 3-5/min kontrahieren, finden bei Colon und Uterus nur 1-2 Kontraktionen pro Minute statt. Weitere Unterschiede spiegeln sich in der Kraftentwicklung der Organpräparate wider. Antrum und Portalvene haben eine durchschnittliche Kontraktionsamplitude von 3-5 mN, während das Colon 10 mN und der Uterus bis zu 40mN erreicht.

Auch der Basaltonus unterscheidet sich innerhalb der Organe. Insbesondere der Uterus hat einen sehr hohen Basaltonus, während der Basaltonus der Portalvene nur sehr gering ausgeprägt ist.

Eine sehr wichtige Größe für die Kopplung der Zellen untereinander stellt die Längskonstante dar. Die Portalvene hat eine kleine Längskonstante, d.h. das elektrische Signal wird nur begrenzt weitergeleitet. Der Uterus hingegen zeigt sich gut gekoppelt bei hoher Längskonstante [28, 29].

Diese unterschiedlichen Eigenschaften der Organe führen zu Unterschieden in der Sensitivität der Organe hinsichtlich ihrer pharmakologischen Beeinflussung.

1.4 THEORIEN ZUM PACEMAKING

Nachdem ein grober Überblick über die in die Spontanaktivität involvierten Zellen, die Koppung der Zellen untereinander und die Unterschiede der Spontanaktivität in den Geweben gegeben wurde, sollen im Folgenden die wichtigsten Theorien zum Ursprung dieser Aktivität dargestellt werden. Bisher existieren zahlreiche Konzepte zu den Grundlagen des Pacemaking im glatten Muskel. Einige Erkenntnisse zum Schrittmacherprozess im glatten Muskel können durch frühere Arbeiten auf dem Gebiet der ICC als etabliert angesehen werden [30]. Aber noch immer gibt es Kontroversen über die Leitfähigkeit, die für die UPs verantwortlich ist.

Im Folgenden werden die wichtigsten Theorien umrissen, die das fundamentale Schrittmacherereignis der ICC erklären sollen [31].

DIE NSCC-PACEMAKING-HYPOTHESE

Pharmakologische und ultrastrukturelle Experimentalstudien an ICCs haben über die vergangenen 20 Jahre zu der Entstehung einer Schrittmacher-Hypothese geführt [30-32].

Entsprechend ihres Verfassers wird sie auch als *Sanders-Hypothese* bezeichnet. Grundlegend dafür war die Entdeckung eines durch Ca^{2+} -gehemmten nicht-selektiven Kationenstroms (NSC) in kultivierten murinen intestinalen ICCs [33]. In dieser Hypothese gehen *Sanders et al.* von kleinen Einheiten innerhalb der Schrittmacherzellen aus, die als Pacemaker Unit (PMU) bezeichnet werden. Ein in den PMUs stattfindender Prozess des intrazellulären Ca^{2+} -Handling soll ein fundamentales Ereignis für die Generierung der spontanen Schrittmacherströme sein. Initiiert wird dieser Schrittmacherzyklus durch eine Ca^{2+} -Freisetzung aus den Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor- (IP₃-Rezeptor-) getriggerten Stores des endoplasmatischen Retikulums (ER). Diese moderate Erhöhung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration aktiviert wiederum den Ca^{2+} -Transporter des Mitochondriums. Bedingt dadurch findet ein starker Abfall der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in der zytoplasmatischen Mikrodomäne der PMUs statt, der durch die Disinhibition der Ca^{2+} -inhibierten nicht selektiven Kationenkanäle zu einem Einwärtsstrom führt. Somit wird ein UP generiert [30].

Ca^{2+} -AKTIVIERTE KANÄLE

Im Gegensatz zu den ursprünglichen Annahmen von *Sanders et al.* konnte allerdings in einigen anderen Untersuchungen gezeigt werden, dass der Schrittmacherstrom nicht auf eine

durch Ca^{2+} -inhibierte Leitfähigkeit zurückzuführen ist, sondern von einer Ca^{2+} -aktivierten Leitfähigkeit getragen wird [34, 35].

Dabei gaben folgende Untersuchungen Hinweise auf einen Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Strom, der als maßgebliches Ereignis im Schrittmacherprozess diskutiert wird:

- spontane rhythmische Cl^- -Ströme in isolierten ICCs oszillieren mit der gleichen Frequenz wie die rhythmischen Depolarisationen im Rahmen der Schrittmacheraktivität [25].
- die registrierten Cl^- -Ströme sind abhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, da eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur Aktivierung dieser Kanäle führt (Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle) [27].
- ANO1 ist ein Transmembranprotein und fungiert als Ca^{2+} -aktivierter Cl^- -Kanal [36]. ANO1 findet sich in hoher Dichte in ICCs in allen Regionen des murinen und humanen Gastrointestinaltrakts [28].
- ein knock-out des murinen ANO1 führt zu einem Verlust der PP in ICCs [29].
- pharmakologische Blockade des Cl^- -Kanals führt zu einem Verlust der PP [27, 28, 30].

Doch neben diesen Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanälen existieren auch NSC-Kanäle, die durch eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration aktiviert werden und für die Schrittmacherströme verantwortlich sein könnten [37, 38].

1.5 TRPM7 UND PACEMAKING

Ein anderer Ionenkanal, dem neuere Untersuchungen eine unabdingbare Rolle im Schrittmacherprozess zuschreiben, ist der TRPM7-Kanal (auch TRP-PLIK). Als Teil der sehr heterogenen TRP-Kanal Familie ("transient receptor potential") gehört dieser Kanal zu einer noch nicht lange molekular identifizierten Gruppe von Ionenkanälen [15]. Das Protein wird in allen Organen und Geweben des Körpers exprimiert und nimmt dort lebenswichtige Funktionen ein, wie die frühe Embryonalsterblichkeit von "TRPM7-knock out Tieren" beweist [39]. Eine Besonderheit dieses Proteins ist seine Bifunktionalität als Ionenkanal und Kinase. Unter physiologischen Bedingungen leitet dieser hauptsächlich Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen. Experimentelle Studien haben aber gezeigt, dass er auch für Zn^{2+} -, Mn^{2+} - und Co^{2+} -Ionen permeabel ist. In Abwesenheit von divalenten Ionen leitet der Kanal auch monovalente Kationen wie Na^+ , Cs^+ , Li^+ [40–42]. Reguliert wird der Kanal durch die intrazelluläre Mg^{2+} - und Mg-ATP -Konzentrationen [43], wobei der genaue Regulationsprozess bislang nicht ausreichend erforscht ist. Zu seinen Aufgaben im

menschlichen Organismus zählen die Mg^{2+} - Homöostase und unterschiedlichste Zellfunktionen wie Wachstum, Proliferation, Differenzierung und Tod [44].

Erste Hinweise, dass der TRPM7-Kanal eine Rolle in der Funktion des glatten Muskels des Gastrointestinaltrakts spielen könnte, ergaben Versuche in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), wo NSC-Kanäle in den physiologischen ultradianen Defäkationsrhythmus involviert waren [45]. Die in *C. elegans* gefundenen Kationenkanäle weisen eine hohe Sequenzhomologie mit drei Mitgliedern der TRPM-Familie auf – unter anderem auch mit TRPM7 [46].

Weitere Daten, die einen engen Zusammenhang des TRPM7-Kanals und dem Pacemaking vermuten lassen, erbrachte die Arbeitsgruppe von BJ Kim (*Kim BJ et al.* 2005). Arbeiten aus dieser Gruppe berichteten, dass der TRPM7-Kanal nur in den ICCs und nicht in murinen und humanen Myozyten exprimiert wird. Eine pharmakologische Hemmung des TRPM7-Kanals verminderte die Frequenz der spontan auftretenden Einwärtsströme der kultivierten intestinalen murinen und humanen ICCs. Ein TRPM7 knock-down mittels RNA-Interferenz untermauerte den wichtigen Stellenwert des Kanals im Prozess der rhythmischen Depolarisationen der ICC, da der Verlust des TRPM7 Proteins zu einem Sistieren der elektrischen Aktivität führte [13, 14].

Zwar postulierte diese Gruppe auf Grundlage ihrer Untersuchungen an kultivierten ICC-Clustern, dass dieser Ionenkanal eine unabdingbare Position im Pacemaking einnimmt, sie ließ dabei aber völlig offen, an welcher Stelle des Schrittmacherprozesses der Kanal letztlich von Bedeutung sein könnte. Hierdurch wurde die Überprüfung der Hypothese erschwert. Basierend auf den bekannten Eigenschaften des Kanals diskutierte *Patejdl et al.* eine theoretische Möglichkeit der Einbindung von TRPM7 in die Verstärkung der elektrischen Oszillationen der ICC [47]:

Der nicht näher definierte primäre Oszillationsprozess in den ICCs führt zu einer erhöhten Leitfähigkeit des TRPM7-Kanals. Diese wiederum führt in folgenden drei Schritten zu einem Verstärkungsprozess:

1. Einstrom divalenter Kationen (Mg^{2+} und Ca^{2+}) in die Zelle mit daraus resultierendem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration;
2. Dadurch erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ bedingte Aktivierung von Cl^- -Kanälen, die einen stark depolarisierenden Strom tragen.

3. Durch den Mg^{2+} -Einstrom parallel zum Ca^{2+} -Einstrom kommt es zu einem negativen Feedback, sodass die ansteigende intrazelluläre Mg^{2+} -Konzentration den Kationeneinstrom über den TRPM7-Kanal wieder beendet.

Diese Ereignisserie könnte so schließlich zum bekannten Schrittmacherpotenzial der ICCs führen, welches durch stetige De- und Repolarisationen charakterisiert ist.

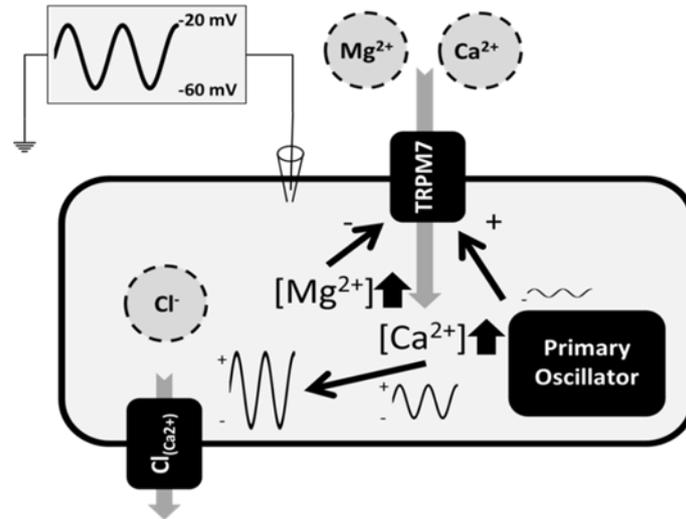


Abbildung 2: Hypothetisches Modell zur Integration des TRPM7-Kanals in den Prozess des Pacemaking der ICCs im glatten Muskel [2]

Die Abbildung zeigt eine ICC. Ein noch unbekannter Oszillationsprozess führt zu einem Anstieg der TRPM7-Leitfähigkeit. Dies führt im Gegenzug zu einer Verstärkung des primären Oszillationprozesses. Zunächst kommt es zu einem Einstrom divalenter Kationen (Mg^{2+} und Ca^{2+}). Der daraus resultierende Anstieg des zytosolischen $[Ca^{2+}]$ aktiviert einen Chlorid Kanal und vielleicht zusätzlich ein nicht-TRPM7 Ca^{2+} abhängiger nicht-spezifischer Kationenkanal tragen zusammen einen strak depolarisierenden Strom. Der Anstieg des $[Mg^{2+}]$ limitiert den Einstrom durch den TRPM7-Kanal. Diese Ereignisse führen so zu der bekannten PPs.

Molekulare Mechanismen dieses Schrittmacherzirkels vermag diese Arbeit aufgrund ihres begrenzten Umfangs nicht zu behandeln, vielmehr soll der Focus auf dem Stellenwert des TRPM7-Kanals in der mechanischen Spontanaktivität der glattmuskulären Gewebe liegen.

1.6 PHARMAKOLOGISCHE MODULATION DES TRPM7-KANALS

Zum Studium der Funktion von Ionenkanälen ist eine Hemmung dieser durch unterschiedliche Substanzen obligat. Obwohl bislang noch keine spezifischen Blocker des TRPM7-Kanals bekannt sind, gibt es einige Substanzen, für die in unterschiedlichen Zellmodellen eine Reduktion des TRPM7-Stroms nachgewiesen werden konnte. Aufgrund ihrer Relevanz für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sollen sie hier näher betrachtet werden.

SPERMIN

Spermin ($C_{10}H_{26}N_4$) ist ein endogenes Polyamin und nimmt in fast allen Zellen wichtige Funktionen in der Proteinsynthese, Zellteilung und im Zellwachstum ein [48]. Über die Biosynthese und den Abbau der Polyamine und die molekularen Eigenschaften der in diese Prozesse involvierten Enzyme ist einiges bekannt. Ein Überblick findet sich in einigen Reviews [49-51].

Bei physiologischem pH finden sich Polyamine in ihrer protonierten Form und sind somit in der Lage mit einer Vielzahl zellulärer Strukturen, einschließlich Nukleinsäuren und Proteinen, zu interagieren. Aufgrund dieser Eigenschaft können Polyamine – insbesondere Spermin – mit zahlreichen Ionenkanälen interagieren. Diese Interaktionen beinhalten z.B. den Block einiger K^+ -Kanäle. Beispielsweise ist Spermin essenziell, um die Einwärtsgleichrichtung des kardialen K^+ -Kanals (inward-rectifier potassium ion channel, $K_{ir}2.1$) aufrecht zu erhalten. Bei einem Membranpotenzial, welches positiver ist als das Gleichgewichtspotenzial der Zelle, verschließt das intrazelluläre Spermin die zytosolische Seite des $K_{ir}2.1$, sodass K^+ Ionen die Pore nicht passieren können [52, 53].

Auch für den TRPM7-Kanal ist eine Blockade durch polyvalente Kationen wie Spermin beschrieben. Der Block ist spannungsabhängig mit größerer Blockade des Einwärtsstroms bei moderat negativem Potenzial. Dieses trägt dazu bei, die polyvalenten Kationen in die externe Pore zu bewegen. So wird der Strom durch den TRPM7-Kanal im Sinne eines "permeant block" unterbunden [54].

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die Konzentrationen, die den TRPM7-Kanal in unterschiedlichen Zelllinien hemmen. Die Hemmung gibt an, wie stark der Strom gegenüber Kontrollbedingungen reduziert wird; 100 % = vollständige Hemmung.

Tabelle 1: Hemmung des TRPM7-Kanals durch Spermin

Modell	Konzentration [μM]	Hemmung [%]	Methode	extrazelluläre Ionenverhältnisse	Referenz
CHO-K1	10	50	whole cell Patch Clamp	DFS	[54]
kultivierte humane Colonzellen	6	50	whole cell Patch Clamp	Hepes-Puffer	[14]
MCF-7 (Breast Cancer Cells)	500	40	whole cell Patch Clamp	DFS	[55]
kultivierte Mikrogliazellen der Ratte	100	94	whole cell Patch Clamp	DFS	[56]
<small>CHO-K1: Chinese Hamster Ovary-K1, MCF-7: Michigan Cancer Foundation-7 DFS: Divalent Free Solution</small>					

LANTHAN

Lanthan (La^{3+}) ist ein chemisches Element und findet sich in der III. Nebengruppe des Periodensystems mit der Ordnungszahl 56. La^{3+} wurde bereits verwendet, um TRP-Kanäle an Photorezeptoren der Fliege zu inhibieren, bevor gezeigt werden konnte, dass seine Funktionsweise in einer Blockade des Ionenstroms durch Kanäle der Plasmamembran besteht [57]. Später konnte gezeigt werden, dass La^{3+} Ionen TRP-Kanäle effektiv blockieren. In den folgenden Jahren konnte für fast alle identifizierten TRP-Kanäle eine Blockade durch Lanthanoide beschrieben werden. La^{3+} kann passiv in das Zytosol verschiedener Zellen gelangen und so einen stärkeren Effekt ausüben als durch extrazelluläre Applikation. Intrazellulär binden die Lanthanoide an negativ geladene Verbindungen und agieren eher als Komplexe und weniger als freie Ionen [58].

Konzentrationen, die den TRPM7-Kanal blockieren, sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Hemmung des TRPM7-Kanals durch Lanthan

Modell	Konzentration [μM]	Hemmung [%]	Methode	Extrazelluläre Ionenverhältnisse	Referenz
humane Colonzellen	50	85	Intrazelluläre elektrische Ableitung	Hepespuffer	[13]
HEK-293	10	100	Whole cell patch clamp	Hepespuffer	[40]
MCF-7	2	30	Whole cell patch clamp	DFS	[55]
kultivierte Mikrogliazellen der Ratte	1000-2000	50	Whole cell patch clamp	Lösung mit niedriger Cl^- Konzentration	[56]
humane atriale Myoyten	37	50	Whole cell patch clamp	Mg^{2+} -und K^+ -freie Lösung	[60]

CHO-K1: Chinese Hamster Ovary-K1, HEK-293: Human Embrionic Kidney-293, MCF-7: Michigan Cancer Foundation, DFS: Divalent Free Solution

FLUFENAMINSÄURE

Flufenaminsäure (FFA) ist bekannt als Blocker der Cyclooxygenase (COX) und damit einhergehender Hemmung der Prostaglandinsynthese [61]. Daher wurde es einst innerhalb der Schmerztherapie eingesetzt. Ferner hemmt es konzentrationsabhängig zahlreiche Ionenkanäle, darunter Chlorid- und Kalziumkanäle. Heute findet es in der Pharmakotherapie keinen Einsatz mehr und das nicht zuletzt wegen zahlreicher Nebenwirkungen wie Störungen der Funktion des Gastrointestinaltrakts [62].

Auch elektrophysiologische Untersuchungen an ICCs der Maus zeigten, dass FFA die Motilität des Gastrointestinaltrakts durch die Reduktion des Schrittmacherpotenzials beeinflusst [63, 64].

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Konzentrationen, die den TRPM7-Kanal in unterschiedlichen Kulturmodellen hemmen.

Tabelle 3: Hemmung des TRPM7-Kanals durch Flufenaminsäure

Modell	Konzentration [μM]	Hemmung [%]	Methode	extrazelluläre Ionenverhältnisse	Referenz
renale Tubuluszellen der Maus	500	95	Inside-out Patch	Hepespuffer	[65]
kultivierte humane Colonzellen	50	100	Whole cell Patch clamp	Hepespuffer	[14]
MCF-7	100	40	Whole cell patch clamp	DFS	[55]
kultivierte Mikrogliazellen der Ratte	100	50	Whole cell patch clamp	Lösung mit niedriger Cl-Konzentration	[56]

MCF-7: Michigan Cancer Foundation-7, DFS: Divalent Free Solution

CHINIDIN

Chinidin ($\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$) zählt zur Klasse der Antiarrhythmika nach *Vaughan Williams* und wurde lange Zeit zur Therapie ventrikuläre Tachykardien, Vorhofflimmern, Short-QT-Syndrom sowie des Brugada Syndroms eingesetzt, da es neben Na^+ - auch K^+ -Kanälen, insbesondere die den kardialen transienten Auswärtsstrom I_{to} tragenden Kanäle hemmt [66].

Neben seinem Effekt auf die K^+ -Kanäle konnte auch ein hemmender Effekt auf den TRPM7-Kanal beschrieben werden.

Tabelle. 4 gibt eine Übersicht über die Hemmung des TRPM7-Kanals durch Chinidin.

Tabelle 4: Hemmung des TRPM7-Kanals durch Chinidin

Modell	Konzentration [μM]	Hemmung [%]	Methode	extrazelluläre Ionenverhältnisse	Referenz
kultivierte humane Colonzellen	1000	100	Whole cell patch clamp	Hepespuffer	[14]
kultivierte Mikrogliazellen der Ratte	1000	30	Whole cell patch clamp	Lösung mit niedriger Cl-Konzentration	[56]

1.7 FRAGESTELLUNG UND METHODISCHER ANSATZ

Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht die Frage, welchen Stellenwert der TRPM7-Kanal im Schrittmacherprozess des glatten Muskels einnimmt.

Die Forschungsgruppe *Kim BJ et al.* stellte auf Grundlage ihrer Untersuchungen den TRPM7-Kanal als zentrale Leitfähigkeit im Schrittmacherprozess der ICC im glatten Muskel des Gastrointestinaltrakts dar. Diese Arbeiten ließen allerdings einige Fragen, wie die bereits angesprochene Funktion innerhalb des Schrittmacherprozesses, offen. Der TRPM7-Kanal könnte seine Funktion als fundamentaler Schrittmacher ausüben, nur an einer Verstärkung des Schrittmacherstroms beteiligt sein oder gar seine bereits postulierte Funktion in der Mg^{2+} -Homöostase einnehmen, die für den Schrittmacherkreislauf von Bedeutung sein könnte.

Die bislang bekannten Arbeiten, die den TRPM7-Kanal mit der Spontanaktivität des glatten Muskels in Verbindung bringen, belegen nur den Einfluss des TRPM7-Kanals auf die Schrittmacherströme und das überwiegend an spontanaktiver Zellkultur [12, 41]. Daher soll sich diese Arbeit schwerpunktmäßig mit dem Einfluss des TRPM7-Kanals auf die mechanische Spontanaktivität des glatten Muskels befassen.

Eine Besonderheit dieser Arbeit ist, dass sie sich nicht nur mit der Spontanaktivität eines einzelnen glattmuskulären Gewebes beschäftigt, sondern dass unterschiedliche Gewebe innerhalb und außerhalb des Gastrointestinaltrakts untersucht wurden. Diese Besonderheit ist dadurch zu begründen, dass Störungen der Spontanaktivität in nahezu allen glattmuskulären Organen von hoher klinischer Relevanz sind und die einzelnen Organgewebe deutliche Unterschiede in ihrem Kontraktionsverhalten zeigen, wie z.B. unterschiedliche Kontraktionsfrequenzen, unterschiedliche Zellkopplung etc. Die Kenntnis der in den Schrittmacherprozess involvierten Ionenkanäle ist für neue therapeutische Ziele insbesondere durch die Modulation von in den Schrittmacherprozess involvierten Ionenkanäle zur Behandlung dieser Krankheitsbilder in allen Organen gleichermaßen wichtig [67].

Um die Auswirkung der Testsubstanzen auf die mechanische Spontanaktivität glattmuskulärer Organe zu studieren, wurde die Methode des Organbades gewählt. Anhand dieser Experimente ist es möglich, Änderungen der Spontanaktivität unter Einfluss der Testsubstanzen hinsichtlich Frequenz, Amplitude und Kontraktilität zu charakterisieren und daraus folgende Aussagen abzuleiten:

- Frequenzminderung der spontanen Kontraktionen:

Eine bloße Verlangsamung des Schrittmacherstroms würde zu einer Reduktion der Kontraktionsfrequenz führen, eine Amplitude der Dämpfung der Schrittmacherströme hingegen durch beeinträchtigte Rekrutierung benachbarter Gewebe auch zu einer Reduktion der Amplitude. Wenn die Inhibition einen kritischen Punkt erreicht, würde es unweigerlich zu einem kompletten Wegfall der spontanen Kontraktionen kommen, d.h. auf Ebene der ICCs. Oder: "unechte" Frequenzreduktion durch Störung im Amplifizierungsprozess, Wegfall einzelner Kontraktionen.

- Amplitudenminderung der spontanen Kontraktionen:
Entweder Dämpfung des Schrittmachers oder Störung im Amplifizierungsprozess, Entweder auf Ebene der Connexine oder auf Ebene der SMC.
- Kontraktilitätsminderung:
Wird die durch hohe $[K^+]$ hervorgerufene Kontraktion gehemmt, so zeigt dies, dass nicht nur der Schrittmacherprozess oder seine Fortpflanzung beeinträchtigt ist, sondern die Transformation von der Membranpotentialdepolarisation der glatten Muskelzellen zur Krafterzeugung. Denn die hohe $[K^+]$ - vermittelte Depolarisierung des Membranpotentials sollte ausreichend sein, um spannungsabhängige Calciumkanäle vom L-Typ zu aktivieren.

Um die im Organbad beobachteten Substanzeffekte besser einordnen zu können, wurde zusätzlich die Methode des Ca^{2+} Imaging an Primärkulturen isolierter ICCs gewählt. Diese Methode bildete die Spontanaktivität der Zellen unabhängig vom sonst als Read-Out genutzten Kontraktionsprozess ab. Hierdurch sollte ausgeschlossen werden, dass Substanzeffekte, die eigentlich nur die Kraftentwicklung betreffen, fälschlicherweise als Effekte auf den Erregungsprozess interpretiert werden.

Folgende konkrete Fragestellungen werden in der vorliegenden Arbeit untersucht:

1. Hat die pharmakologische Hemmung des TRPM7-Kanals spezifische Auswirkungen auf die mechanische Spontanaktivität?
2. Spielt der TRPM7-Kanal auch in den Geweben außerhalb des Gastrointestinaltrakts eine Rolle für die Spontanaktivität?
3. Zeigt eine Modulation des TRPM7-Kanals auch Effekte auf die intrazellulären Ca^{2+} -Oszillationen in spontanaktiver Zellkultur?

II. MATERIAL UND METHODEN

Verschiedene experimentelle Methoden dienten zur Ergebnisfindung, Darstellung und Diskussion bei der Bearbeitung der vorstehenden Fragestellungen. Diese Methoden erfahren im nachfolgenden Abschnitt eine separate Erläuterung.

2.1 MESSUNG DER SPONTANEN AKTIVITÄT IM ORGANBAD

Um die spontanen Kontraktionen nativer Gewebepreparate der glatten Muskulatur zu quantifizieren, wurde die Methode des Organbades ausgewählt. Bereits im Jahr 1904 zeigte *Magnus*, dass ein herauspräparierter Darmstreifen seine rhythmischen Kontraktionen in temperierter Ringerlösung beibehält [68]. Diese Entdeckung ist auch Grundlage der innerhalb dieser Arbeit verwendeten Methoden des Organbades.

Durch die Fixation des Muskelstreifens an einem Kraftmesser konnten die fortlaufenden isometrischen Kraftänderungen über die Zeit detektiert und aufgezeichnet werden. So konnte das Präparat unter annähernd physiologischen Bedingungen hinsichtlich pharmakologischer Beeinflussung studiert werden.

LÖSUNGEN UND SUBSTANZEN

Lösungen

Die Präparation und Aufbewahrung der Muskelpräparate erfolgte in einer Lösung, die sich aus folgenden Komponenten zusammensetzte:

Tabelle 5: Zusammensetzung der Präparierlösung II

Substanzen	NaCl	KCl	NaH ₂ PO ₄	CaCl ₂	MgSO ₄	EDTA	HEPES
mmol/l	145	4,5	1,4	0,1	1	0,025	5

Um die Vitalität der Präparate während der Versuche gewährleisten zu können, wurden sie während dieser Zeit mit einer physiologischen Salzlösung (modifizierte Krebs-Lösung, im Folgenden "Krebs-Lösung" genannt) umspült, die die interstitielle Flüssigkeit hinsichtlich des osmotischen Druckes, der Ionenzusammensetzung und des pH-Wertes nachahmte [69].

Diese Krebslösung bestand aus:

Tabelle 6: Zusammensetzung der physiologischen Krebslösung

Substanzen	NaCl	NaHCO ₃	KH ₃ PO ₄	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂	Glucose
mmol/l	112	25	1,2	4,7	1,2	2,5	11,5

Diese Lösung wurde an jedem Versuchstag frisch aus den jeweiligen Stammlösungen hergestellt und erst kurz vor Beginn des Experiments mit Kalziumchlorid (CaCl₂) und Glucose versetzt. Um den Bicarbonatpuffer zu stabilisieren und den pH-Wert konstant auf 7,4 zu halten, wurde die Krebs-Lösung während der Versuche dauerhaft mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) begast.

Da das Lanthan in seiner ionisierten Form die Eigenschaft hat, mit Phosphat auszufallen, wurde für diese Versuchsreihen eine Phosphat- und Bicarbonat-freie HEPES-gepufferte Lösung verwendet, wenngleich dies Auswirkungen der Spontanaktivität zur Folge haben kann (Erläuterungen dazu siehe Abschnitt 3.1.2). Die HEPES-gepufferte Lösung wurde mit reinem O₂ begast und setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 7: Zusammensetzung der Phosphat-und Bicarbonatfreien Lösung

Substanzen	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	Glucose	HEPES
mmol/l	137	2,7	1,8	1	5,6	4,2

Die für die Lösungen verwendeten Salze wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim), Merck (Darmstadt) und Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen.

Testsubstanzen

Folgende Substanzen wurden getestet:

Acetylcholin (ACh) fungiert als Agonist am Muscarin-Rezeptor und induziert die Ca²⁺ Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Zur Herstellung einer Stammlösung [1mM] wurde das Pulver Acetylcholinchlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim) in Aqua destillata (Aqua dest.) gelöst. Innerhalb der Versuchsreihen wurde die Konzentration 1 µM verwendet.

Kaliumchlorid (KCl, Sigma-Aldrich, Steinheim) wurde zur Testung der depolarisationsinduzierten Kontraktionsantwort am glatten Muskel eingesetzt. Aus dem bereits für die Lösungen verwendeten KCl-Salz wurde eine 1,5 M Stammlösung angemischt. Als Trägersubstanz diente

auch hier Aqua dest. Für die Versuche wurde die Zugabe der 1,5 M Lösung so bemessen, dass im Organbad eine Konzentration von 60 mM erreicht wurde.

Zur Blockade des TRPM7-Kanals wurden folgende Testsubstanzen verwendet:

Spermin ($\geq 97\%$, Sigma-Aldrich, Steinheim), Lanthantetrahydrochlorid (LaCl_3 , Merck, Darmstadt), Chinidin (Serva, Heidelberg), Flufenaminsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim). Mit Ausnahme der Flufenaminsäure, die in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst wurde, diente bei allen anderen Testsubstanzen Aqua dest. als Trägersubstanz.

ORGANPRÄPARATION

43 Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts mit einem Alter von 200-250 Tagen und einem Gewicht zwischen 300-500g wurden gemäß dem Tierschutzgesetz (§ 4 TierSchG) und nach den Regularien und ethischen Standards der Universität Rostock mit Ether narkotisiert und durch Dekapitation getötet.

Mit einem longitudinalen Schnitt wurde die Bauchhöhle eröffnet und die für die Versuchsreihen verwendeten Organe nacheinander herausgeschnitten, in gekühlte Präparierlösung überführt und bei 4°C bis zur weiteren Präparation aufbewahrt. Entnommen wurden im Einzelnen folgende Organe: Magen, Colon, Portalvene und Uterus, wie nachstehend im Einzelnen beschrieben.

Der Magen wurde zunächst mit zwei Schnitten von Oesophagus und Duodenum getrennt und aus dem Rattensitus entnommen. Zur Feinpräparation wurde der Magen in einer mit Präparierlösung befüllten Präparierschale mit Nadeln fixiert und mittels Pinzette und Pinzettenschere unter mikroskopischer Aufsicht von Binde- und Fettgewebe befreit. Entlang der großen Kurvatur wurde nun ein etwa 15 mm langer und 2 mm breiter Streifen der antralen Muscularis herauspräpariert ohne den Magen dabei zu penetrieren (vgl. Abb. 3 A).

Die Portalvene wurde ausgehend von der Leberpforte auf einem etwa 20 mm langen Stück dargestellt und unter Vermeidung größerer Zugbelastung aus der Abdominalhöhle herausgetrennt (vgl. Abb. 3 B). Die Fixierung zur Präparation erfolgte analog derer des Magens. Unter äußerster Vorsicht wurde Binde-, Fett- und Lebergewebe von der Portalvene entfernt. Das Gefäß wurde anschließend auf gesamter Länge longitudinal gespalten.

Ein Teil des distalen Colons (1 cm distal der Flexura coli sinistra) wurde aus dem Situs entnommen und möglichenfalls noch im Colonabschnitt befindlicher Faeces mit einer Pinzette entfernt, ohne dabei das Colon zu dehnen. Anschließend wurden etwa 10 mm lange und 2 mm breite Längsstreifen aus dem Bereich der Colonwand geschnitten, welcher der Mesenterialwurzel gegenüber lag (vgl. Abb. 3 C). Fettgewebe wurde abgelöst und die Mucosa stumpf abpräpariert.

Der Uterus wurde makroskopisch von Fettgewebe befreit und anschließend komplett aus dem Tier entnommen. Unter mikroskopischer Aufsicht wurden dann weitere Fettreste vom Uterus entfernt und etwa 20 mm lange Stücke aus den Seitenhörnern geschnitten (Abb. 3 C). Anschließend wurden die Uterusabschnitte für 60 min. in 10 mU/ml Oxytocin (Sigma, Steinheim) im Organbad vorinkubiert, um die Konstanz der Spontanaktivität während der Versuchsreihen gewährleisten zu können [70].

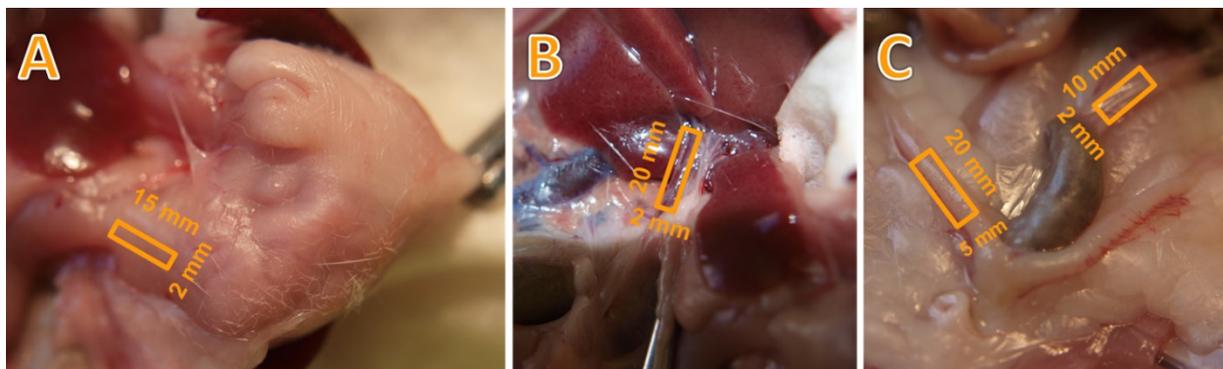


Abbildung 3: Darstellung der Organe im Rattensitus

(A) Herauspräparierter Magen mit Kennzeichnung des für die Versuche verwendeten Muskelstreifens aus dem Bereich des Antrums. (B) Darstellung der Portalvene mit Kennzeichnung des für die Versuche verwendeten Gefäßabschnittes. Am oberen linken Bildrand befindet sich die Leber. (C) Aufsicht auf Uterus und Colon mit Einzeichnung der Absetzungsgrößen der Organabschnitte.

MESSPLATZ UND INSTRUMENTE

Die Organbäder waren doppelwändig und fassten ein Volumen von 30ml. Sie erhielten Zulauf aus ebenso doppelwändigen Vorratsgefäßen, die mittels eines Schlauches mit den Organbädern verbunden waren, um einen Zulauf von frischer Lösung gewährleisten zu können. Die innere Kammer des Organbades wurde permanent von Wasser umspült, welches durch eine Wärmepumpe (Lauda M3, Lab Extreme, Kent City, USA) auf $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ temperiert und durch das von der Doppelwand umschlossene äußere Lumen des Organbades gepumpt wurde. Somit konnte diese physiologische Temperatur in Vorratsgefäßen und Organbädern konstant gehalten werden. Dies ist die Voraussetzung für eine stabile Spontanaktivität, wie Untersuchungen an der *Taenia coli* des Meerschweinchens zeigten [71].

Eine Pumpe ermöglichte das Absaugen der Versuchslösung zu den im Protokoll festgelegten Zeitpunkten. Sowohl Vorratsgefäße als auch Organbäder konnten je nach verwendeter Pufferlösung mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂, für Experimente mit Krebslösung) oder reinem Sauerstoff (für Experimente mit THS) durch in die Glaswand eingeschmolzene Fritten begast werden.

Das Muskelpräparat wurde mit einem Fadenende an der Öse eines Glashalters befestigt und in das Organbad eingehängt. Das andere Fadenende wurde an einen mechanischen Transducer (World Precision Instruments, Sarasota) geknotet, um die Kraftänderungen der Muskelpräparate zu messen und in elektrische Signale umzuwandeln. Dieser mechanische Transducer war via Messbrücke und Verstärker (World Precision Instruments, Sarasota) sowie dem Analog/ Digitalwandler (Power Lab 16/30 ADInstruments, Sydney) mit dem Computer verbunden. Die gemessenen Daten wurden dann über die Software LabChart© 5.1.1 von ADInstruments in Echtzeit aufgenommen. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 4 dargestellt.

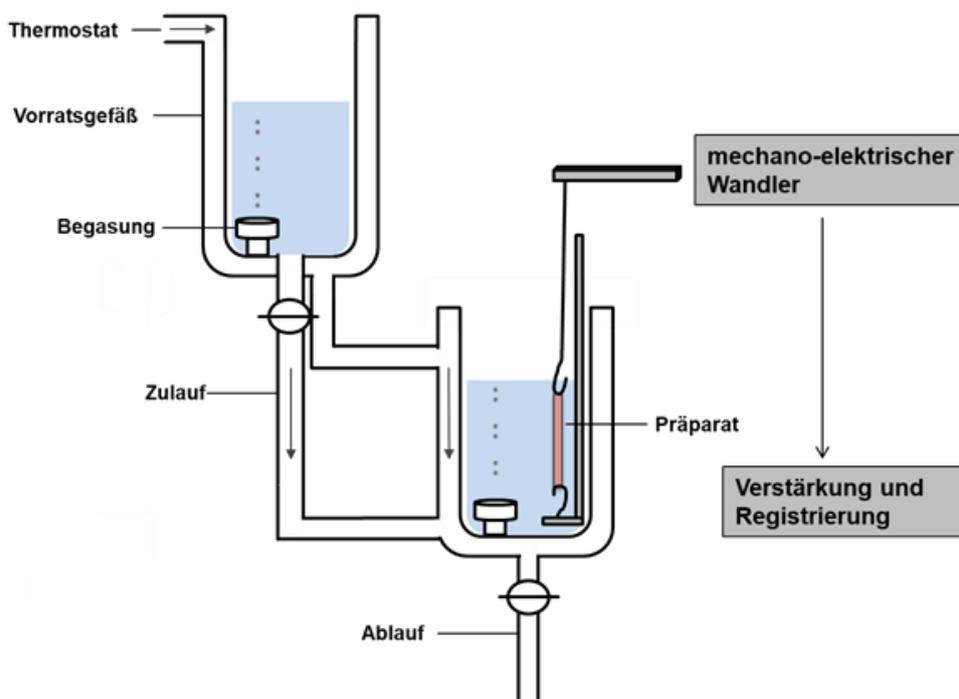


Abbildung 4: Schematischer Versuchsaufbau des Organbades modifiziert nach Golenhofen 1983

Zu sehen ist das doppelwandige Organbad gefüllt mit 30ml physiologischer Salzlösung, die über den Zu- und Ablauf entsprechend dem Versuchsablauf ausgetauscht werden konnte. Über den Boden der Vorratsgefäße erfolgte eine kontinuierliche Begasung mit einem Gemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂ (bzw. 100% O₂). Die Muskelstreifen wurden in vertikaler Richtung in das Organbad eingespannt. Das distale Ende wurde an einem Organbadhalter fixiert, das proximal gelegene Ende am Transducer befestigt.

VERSUCHSABLAUF

Vor Beginn der Messungen wurde der Kraftaufnehmer mit einem Messgewicht geeicht. Anschließend wurden die frisch präparierten Muskelstreifen in das Organbad eingehängt, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben. Für etwa eine Stunde wurden die Muskelstreifen in der auf 37 °C temperierten Krebslösung belassen, um eine stabile Spontanaktivität zu erreichen, bevor mit den Messungen begonnen werden konnte.

Zwecks Vitalitätsprüfung wurde als erstes eine depolarisationsinduzierte Kontraktion durch Erhöhung der Kaliumkonzentration in der Pufferlösung auf 60 mM KCl ausgelöst. Nach Ausbildung eines stabilen Plateaus wurde mit Krebslösung gespült und die Herstellung einer regelgerechten Spontanaktivität abgewartet. Im Anschluss erfolgte eine Agonisten-Kontraktion mittels Acetylcholin in einer Konzentration von 1 µM.



Abbildung 5: Allgemeines Versuchsschema

Aktivierung (A1) der einzelnen Muskelpräparate durch KCl und ACh. Nach jedem Manöver wurde die Lösung im Organbad ausgetauscht, wie durch die gestrichelten Linien dargestellt. Nach Erreichen einer stabilen Spontanaktivität konnten dann die Testsubstanzen kumulativ nach einer für jedes Pharmakon individuellen Konzentrations-treppe hinzugegeben werden. Die Zeit zwischen der Addition der Konzentrationen richtete sich nach der Ausbildung eines Steady State und wurde hier symbolisch mit einem Pfeil markiert. Im Anschluss an die maximal getestete Dosis wurde eine erneute Aktivierung (A2) mit KCl oder ACh durchgeführt. Die Einwirkzeit richtete sich nach dem Erreichen des Kontraktionsmaximums.

Nach einer kurzen Erholungsphase der Präparate und dem erneuten Erreichen einer konstanten Aktivität wurden die Testsubstanzen Spermin, Lanthan, Flufenaminsäure und Chinidin kumulativ nach einem für jede Substanz individuellen Schema hinzugegeben. Das entsprechende Schema ist in der nachfolgenden Tabelle 8 abgebildet.

Tabelle 8: Individuelles Konzentrationsschema der Testsubstanzen orientiert an den Arbeiten von *Kim BJ et al.* [13, 14]

Konzentration [μM]							
Spermin	5	10	30	50	100	300	500
Lanthan	1	10	100	300	700		
Flufenaminsäure	0,5	5	10	30	50		
Chinidin	1	3	10	30	100	300	

Es wurde mit der niedrigsten Konzentration begonnen und die nächsthöhere Konzentration erst hinzugegeben, wenn ein Steady State erreicht war. Nach Zugabe der höchsten Dosis der Testsubstanz wurde eine abschließende Vitalitätsprüfung mittels ACh ($1 \mu\text{M}$) oder KCl (60 mM) durchgeführt.

AUSWERTUNG

Um Veränderungen hinsichtlich der Spontanaktivität und der Kontraktilität der Organpräparate zuverlässig erfassen zu können, wurden die aufgezeichneten Rohdaten unter Berücksichtigung verschiedener Aspekte ausgewertet. Die Bestimmung von Frequenz [1/s] und Amplitude [mN] sollten zur Beurteilung der Spontanaktivität herangezogen werden. Um auch eine mögliche Veränderung des Kontraktionsmusters verifizieren zu können, wurde das Kraftintegral als zusätzlicher Parameter eingeführt.

Gemessen wurde über einen Zeitraum von 3 Minuten bei Antrum und Portalvene. Da Uterus und Colon physiologischer Weise langsamere Frequenzen aufweisen, wurde der Messzeitraum bei diesen Präparaten auf 5 Minuten festgelegt. Die Messung erfolgte zum einen vor jeglicher pharmakologischer Beeinflussung, sowie nach Zugabe der jeweiligen Konzentration der Testsubstanz. Die vor der pharmakologischen Beeinflussung ermittelten Werte für Frequenz, Amplitude und Integral wurden als Vergleichsparameter herangezogen und mit 100% gleichgesetzt.

Bei den Aktivierungskontraktionen durch Kaliumchlorid und Acetylcholin wurden die Zeit bis zur maximalen Kraftentwicklung [s], der Kraftzuwachs [mN] sowie das Integral über eine Zeit von 90 Sekunden ermittelt, um eine mögliche Kontraktilitätsminderung der Muskelpräparate durch die Testsubstanzen zu erfassen. Die Kontraktion unter Kontrollbedingungen, d.h. ohne

Einfluss der Testsubstanz, wurde auch hier als Vergleichsparameter festgelegt und als 100% definiert.

2.2 KONFOKALMIKROSKOPIE

ANLEGEN EINER PRIMÄRKULTUR AUS DEM MAGENCORPUS/ -ANTRUM

Wie zuvor wurden Wistar Ratten beiderlei Geschlechts mittels Diethylether narkotisiert und anschließend durch Dekapitation getötet. Nach dem Entfernen des Fells und Eröffnung des Abdomens unter sterilen Kautelen wurde nun ein etwa 10 mm langer und 2 mm breiter Streifen der corporalen Muscularis des Magens entnommen. Für diese Schritte wurde steriles Präparationsbesteck verwendet. Das entnommene Präparat wurde sofort in ein Reaktionsgefäß mit Zellkulturmedium überführt. Alle folgenden Schritte erfolgten unter einer Sterilbank.

Zur enzymatischen Verdauung wurde folgende Lösung in 1 ml DMEM/Ham's (1:1) + 20% FCS (Biochrome AG, Berlin) angesetzt und steril filtriert:

Tabelle 9: Zusammensetzung der Lösungen für die enzymatische Verdauung

Substanz	Aktivität [U/mg]	Masse [mg]	Hersteller
Collagenase, from Clostridium hystolyticum, type IV-S	281	1	Sigma, Steinheim
Blend Collagenase Typ H, from Clostridium hystolyticum,	>1 (FALGPA)	1	Sigma, Steinheim
Papain		2	FERAK Laborat GmbH, Berlin
Trypsin-Inhibitor, Type II-S: Soy-bean	10.000	1	Sigma, Steinheim
Albumin, from bovine serum		10	Sigma, Steinheim
Elastase from porcine pancreas	120	0,45	Serva, Heidelberg

Mit der gekreuzten Skalpell-Technik wurde das Präparat zerkleinert und anschließend in die Verdauungslösung gegeben. Diese wurde für eine halbe Stunde bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Im Folgenden wurde der Überstand der Suspension mit einer Pipette abgezogen, 1 ml Medium (DMEM/Ham's (1:1) + 20% FCS) hinzugegeben und agitiert. Zur

Kontrolle der Verdauung wurde ein Tropfen der Lösung unter dem Mikroskop betrachtet. War die Zellausbeute zufriedenstellend, wurde die Kultur in einer Kulturflasche mit ca. 6 ml Medium und dem Zusatz von Gentamycin (50 µg/ml, PAA) und Amphotericin B (2,5 µg/ml, PAA) ausgesät und im Brutschrank für mehrere Tage inkubiert. Einmal wöchentlich erfolgte ein Mediumwechsel.

Um eine Zellkultur zu splitten, wurde diese zunächst zwei Mal mit 3 ml PBS (Dulbecco's w/o Ca²⁺, w/o Mg²⁺, Biochrom AG, Berlin) gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Trypsin-EDTA hinzugegeben, das Gefäß kurz geschwenkt und umgehend der Überstand abgezogen. Die Kultur wurde für etwa 1 h im Brutschrank inkubiert. Um den Lysierungsprozess zu beenden, wurden abschließend 3 ml Kulturmedium zugegeben. Die Aussaat erfolgte in einen µ-Dish und wurde 2 Tage später für die Fluoreszenzmessung verwendet. Es wurden ausschließlich Kulturen bis zur zweiten Passage verwendet.

BEURTEILUNG DER ZELLMORPHOLOGIE

Um die spontanaktiven Zellkulturen auch morphologisch genauer beschreiben zu können, wurden einzelne µ-Dishes in Formalin fixiert. Ein Tropfen des Eindeckmediums Prolong® Gold (Thermo Fisher Scientific, Waltham) wurde auf den Objektträger gegeben und der ausgestanzte µ-Dish mit der Oberseite aufgesetzt und über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur getrocknet. Innerhalb von 48 h erfolgte die mikroskopische Untersuchung. Verwendet wurde ein inverses Mikroskop (Leica DMI6000 B). Die Aufnahme der Bilder erfolgte über eine hochsensitive, monochrome Digitalkamera für Fluoreszenzmikroskopie (Leica DFC365 FX). Die Einstellung der Hardware sowie die Bearbeitung und Speicherung der Daten erfolgte über das Programm Leica LAS AF.

PRINZIP DER KONFOKALMIKROSKOPISCHEN MESSUNG

Mittels Fluoreszenzmikroskopie war es möglich, das intrazelluläre Kalziumsignal glatt-muskulärer Zellen im räumlich-zeitlichen Verlauf darstellbar zu machen. Hierzu werden spezifische Ca²⁺-Indikatoren verwendet. Einen Überblick über die Vielfalt dieser Substanzen geben *Takahashi et al.* [72].

Für die folgenden Experimente wurde der nicht-ratiometrische Farbstoff Fluo-3 Ace-toxymethylester (AM-E) verwendet (Exzitationsmaximum bei $\lambda = 488$ nm, Emissionsmaximum bei $\lambda = 526$ nm und $K_d = 390$ nM). Im Gegensatz zu den ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoffen ist bei diesem Prinzip keine Quantifizierung der Ca²⁺-Konzentration möglich. Das angewandte Verfahren lässt also nur semi-quantitative Angaben zu. Zur Klärung unserer Fragestellung ist

die Anwendung des nicht-ratiometrischen Farbstoffes ausreichend, da diese die zeitlichen Fluoreszenzverläufe unter Einfluss der Testsubstanzen untersucht und kein Vergleich von Absolutwerten stattfinden muss.

Fluo-3 AM-E kann aufgrund seiner unpolaren Eigenschaften ungehindert durch die Zellmembran permeieren. Intrazellulär wird die AM-E-Verbindung dann durch unspezifische Esterasen gespalten, sodass der Farbstoff wegen seiner nun geringen Lipidlöslichkeit kaum mehr durch die intakte Zellmembran in den Extrazellularraum gelangen kann. Durch die Bindung an Ca^{2+} wird die Fluoreszenzintensität des Fluo-3 über 100-fach gesteigert, wie es bei Erhöhung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Fall ist [73].

BELADUNG DER ZELLEN MIT FLUO-3 AM-E

Zur Beladung der Zellen wurden bei Raumtemperatur 5 μM Fluo-3 AM-E (Molecular Probes, Oregon USA) verwendet. Dieser wurde in DMSO (D 8418 Sigma, Taufkirchen Germany) gelöst und zur besseren intrazellulären Verteilung des schlecht wasserlöslichen Farbstoffs mit 5 μl Pluronic 10% (Invitrogen, Oregon USA) versetzt. Diese Suspension wurde für 3 Minuten im Ultraschallbad homogenisiert. Anschließend wurde 1 ml THS, die sich zusammensetzte wie in Tabelle 7 beschrieben, dazugegeben und es folgte eine weitere Behandlung im Ultraschallbad für 3 Minuten. Der bewachsene μ -Dish wurde mit dem frisch hergestellten Farbstoff beladen und für 75 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Der μ -Dish wurde daraufhin drei Mal mit THS gewaschen. Bis zur weiteren Untersuchung wurde die Kultur in Dunkelheit bei Raumtemperatur gelagert.

AUFBAU DES KONFOKALMIKROSKOPS

Für die Messungen wurde ein konfokales Lasermikroskop (Nikon Eclipse TE2000-S) mit integrierter Scannereinheit (CSU-10, Yokogawa) verwendet. Dabei handelt es sich um ein Spinning Disc System bestehend aus zwei rotierenden Scheiben (180 rpm). Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 488 \text{ nm}$ durch einen Argon Laser (643 Ion Laser, CVI Melles Griot). Das Anregungslicht tritt durch Mikrolinsen in der unteren Scheibe auf die entsprechenden Lochblenden der oberen Scheibe und wurde schließlich durch das Objektiv auf die ausgewählte Stelle des μ -Dish fokussiert. An dieser Stelle erfolgte die Anregung der Ca^{2+} -Indikatoren. Retrograd gelangt das emittierte Signal mit der Wellenlänge von $\lambda = 529 \text{ nm}$ zurück und wurde unterhalb der oberen Scheibe von einem dichroischen Spiegel reflektiert und zur CCD-Kamera gelenkt, welche die emittierten Photonen detektiert. Diese

wurden dann über einen Bildwandler (A/D-Wandler) zum PC geleitet und mit dem Programm Ultra View (Perkin Elmer) aufgezeichnet und gesteuert [74].

Auf den Objektisch wurde eine Aluminiumplatte gelegt, in deren Mitte der μ -Dish eingebracht war. Diese Platte war mit einem Heizwiderstand versehen, um eine zirkuläre Beheizung der im μ -Dish befindlichen THS-Lösung zu gewährleisten und den Zellen damit ein geeignetes Milieu für ihre Aktivität zu bieten. Über eine Temperatursonde wurde die Temperatur während der Messungen kontrolliert und auf 33 °C gehalten. Alle Messungen erfolgten mit 200-facher Vergrößerung.

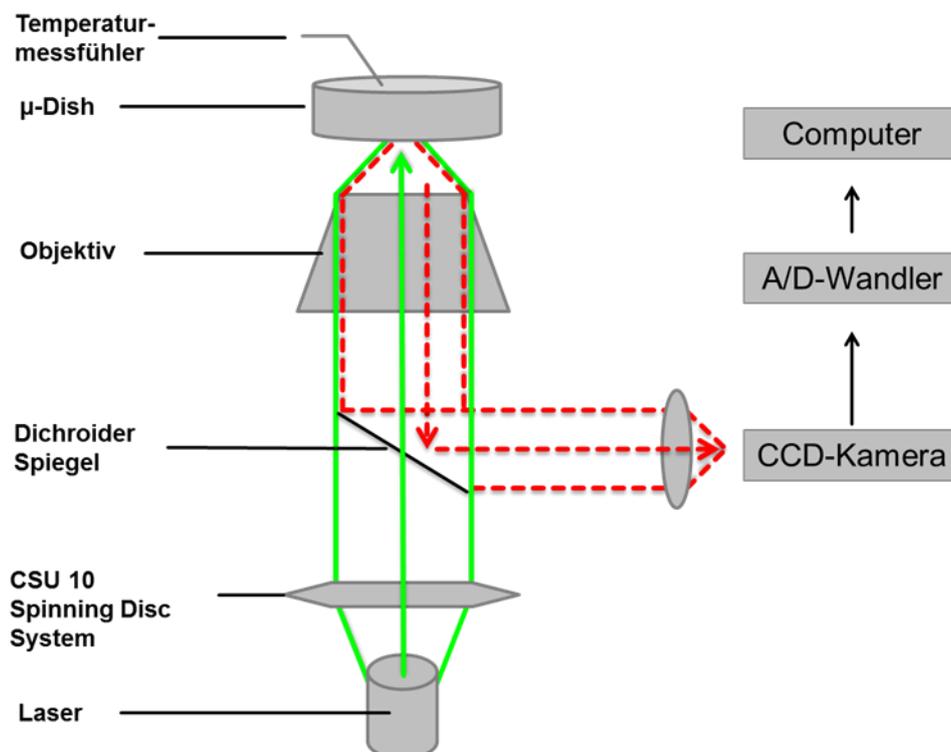


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Konfokalmikroskops

Darstellung des Strahlengangs: Quelle für das monochromatische Anregungslicht ($\lambda = 488 \text{ nm}$) war ein Argon-Laser (Melles Griot). Das Anregungslicht wurde durch Mikrolinsen in der unteren Scheibe auf die korrespondierenden Lochblenden der oberen Scheibe fokussiert. Das durch die Lochblenden tretende Licht wurde durch ein Objektiv auf das Präparat fokussiert, sodass es zur Exzitation des Ca^{2+} -Indikators kam. Über den retrograden Weg (Objektiv und Lochblenden der Nipkov-Scheibe) wurde das emittierte Fluoreszenzsignal (Wellenlänge: 525 nm) durch einen dichroischen Spiegel reflektiert. So gelangt es zur CCD-Kamera, welche die vom jeweiligen Probenort emittierten Photonen pixelweise detektierte und die so gewonnenen Daten über einen A/D-Wandler auf einen PC übertrug.

ABLAUF DER MESSUNGEN

Da die Spontanaktivität der ICCs einer Temperaturabhängigkeit unterliegt, wurde erst mit den Messungen begonnen, wenn eine stabile Temperatur erreicht wurde. Zunächst wurde eine

Probemessung gemacht, um festzustellen, ob es sich um eine spontanaktive Zellkultur handelt. War dies der Fall, so wurde eine 900 Sekunden lange Messung gestartet, bei der nach 300 Sekunden die jeweilige Testsubstanz in entsprechender Konzentration hinzugegeben wurde. Aufgrund ihrer höheren Selektivität für den TRPM7-Kanal wurden in dieser Versuchsreihe nur die Testsubstanzen Spermin und Lanthan hinsichtlich ihres Einflusses auf die Spontanaktivität getestet. Im Anschluss an diese Messung wurde der μ -Dish gespült und eine neue Messung gestartet.

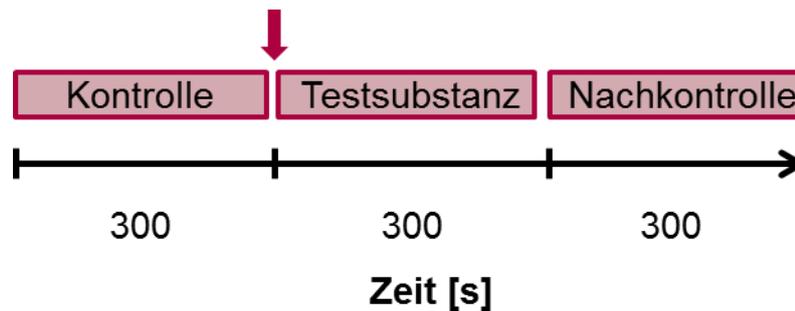


Abbildung 7: Schematischer Versuchsablauf am konfokalen Mikroskop

Zunächst Kontrollmessung über 5 Minuten (= 300 Sekunden), anschließend Zugabe der Testsubstanz. Der Zeitpunkt der Zugabe ist mit einem Pfeil markiert. 5-minütige Beobachtung der Wirkung und abschließende 5-minütige Nachbeobachtungszeit.

Konnte in den ausgewählten Testsubstanzen keine Spontanaktivität registriert werden, wurde die Reaktivität der Zellen auf KCl getestet. Es wurde zunächst eine Messung unter Kontrollbedingungen durchgeführt und anschließend die Kontraktilität unter Einfluss der entsprechenden Konzentration der Testsubstanz bestimmt. Dazu wurde direkt zu Beginn der Messung die entsprechende Konzentration der Testsubstanz vorgelegt, 300 Sekunden einwirken lassen und dann 60 μ M KCl hinzugegeben.

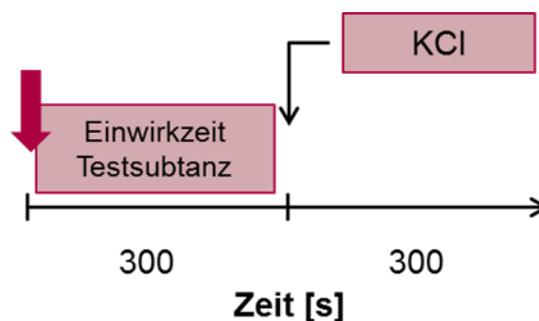


Abbildung 8: Schematischer Versuchsablauf bei Testung der KCl Response

Nach Zugabe der Testsubstanz wurde diese 300 Sekunden einwirken lassen, bevor 60 mM KCl hinzugegeben wurden. Anschließend wurde die Aktivität über weitere 300 Sekunden beobachtet.

Jede Messung lieferte bei einer Bildrate von 0,5/Sekunde und einem Binning von 2 x 2 eine Sequenz von 450 Einzelaufnahmen. Die Laserintensität wurde bei allen Versuchsreihen sehr

gering gehalten, da es bei hohen Laserintensitäten durch vielfältige Prozesse zur Zerstörung eines Teils des Indikators mit konsekutiver Abnahme der Fluoreszenzintensität kommt [75].

AUSWERTUNG

Insgesamt wurden 20 Primärkulturen angelegt und für die Messungen am Konfokalmikroskop verwendet. Ausgewertet wurden aber nur Zellkulturen, die folgende Kriterien erfüllten:

- Stabiler Messablauf durch eine konstante Temperatur im μ -Dish;
- gute Adhärenz der Zellen nach der Inkubationsphase.

Waren diese Kriterien erfüllt, wurde eine Beladungskontrolle durchgeführt. Die Beladung wurde als gut klassifiziert, wenn bei minimaler Laserintensität ein Fluoreszenzsignal verzeichnet werden konnte. War dieses Kriterium erfüllt, wurde eine Testmessung über 600 Sekunden durchgeführt. Zeigte sich dabei eine Spontanaktivität der Zellen, wurde mit dem Protokoll – wie in Abbildung 7 dargestellt – begonnen.

Konnte keine Spontanaktivität aufgezeichnet werden, wurde die Reaktivität der Zellen auf KCl geprüft, d.h. ob sich eine durch Depolarisation der Zellmembran ausgelöster Ca^{2+} -Anstieg erkennen ließ, um zum einen die Vitalität der Zellen zu überprüfen und zum anderen den Effekt der Testsubstanzen auf diese Reaktivität zu testen. Aufgrund dieser Vorgehensweise lieferte die Untersuchung die in Abbildung 9 zusammengefasste Auswertung.

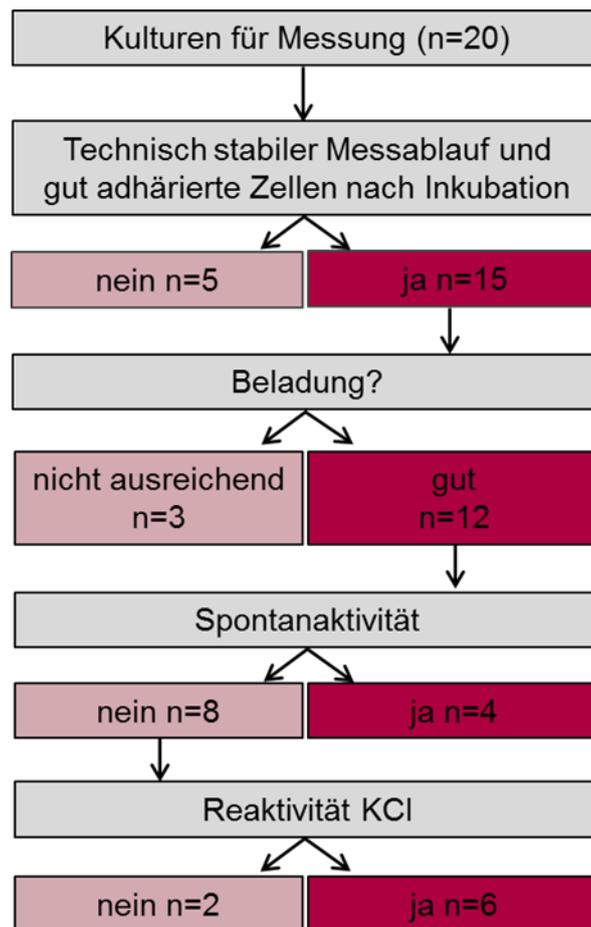


Abbildung 9: Schema zur Auswertung der aufgezeichneten Daten

Die für die Messungen ausgewählten Kulturen wurden zunächst hinsichtlich einem technisch stabilen Messablauf sowie einer guten Adhärenz der Zellen nach Inkubation beurteilt. Erfüllten sie diese Kriterien, wurde die Farbstoffbeladung der Zellen geprüft. Bei guter Beladung wurde das Auftreten der Spontanaktivität geprüft. War diese nicht zu registrieren, wurden die Zellen auf Reaktivität durch KCl geprüft.

Mit Hilfe der Konfokalmikroskopie sollte der Einfluss der TRPM7-Kanal-Blocker auf die Ca^{2+} -Oszillationen der ICC untersucht werden.

Bei den spontanaktiven Zellkulturen wurden daher für die Kontrollmessung, Einfluss der Testsubstanz und Nachkontrolle Frequenz [1/s] und Amplitude [Greylevel] über eine Dauer von jeweils 300 Sekunden gemessen. Die in der Kontrollmessung ermittelten Werte für Frequenz und Amplitude wurden als Vergleichsparameter herangezogen und mit 100% gleichgesetzt. Für die Reaktivität auf KCl wurde der Anstieg der Greylevel unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss der Testsubstanz bestimmt. Die Kontraktion unter Kontrollbedingungen diente auch hier als Vergleichsparameter und wurde ebenfalls mit 100% gleichgesetzt.

2.3 STATISTIK

Zur Darstellung der Ergebnisse wurden Mittelwert (MW), Standardabweichung (SDM) und Standardfehler (Standard Error of Mean, SEM) mit dem Programm Microsoft Excel Version 2004 ermittelt. Die Ergebnisse werden im Folgenden als $MW \pm SEM$ angegeben. Auch die Fehlerbalken der Diagramme repräsentieren den SEM.

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde aufgrund der geringen Stichprobengröße angenommen, dass die Ergebnisse nicht normalverteilt sind, sodass ein nicht-parametrischer Test für abhängige Stichproben angewandt werden muss. So wurde zur Testung der Signifikanz der Ergebnisse der Wilcoxon Test in IBM SPSS Statistics Version 22 eingesetzt. Die Signifikanztestung wurde nur für Messungen mit $n \geq 4$ durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $*p < 0,05$ festgelegt (vgl. Ergebnisteil).

III. ERGEBNISSE

3.1 MECHANISCHE MESSUNGEN

Im Folgenden werden die Ergebnisse der mechanischen Messungen im Organbad detailliert dargestellt. Zunächst wird ein Überblick über die spontane Rhythmik der untersuchten Präparate unter Kontrollbedingungen (in physiologischer Krebs-Lösung), in THS-Lösung sowie des Uterus unter Einfluss von Oxytocin gegeben. Anschließend werden die Veränderungen der Spontanaktivität der untersuchten Gewebe hinsichtlich Frequenz, Amplitude, Kraftintegral und Kontraktilität jeweils unter dem Einfluss der vier Testsubstanzen Spermin, Lanthan, Flufenaminsäure und Chinidin untersucht.

3.1.1 MESSUNGEN IN KREBSLÖSUNG

Untersucht wurden die Veränderungen des Rhythmus und der Kraftentwicklung von Antrum, Colon, Portalvene und Uterus. Unter Kontrollbedingungen (37 °C, pH-Wert 7,4) zeigten die glattmuskulären Gewebe eine stabile Spontanaktivität mit ihren jeweiligen organspezifischen Charakteristika wie in Abbildung 10 gezeigt.

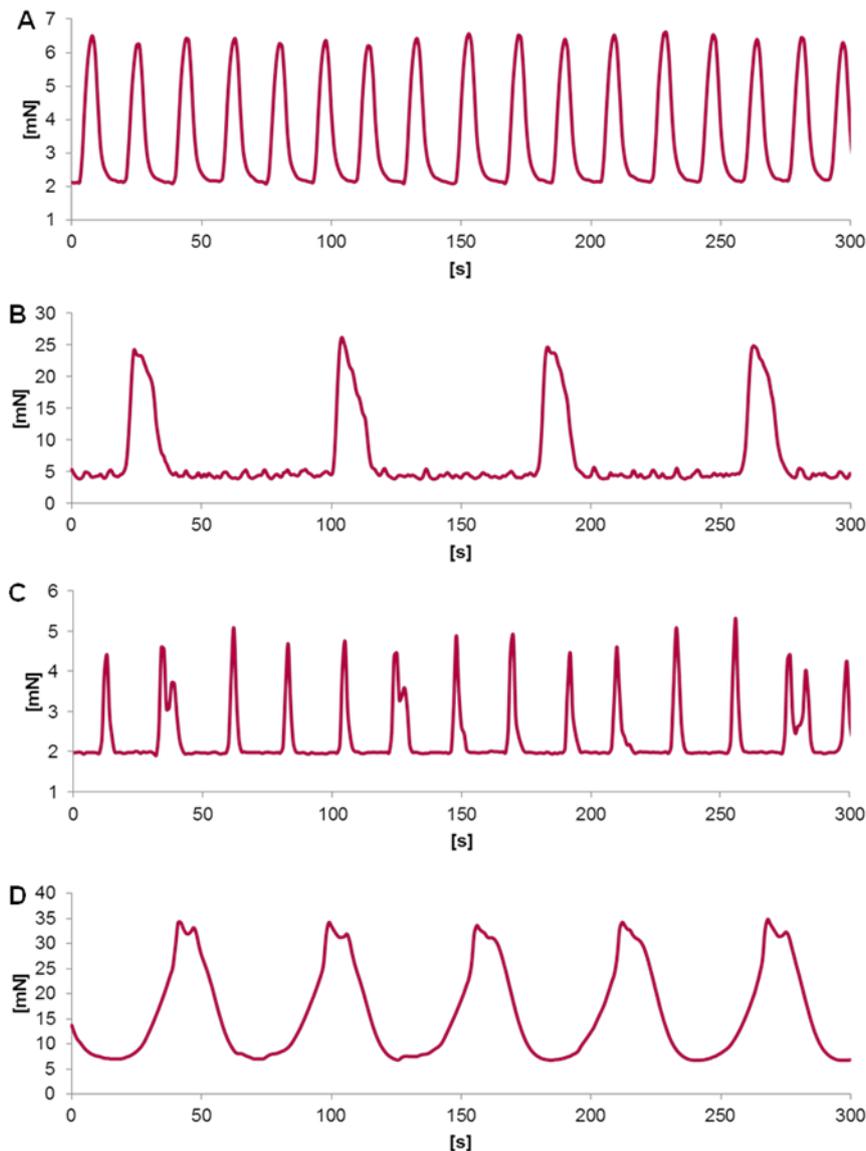


Abbildung 10: Registrierung der Spontanaktivität glattemuskulärer Organpräparate unter Kontrollbedingungen

A: Magenantrum B: Colon C: Portalvene D: Uterus

Das Magenantrum zeigt durchgängig regelmäßige phasische Oszillationen des Tonus (vgl. Abb. 10 A). Hingegen lassen sich zwischen den Kontraktionen der Portalvene kurze Pausen mit konstanter Grundspannung beobachten (vgl. Abb. 10 C). Beide Organe weisen Frequenzen zwischen 3 - 5/min auf (vgl. Abb. 10 A und C).

Die Colonpräparate sind durch kleine irreguläre Kontraktionen mit hoher Frequenz, sogenannte "ripples" (> 10/min) gekennzeichnet, denen sich sogenannte "giant contractions" auflagern. Letztere zeigen eine vielfach höhere Amplitude mit längerer Dauer und einer Frequenz von 1 - 2/min (vgl. Abb. 10 B). Der Uterus zeigt nach Zugabe von Oxytocin regelmäßige Kontraktionen mit hoher Amplitude und langer Dauer und oszilliert mit einer Frequenz von 1 - 2/min (vgl. Abb. 10 D).

3.1.2 MESSUNGEN IN PHOSPHATFREIER HEPES-GEPUFFERTER LÖSUNG

Anders als in der physiologischen Krebslösung zeigte sich in der phosphatfreien Lösung keine Kristallbildung nach Zugabe der Testsubstanz LaCl_3 .

Allerdings waren die Muskelpräparate in ihrer Aktivität deutlich instabiler als in den Messungen mit der physiologischen Krebslösung. Die Ausbildung einer stabilen Aktivität dauerte im Durchschnitt ca. 20 Minuten länger als es bei den Präparaten in der physiologischen Krebslösung der Fall war. Bei etwa einem Drittel der Präparate waren unregelmäßige Rhythmen mit kurzen Aussetzern zu beobachten. Diese konnten daher nicht für die Messungen herangezogen werden.

Die durchschnittliche Frequenz und Amplitude der Präparate wiesen im Vergleich zu den Messungen unter physiologischen Bedingungen keine Unterschiede auf. Auch das äußere Erscheinungsbild der Kontraktionen zeigte keine wesentlichen Unterschiede verglichen mit der Aktivität in physiologischer Lösung wie Abbildung 11 am Beispiel des Antrums darstellt.

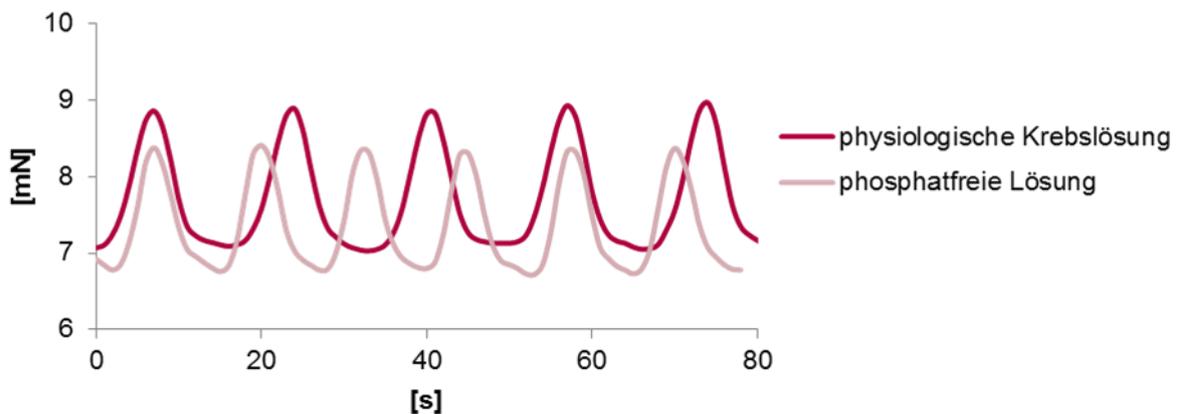


Abbildung 11: Vergleich der Aktivität zweier verschiedener Antrumpräparate in physiologischer Krebslösung und in phosphatfreier Lösung

Auch die exogene Aktivierbarkeit zeigte unter phosphatfreien Bedingungen keine Unterschiede gegenüber der physiologischen Krebslösung.

3.1.3 UTERUS UNTER OXYTOCIN

Der Uterus zeigte unter physiologischen Bedingungen nur extrem langsame Kontraktionsfrequenzen (0,2/Min), was ein Studium der Substanzeffekte auf seine Spontanaktivität deutlich

erschwerte. Daher wurden die Uteruspräparate mit Oxytocin vorinkubiert, um eine stabile Spontanaktivität mit höherer Frequenz zu erreichen.

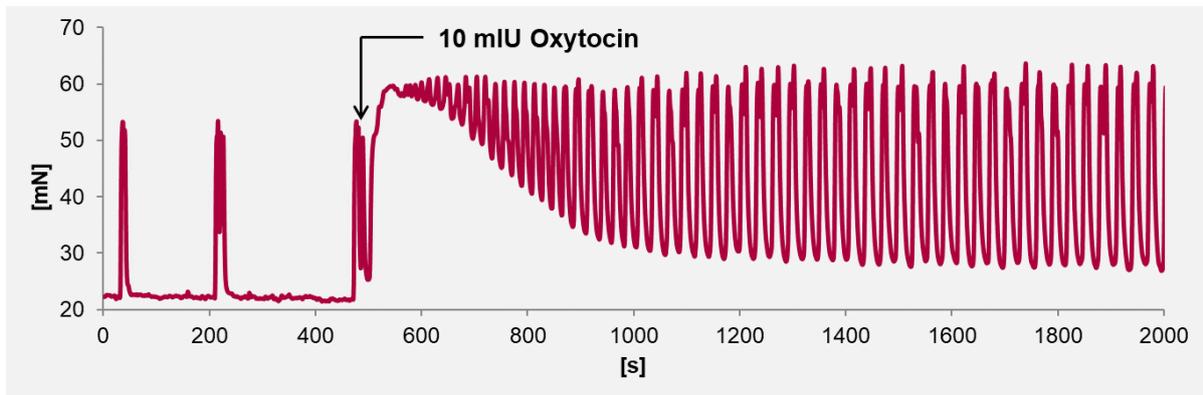


Abbildung 12: Effekte des Oxytocin auf die Spontanaktivität des Uterus

Zur Stabilisierung der Uterusaktivität wurden 10 mU/ml Oxytocin hinzugegeben. Der Zeitpunkt der Zugabe ist mit einem Pfeil markiert.

Circa 50 Minuten nach der Zugabe des Oxytocins erreichte der Grundtonus des Uterus annähernd seinen Ausgangswert. Die Kontraktionsamplitude zeigte unter dem Einfluss des Oxytocins keine Änderungen zur Situation unter Kontrollbedingungen. Die einzige beeinflusste Größe war hier die Kontraktionsfrequenz. Unter Spontanbedingungen zeigte der Uterus zwischen den kräftigen Kontraktionen lange Pausen mit konstantem Basaltonus. Unter dem Einfluss des Oxytocins entfielen diese langen Pausen und es kam zu durchgängigen phasischen Oszillationen des Tonus, wobei die Dauer der Einzelkontraktion nicht beeinflusst wurde. Die Aktivierungskontraktionen durch KCl und ACh zeigen unter dem Einfluss des Oxytocins keinen Unterschied zu den Aktivierungskontraktionen unter Spontanbedingungen.

3.1.4 KOPPLUNGSRESERVE

Zur Objektivierung der Unterschiede der einzelnen Organe in der Zell-Zell-Kopplung wurde der Begriff der Kopplungsreserve eingeführt. Durch den Vergleich der Amplitude unter normaler Ruheaktivität mit der Kontraktionsamplitude nach Stimulation mit KCl kann eine Aussage über den Grad der Kopplung getroffen werden.

Es ist davon auszugehen, dass unter Stimulation mit KCl und die dadurch ausgelöste Depolarisation alle SMC gleichermaßen aktiviert werden, während die Amplitude der Spontanaktivität in Ruhebedingungen abhängig von der Effizienz der Erregungsausbreitung und damit der Kopplung zwischen den Zellen ist. Bei einer starken Kopplung wird die Erregung der Zellen weiter fortgeleitet und demnach mehr angrenzende SMC aktiviert als bei hoher Längskonstante. Je höher der Anteil der parallel kontrahierenden SMC im Präparat, desto größer ist die Kraft einer einzelnen Kontraktion. Setzt man die Kontraktionsamplitude unter KCl-Einfluss in

Bezug zur Kontraktionsamplitude im Rahmen der Spontanaktivität, so ergibt sich die Kopplungsreserve. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede innerhalb der vier untersuchten Organgewebe.

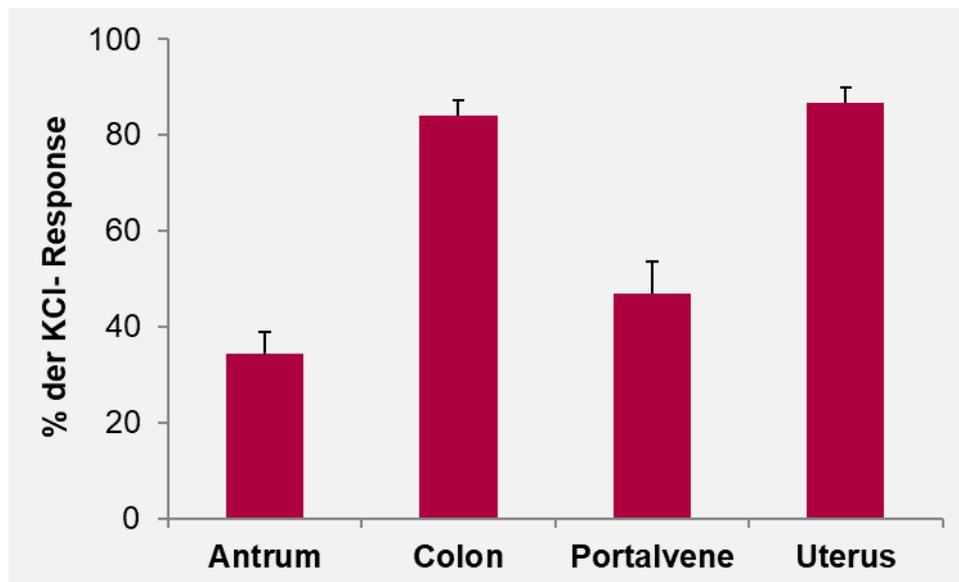


Abbildung 13: Kopplungsreserve der untersuchten Organe

Gezeigt wird das Verhältnis von Kontraktionsamplitude unter Ruhebedingungen zur Kontraktionsamplitude nach exogener Stimulation mit 60 mM KCl angegeben in Prozent. Es zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den Organen (n= 7), Fehlerbalken zeigen SEM.

Während Colon und Uterus $84,06 \pm 3,29 \%$ bzw. $86,63 \pm 3,30\%$ der Kontraktionsamplitude unter exogener Stimulation erreichten, zeigten Antrum und Portalvene nur etwa $34,31 \pm 4,76\%$ bzw. $46,8 \pm 6,77\%$ der Kontraktion. Daraus ergibt sich, dass in der untersuchten Längsrichtung die Zellen in Colon und Uterus stärker miteinander gekoppelt sind als die von Antrum und Portalvene.

Diese Erkenntnis ist wichtig, da so durch die Blockade von Ionenkanälen, die in die Ausbreitung des Schrittmacherpotenzials bzw. der von diesem erzeugten Spike-Kalziumströme über das Gewebe eingebunden sind, in den schlecht gekoppelten Organen eher ein Effekt zu beobachten ist als in den gut gekoppelten Organen und sich so unterschiedliche Effekte erwarten lassen.

3.1.5 EFFEKTE DES POLYAMINS SPERMIN

3.1.5.1 EFFEKTE AUF DIE SPONTANAKTIVITÄT

Das Polyamin Spermin zeigte in allen Geweben eine dosisabhängige Wirkung auf die Spontanaktivität. Die folgende Abbildung stellt am Präparat der Portalvene exemplarisch die Aktivitätsänderungen durch die höchste Konzentration Spermin, die innerhalb der Versuchsreihen zum Einsatz kam, dar. Hier zeigt sich eine Minderung der Amplitude bei augenscheinlich unveränderter Kontraktionsfrequenz.

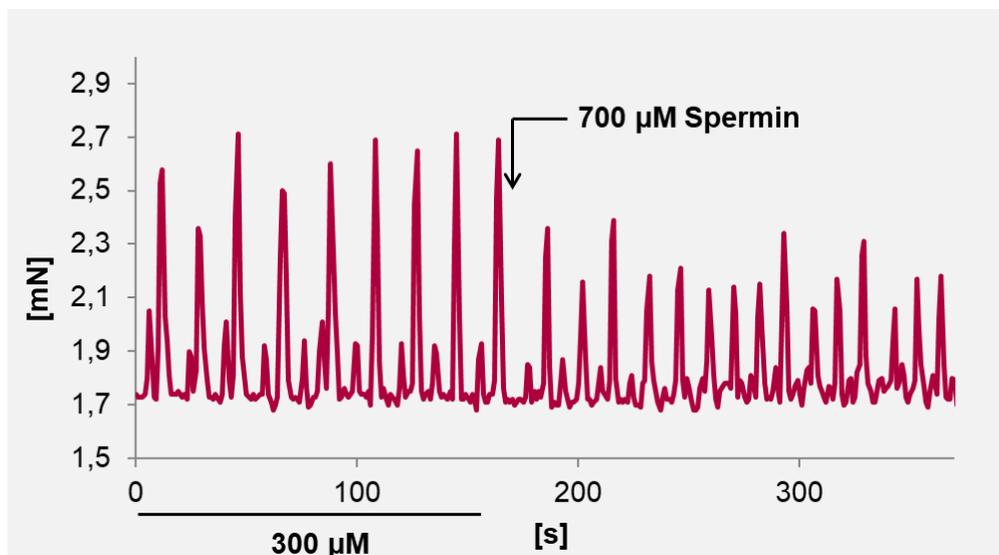


Abbildung 14: Originalregistrierung der Spontanaktivität der Portalvene unter Einfluss der Testsubstanz Spermin

Die Zugabe ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Vorangegangen war bereits die Gabe von 300 µM Spermin.

Eine detaillierte Darstellung der Effekte auf Frequenz, Amplitude, Integral und Kontraktilität der einzelnen Gewebe wird im Folgenden erläutert.

FREQUENZ

Durch die Testsubstanz Spermin wurde die Frequenz der Spontanaktivität in allen untersuchten Organen in unterschiedlichem Ausmaß moduliert. Gemeinsam war allen Organgeweben, dass ein Frequenzeffekt erst ab einer Konzentration von 300 µM Spermin beobachtet werden konnte.

Das Antrum zeigte dabei nur minimale Veränderungen der Frequenz. Noch bei der maximal getesteten Konzentration von 700 µM Spermin kontrahierte dieses mit $90,61 \pm 11,20\%$ und zeigte damit keinen signifikanten Unterschied zur Ausgangsfrequenz.

Dahingegen war der Frequenzeffekt auf das Colon mit einer Absenkung auf $70,24 \pm 11,77\%$ ($p < 0,05$) im Vergleich zur Messung unter Kontrollbedingungen unter Einfluss von $300 \mu\text{M}$ Spermin deutlicher ausgeprägt und nahm bei einer der Dosis von $700 \mu\text{M}$ auf $66,67 \pm 12\%$ ($p < 0,05$) noch weiter zu.

Konträr dazu war die Reaktion der Portalvene auf Zugabe von $300 \mu\text{M}$ Spermin. Wie in Abbildung 14 gezeigt, kam es hier zu einer Erhöhung der Frequenz mit Abnahme der Kontraktionsamplitude. Die Erhöhung der Frequenz betrug im Mittel $132,12 \pm 7,63\%$ ($p < 0,05$) und stellte sich damit signifikant im Vergleich zur Kontrollmessung dar. Dieser Effekt konnte durch $700 \mu\text{M}$ Spermin auf $206,94 \pm 24,13\%$ ($p < 0,01$) gesteigert werden.

Der Uterus reagierte auf die $300 \mu\text{M}$ Spermin bereits bei zwei der sieben im Rahmen der Versuchsreihe verwendeten Präparate mit einem gänzlichen Wegfall der Spontanaktivität, der bei Steigerung der Dosis auch bei weiteren zwei Präparaten zum vollkommenen Funktionsverlust führte. So ergab sich formal eine Frequenzreduktion auf $7,45 \pm 2,85\%$ ($p < 0,05$) im Vergleich zur Messung unter Kontrollbedingungen bei der maximal getesteten Konzentration von $700 \mu\text{M}$ Spermin.

Bereits eine Minute nach Zugabe der Testsubstanz zeigten sich unabhängig von der getesteten Konzentration die ersten Effekte, die innerhalb von 2 Minuten in allen Organen vollständig ausgeprägt waren. Die durch Spermin ausgelösten Effekte auf die Frequenz der Spontanaktivität waren innerhalb von 10 Minuten nach Ausspülen der Testsubstanz reversibel.

AMPLITUDE

Die Amplitude der Spontanaktivität wurde durch Zugabe der Testsubstanz Spermin ab einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ in allen Organen mit unterschiedlicher Intensität vermindert.

Antrum und Uterus zeigten dabei ein sehr ähnliches Verhalten. $100 \mu\text{M}$ Spermin führte an beiden Organpräparaten zu einer signifikanten Reduktion der Amplitude auf $72,37 \pm 7,47\%$ ($p < 0,01$) beim Antrum und $79,86 \pm 5,5\%$ ($p < 0,05$) beim Uterus im Vergleich zur Messung unter Kontrollbedingungen. Auch eine weitere Steigerung der Konzentration der Testsubstanz auf bis zu $700 \mu\text{M}$ führte zu einer zunehmenden Verkleinerung der Kontraktionsamplitude auf $26,0 \pm 5,73\%$ ($p < 0,01$) für das Antrum und $24,74 \pm 12,10\%$ ($p < 0,05$) für den Uterus.

Auch die Amplitude von Colon und Portalvene wurde durch Zugabe von 100 μM Spermin auf $79,40 \pm 6,91\%$ ($p > 0,05$) für das Colon und $70,28 \pm 5,74\%$ ($p < 0,01$) für die Portalvene im Vergleich zur Kontrollmessung moderat reduziert. Durch weitere Dosissteigerung auf 700 μM Spermin konnte eine noch stärker signifikante Reduktion der Amplitude erreicht werden, die mit $40,33 \pm 9,38\%$ ($p < 0,05$) für das Colon und $36,36 \pm 6,00\%$ ($p < 0,01$) für die Portalvene gegenüber dem Ausgangswert weniger stark ausgeprägt war als bei Antrum und Uterus.

Dauer, Anstieg und Abstieg der einzelnen Kontraktionen zeigte sich dabei über den gesamten Konzentrationsbereich der Testsubstanz nahezu unbeeinflusst. Die ersten Effekte auf die Amplitude stellten sich bereits eine Minute nach Zugabe der Testsubstanz ein, während der maximale Wirkeffekt nach zwei Minuten komplett ausgeprägt war. Somit stellten sich keine Unterschiede zur Effektdynamik der Frequenz dar. Allgemein zeigte sich, dass die Ausbildung der ursprünglichen Kontraktionshöhe nach Ausspülen der Testsubstanz länger andauerte als die Ausbildung der Ausgangsfrequenz. Die Dauer betrug bei der Mehrzahl der Präparate 20 Minuten.

INTEGRAL

Den Veränderungen von Frequenz und Amplitude unter dem Einfluss der Testsubstanz Spermin entsprechend, zeigte sich auch eine signifikante dosisabhängige Verkleinerung des Integrals der unterschiedlichen Organgewebe ab einer Konzentration von 100 μM Spermin.

Bei der maximal getesteten Konzentration von 700 μM Spermin stellte sich das Integral von Antrum und Colon mit $32,14 \pm 6,72\%$ ($p < 0,01$) und $45,99 \pm 8,50\%$ ($p < 0,05$) deutlich reduziert dar. Die Portalvene zeigte nach einer signifikanten Abnahme des Integrals auf $59,78 \pm 4,59\%$ ($p < 0,01$) bei Zugabe von 300 μM allerdings eine erneute Steigerung des Integrals auf bis zu $71,00 \pm 10,70\%$ ($p < 0,05$) bei Erhöhung der Dosis auf 700 μM Spermin.

Entsprechend dem Aktivitätsverlust von vier der sieben Uteruspräparate nach Zugabe von 700 μM kam es hier zu einer deutlichen Reduktion des Integrals auf $8,08 \pm 3,35\%$ ($p < 0,05$) im Vergleich zur Messung unter Kontrollbedingungen.

Der Grundtonus der Organpräparate blieb in allen getesteten Konzentrationsbereichen der Testsubstanz Spermin aber unbeeinflusst.

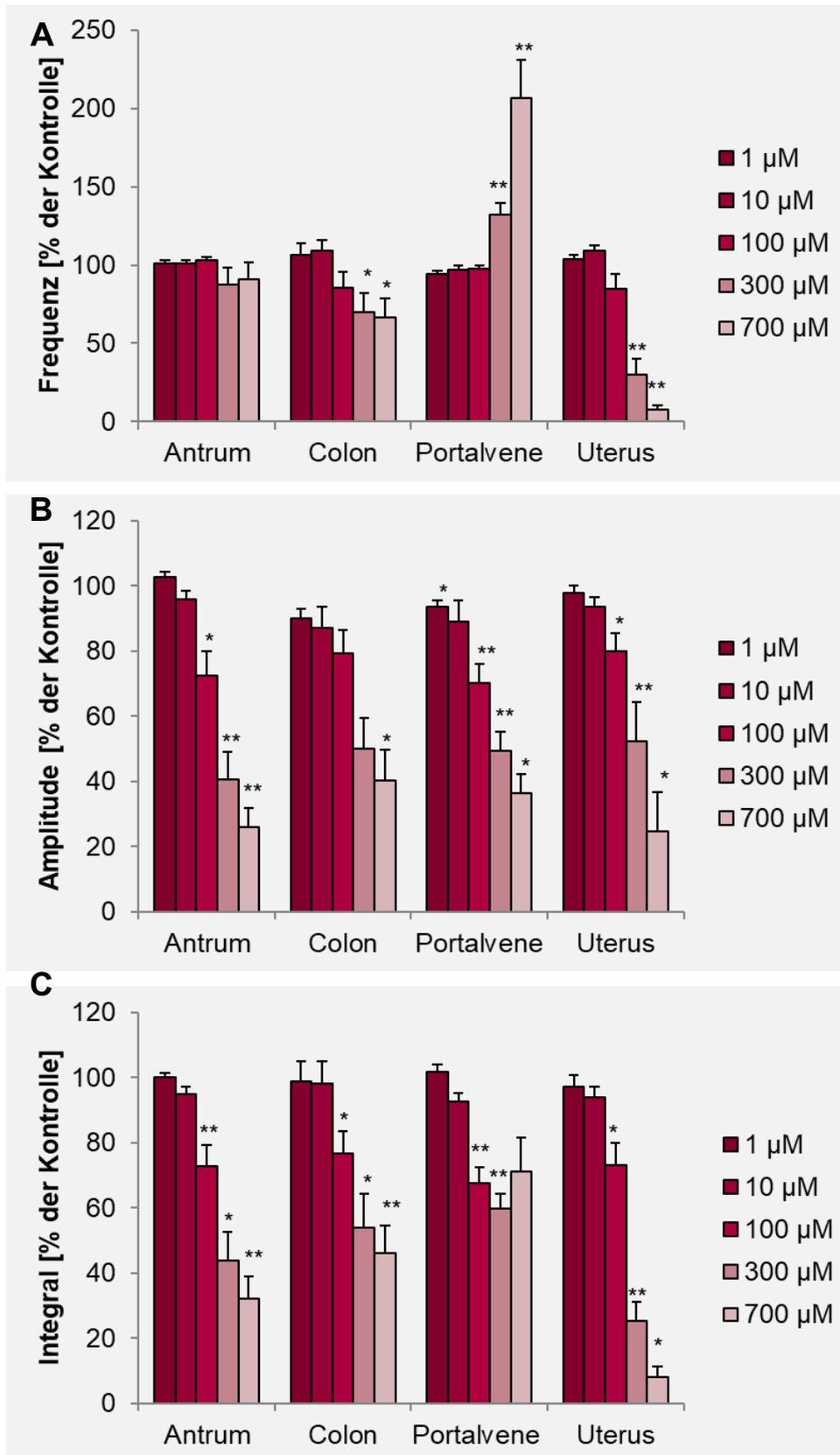


Abbildung 15: Statistische Darstellung der Effekte von Spermin

Frequenz (A), Amplitude (B) und Integral (C) der Spontanaktivität angegeben in Prozent im Vergleich zur Messung unter Kontrollbedingungen ohne pharmakologische Beeinflussung.

Antrum (n= 8), Colon (n= 7), Portalvene (n= 9) und Uterus (n= 7)

Fehlerbalken zeigen SEM, *p <0,05, **p <0,01 bezogen auf den Wert unter Kontrollbedingungen

3.1.5.2 EFFEKTE AUF DIE KONTRAKTILITÄT

Die durch KCl-induzierte Aktivierungskontraktion wurde unter dem Einfluss von 700 μ M Spermin in allen Organpräparaten nicht wesentlich verändert.

Die Kontraktionsamplitude blieb bei Antrum und Colon nahezu unverändert und betrug auch unter Einfluss von Spermin noch $92,38 \pm 10,51\%$ ($p > 0,05$) und $89,23 \pm 2,10\%$ ($p > 0,05$) im Vergleich zur Kontrollmessung. Eine moderate Reduzierung der Amplitude konnte bei Portalvene und Uterus beobachtet werden. Sie minimierte sich auf $77,87 \pm 4,28\%$ ($p < 0,05$) und $76,87 \pm 5,03\%$ ($p > 0,05$).

In allen Organpräparaten zeigte sich eine deutliche Verlängerung der Zeit bis zum Erreichen der maximalen Kontraktionshöhe. Diese erhöhte sich am Präparat des Antrums signifikant auf $223,78 \pm 9,54\%$ ($p > 0,05$) und verdoppelte sich damit im Vergleich zur Kontrollmessung. Das Colonpräparat benötigte sogar das dreifache an Zeit, um das Maximum der Kontraktion zu erreichen ($299,68 \pm 45,69\%$; $p > 0,05$). Während sich bei der Portalvene eine signifikante Zunahme der Zeit auf $1223,67 \pm 267,92\%$ ($p < 0,05$) verzeichnen ließ, zeigte der Uterus mit einer Verlängerung der Zeit auf $137,55 \pm 10,13\%$ ($p > 0,05$) im Vergleich zur Kontrollmessung eine verhältnismäßig geringe Veränderung.

Auch das 1,5-Minutenintegral der Aktivierungskontraktion stellte sich entsprechend der Veränderung des Maximums und der Zeit bis zum Erreichen dieses Punktes unter dem Einfluss von Spermin nur geringfügig verändert dar. Bei Antrum, Portalvene und Uterus war diese Veränderung mit einer Verkleinerung des Integrals auf $77,03 \pm 5,52\%$ ($p > 0,05$), $79,78 \pm 4,75\%$ ($p < 0,05$) und $73,30 \pm 5,44\%$ ($p > 0,05$) eher moderat ausgeprägt, während das Colon mit einer Erhöhung auf $107,70 \pm 4,04\%$ ($p > 0,05$) im Vergleich zur Kontrollmessung eine Veränderung in umgekehrter Weise zeigte. Nach Ausspülen des KCl erreichten alle Präparate innerhalb weniger Minuten ihren Grundtonus zurück.

Die durch 1 μ M ACh ausgelöste Kontraktion wurde durch Spermin ebenso beeinflusst wie die zuvor dargestellte KCl Kontraktion. Alle Organpräparate wiesen eine Minderung der Kontraktionsamplitude unter Einfluss von 700 μ M Spermin im Vergleich zur Kontraktion unter Kontrollbedingungen auf: Antrum: $68,81 \pm 6,89\%$ ($p < 0,05$), Colon: $97,19 \pm 7,55\%$ ($p > 0,05$), Portalvene: $82,54 \pm 6,38\%$ ($p < 0,01$), Uterus: $73,64 \pm 7,11\%$ ($p < 0,01$).

Auch die Zeit bis zum Erreichen des Maximums wurde durch Spermin signifikant verlängert. So zeigte sich bei Antrum und Uterus eine Verdreifachung der Zeit im Vergleich zur Kontrollmessung (Antrum: $322,02 \pm 60,71\%$, $p < 0,05$; Uterus: $301,96 \pm 74,02\%$, $p < 0,05$). Bei Colon und Portalvene kam es zu einer Erhöhung auf $164,54 \pm 14,63\%$ ($p < 0,01$) und $175,68 \pm 17,13\%$ ($p < 0,01$) gegenüber der Kontrollmessung.

Passend dazu zeigte sich auch eine signifikante Verkleinerung des Integrals bei Antrum und Uterus mit $75,22 \pm 5,48\%$ ($p < 0,05$) und $60,03 \pm 6,01\%$ ($p < 0,05$) im Vergleich zur Messung unter Kontrollbedingungen. Das Integral von Colon und Portalvene veränderte sich jedoch nur geringfügig auf $92,17 \pm 9,0\%$ ($p > 0,05$) und $82,18 \pm 6,84\%$ ($p < 0,05$).

Auch nach Ausspülen des ACh erlangen alle Organe ihren Grundtonus zurück.

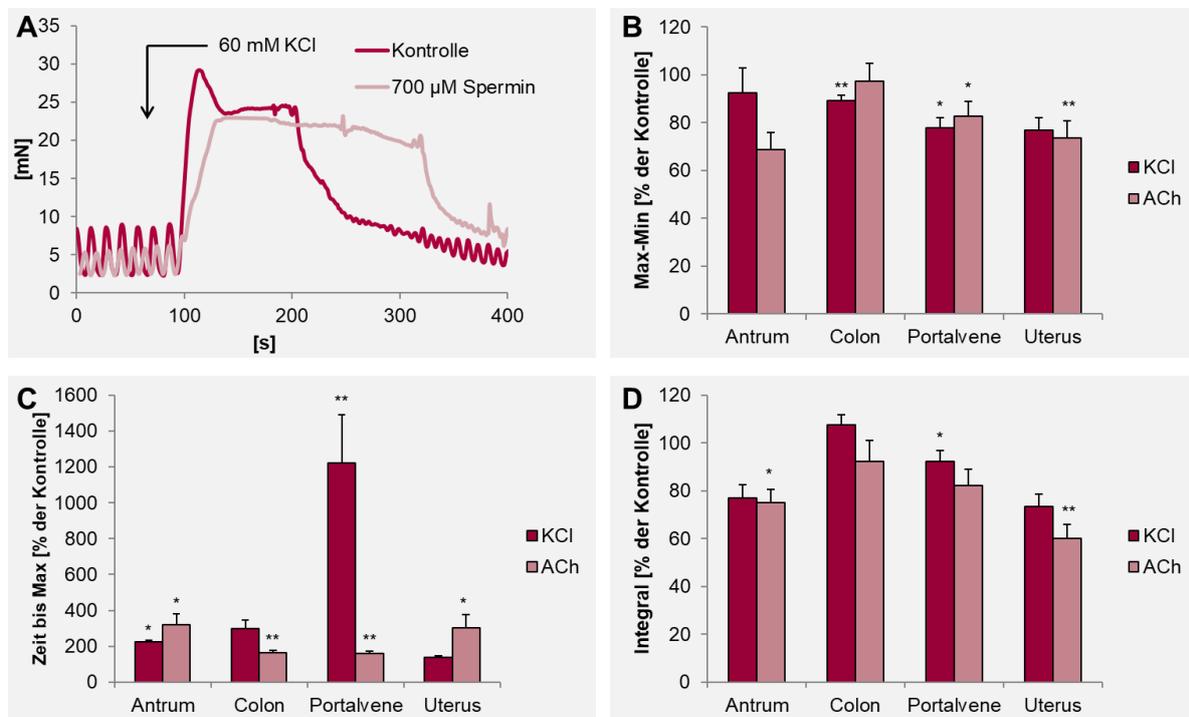


Abbildung 16: Effekte von Spermin auf die Kontraktibilität der Organe

(A) Exemplarischer Verlauf der durch KCl-induzierten Kontraktionsantwort vor und nach Zugabe des Spermin. Der Zeitpunkt der Zugabe ist mit einem Pfeil markiert. (B) Veränderung der Kontraktionsamplitude. (C) Veränderung der Zeit bis zum Erreichen des Maximums. (D) Veränderung des Integrals.

Antrum (KCl: $n = 4$, ACh: $n = 7$), Colon (KCl: $n = 4$, ACh: $n = 9$), Portalvene (KCl: $n = 7$, ACh: $n = 12$) und Uterus (KCl: $n = 4$, ACh: $n = 6$). Fehlerbalken zeigen SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ bezogen auf den Wert unter Kontrollbedingungen.

Abbildung 16 A zeigt exemplarisch die Veränderung der KCl-induzierten Kontraktionsantwort unter dem Einfluss von $700 \mu\text{M}$ Spermin im Vergleich zur Messung ohne pharmakologische Beeinflussung. Unter Einfluss des Spermin erreicht die Kontraktion das unter Kontrollbedingungen gezeigten Maximums nicht. Auch die Zeit bis zum Erreichen dieses Maximums ist

verlängert, d.h. der Anstieg ist flacher. Unter Kontrollbedingungen zeigt sich der Verlauf der Kontraktionsantwort mit einem steilen Anstieg und einem sich daran anschließenden kleinen Abfall, bevor die Kontraktion in die Plateauphase übergeht. Diese biphasische Kontraktionsantwort war unter Einfluss der Testsubstanz nicht mehr zu beobachten. Der initiale Anstieg entfällt, die Kontraktion geht also sofort in die Plateauphase über. Die Höhe der Plateauphase unterscheidet sich nur minimal zwischen der Messung unter Kontrollbedingungen und unter dem Einfluss des Spermin. Der Wegfall dieser ersten Kontraktionsphase konnte bei allen Präparaten und allen Geweben gleichermaßen beobachtet werden.

3.1.6 EFFEKTE DES IONISIERTEN LANTHANS

Das ionisierte Lanthan zeigte in allen Geweben einen dosisabhängigen Einfluss auf die Spontanaktivität. Die folgende Abbildung stellt exemplarisch die Aktivitätsänderungen durch 100 μM Lanthan am Präparat des Uterus dar, wo sich ein ausgeprägter Effekt auf die Amplitude der Aktivität zeigte, dagegen die Kontraktionsfrequenz des Präparates kaum verändert wurde.

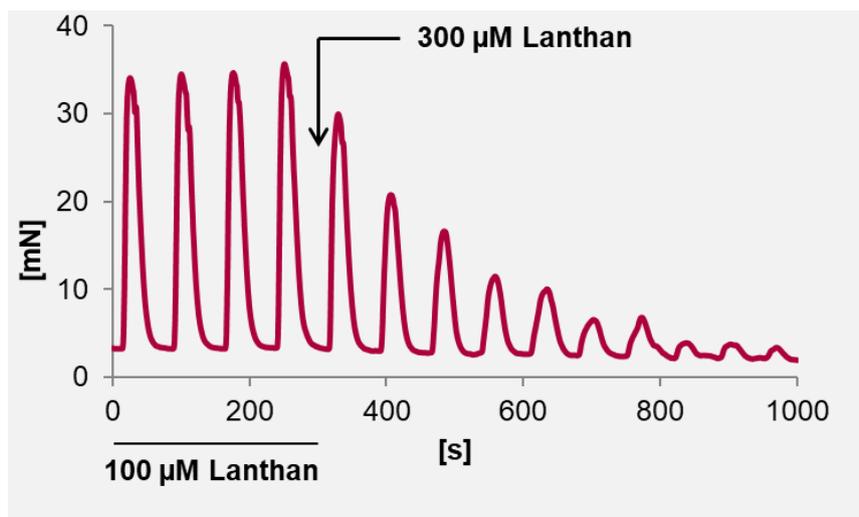


Abbildung 17: Originalregistrierung der Spontanaktivität des Uterus unter Einfluss der Testsubstanz Lanthan. Die Zugabe ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Vorgegangen ist zunächst die Gabe von 100 μM Lanthan.

Eine detaillierte Darstellung der Effekte auf Frequenz, Amplitude, Integral und Kontraktilität der einzelnen Gewebe wird im Folgenden erläutert.

3.1.6.1 EFFEKTE AUF DIE SPONTANAKTIVITÄT

FREQUENZ

Die Effekte des Lanthans auf die Aktivität der einzelnen Präparate waren sehr unterschiedlich ausgeprägt.

Das Magenantrum zeigte nach Zugabe der Testsubstanz bis 300 μM eine signifikante Frequenzerhöhung auf $179,47 \pm 32,61\%$ ($p < 0,05$). Eine Steigerung der Dosis auf 500 μM führte zu einem kompletten Aktivitätsverlust in fünf der neun Präparate, während die noch aktiven Präparate weiterhin mit erhöhter Frequenz kontrahierten ($123,70 \pm 46,59\%$, $p > 0,05$). Aus diesem Grund ergibt sich hier ein hoher Standardfehler.

Colon und Uterus reagierten auf Lanthan (bis 100 μM) mit einer Abnahme der Frequenz auf $68,33 \pm 14,47\%$ ($p > 0,05$) und $53,57 \pm 12,96\%$ ($p < 0,05$), während eine weitere Dosissteigerung zum Aktivitätswegfall in allen Präparaten des Colons führte ($p < 0,05$). Von den sieben Uteruspräparaten blieb lediglich eines über den kompletten Konzentrationsbereich aktiv.

Die Portalvene blieb hinsichtlich ihrer Frequenz nach Addition des Lanthans bis zu einer Konzentration von 100 μM nahezu unbeeinflusst. Erst bei erneuter Dosiserhöhung auf 300 μM kam es zu einer Frequenzsteigerung in vier der acht Präparate und einem kompletten Wegfall der Aktivität in den restlichen Präparaten, sodass sich im Mittel eine nicht signifikante Frequenzsteigerung auf $151,02 \pm 79,61\%$ ($p > 0,05$) ergab. Die noch aktiven Präparate zeigten bei weiterer Dosissteigerung eine gleichbleibende Frequenz.

Der maximale Wirkeffekt des Lanthans trat unabhängig von der Konzentration und dem Organpräparat nach 2 Minuten ein und war auch durch Auswaschen innerhalb von 60 Minuten nicht reversibel.

AMPLITUDE

Lanthan führte in allen Organpräparaten zu einer dosisabhängigen Amplitudenabnahme unterschiedlicher Ausprägung.

Im Magenantrum konnte bis zu einer Konzentration von 300 μM eine signifikante Reduktion der Kraft auf $41,71 \pm 9,31\%$ ($p < 0,05$) beobachtet werden. Wie bereits beschrieben, führte eine

weitere Dosissteigerung auf 500 μM Lanthan in einer Mehrzahl der Präparate zum Ausfall der Aktivität. Die Amplitude der noch aktiven Präparate verkleinerte sich weiter, sodass sich ein durchschnittlicher Wert von $17,11 \pm 8,14\%$ ($p < 0,05$) ergab.

Auch in Colon und Uterus war eine dosisabhängige Minimierung der Amplitude auf $40,11 \pm 11,65\%$ ($p < 0,05$) beim Colon und $61,48 \pm 14,79\%$ ($p > 0,05$) beim Uterus bei Testung von 100 μM Lanthan zu beobachten. Eine weitere Steigerung der Testdosis ließ in allen Präparaten von Colon und in zehn von elf Präparaten des Uterus einen vollkommenen Verlust der Spontanaktivität verzeichnen (Colon: $p < 0,05$; Uterus: $p < 0,05$) (vgl. Abb. 18).

Die Portalvene zeigte bereits in etwas geringeren Dosisbereichen eine deutliche Dämpfung der Amplitude. Bei 100 μM Lanthan hatte sich die Höhe der Kontraktion bereits auf $32,41 \pm 8,61\%$ ($p < 0,01$) verringert, während die weitere Steigerung den Wegfall der Aktivität in einigen Präparaten bedingte und in den anderen Präparaten zur weiteren Amplitudenverringerng auf im Mittel $9,52 \pm 3,60\%$ ($p < 0,01$) bei der maximal getesteten Dosis von 500 μM Lanthan führte.

Eine Änderung des Kontraktionsverhaltens hinsichtlich Dauer der Kontraktion, Anstiegs- und Abfallssteilheit konnte unter Einfluss von Lanthan nicht beobachtet werden. Auch das zeitliche Einsetzen des Lanthaneffekts auf die Amplitude unterschied sich nicht von dem Einsetzen des Effektes auf die Frequenz. Wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, zeigte der Effekt des Lanthans keine Reversibilität.

INTEGRAL

Entsprechend der Reduktion der Amplitude stellt sich auch das Integral als dosisabhängig reduzierte Größe dar.

Die maximale Konzentration (500 μM) Lanthan verringert das Integral des Magenantrums auf $18,80 \pm 7,26\%$ ($p < 0,01$). Auch die Portalvene zeigte bei dieser Dosis eine signifikante Verkleinerung des Integrals auf $17,40 \pm 9,01\%$ ($p < 0,01$).

Da es in Colon und Uterus in diesem Konzentrationsbereich zum gänzlichen Wegfall der Aktivität kam, ergibt sich hier formal ein Integral von 0 (Colon: $p < 0,05$; Uterus: $p < 0,05$).

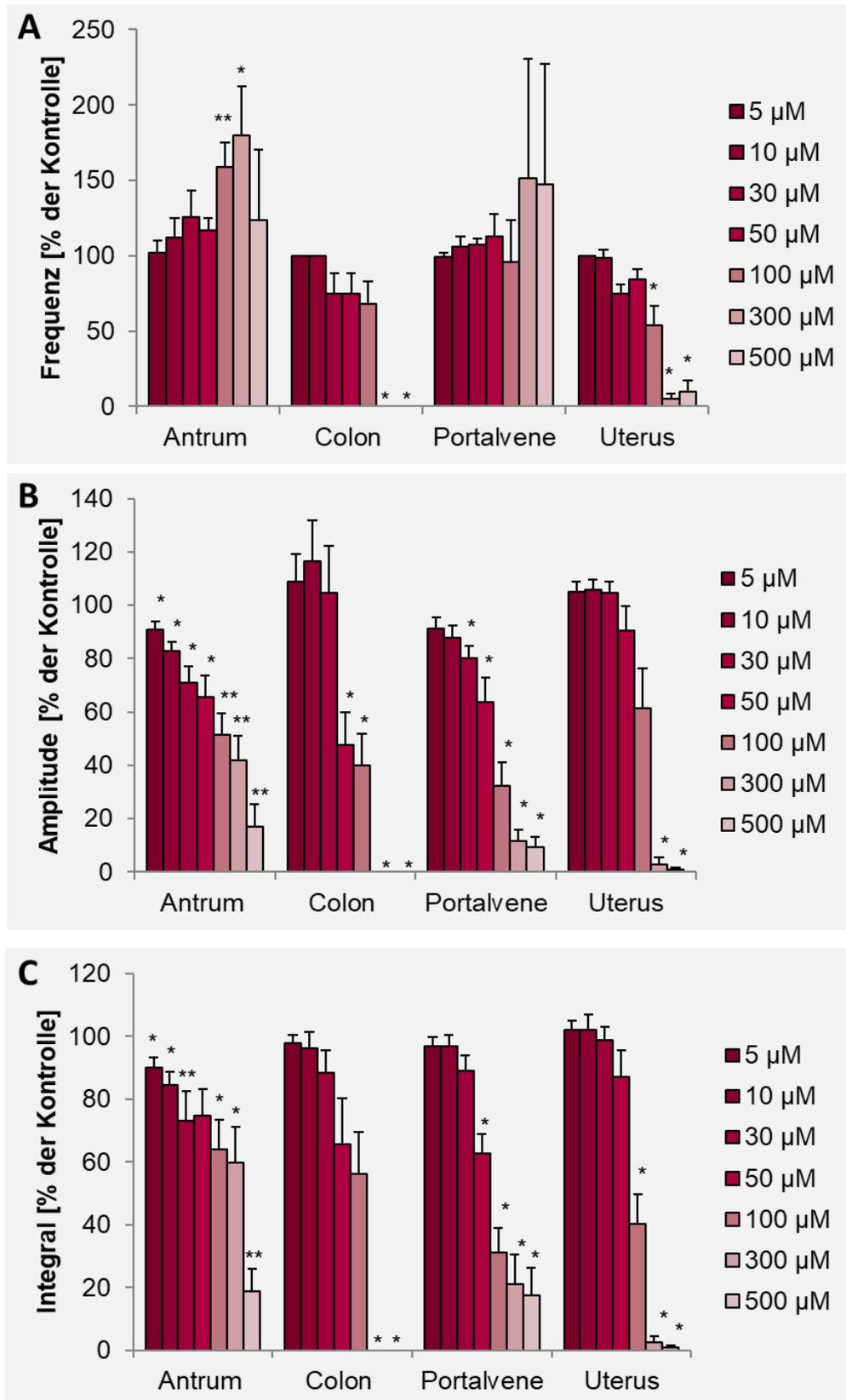


Abbildung 18: Statistische Darstellung der Effekte von Lanthan

auf die Frequenz (A), Amplitude (B) und Integral (C) der Spontanaktivität angegeben in Prozent im Vergleich zur Messung unter Kontrollbedingungen ohne pharmakologische Beeinflussung.

Antrum (n= 9), Colon (n= 5), Portalvene (n= 8) und Uterus (n= 7). Fehlerbalken zeigen SEM, *p <0,05, **p <0,01 bezogen auf den Wert unter Kontrollbedingungen.

3.1.6.2 EFFEKTE AUF DIE KONTRAKTILITÄT

Die depolarisationsinduzierte Kontraktion, die durch 60 mM KCl ausgelöst wurde, zeigte hinsichtlich ihrer Dynamik Veränderungen in allen Organen.

Die Kontraktionsamplitude in Antrum und Colon wurde mäßig gedämpft. So erreichte sie im Antrum $72,59 \pm 7,63\%$ ($p < 0,05$) und im Colon $55,30 \pm 3,44\%$ ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrollmessung ohne pharmakologische Beeinflussung.

In Portalvene und Uterus ergaben sich wesentlich stärkere Effekte auf die Kontraktionshöhe. Unter Einfluss von Lanthan erreichte die Portalvene nur $21,08 \pm 5,09\%$ ($p < 0,01$) und der Uterus $10,21 \pm 2,12\%$ ($p < 0,05$) verglichen zur Ausgangskontraktion.

Die Zeit bis zum Erreichen dieses Maximums zeigte sich in allen Präparaten deutlich verlängert: Antrum $1942,68 \pm 465,55\%$ ($p < 0,01$), Colon $814,44 \pm 154,72\%$ ($p < 0,05$), Portalvene $1645,2 \pm 408,58\%$ ($p < 0,01$), Uterus $321,67 \pm 703,60\%$ ($p < 0,05$).

Die durch ACh-induzierte Kontraktion konnte unter Lanthaneinfluss in allen untersuchten Organpräparaten nicht mehr ausgelöst werden, wie Abbildung 19 A exemplarisch darstellt. So ergeben sich hier für Mittelwert und Standardfehler jeweils ein Wert von 0 (Antrum: $p < 0,05$, Portalvene: $p < 0,05$, Colon: $p < 0,05$, Uterus: $p < 0,05$).

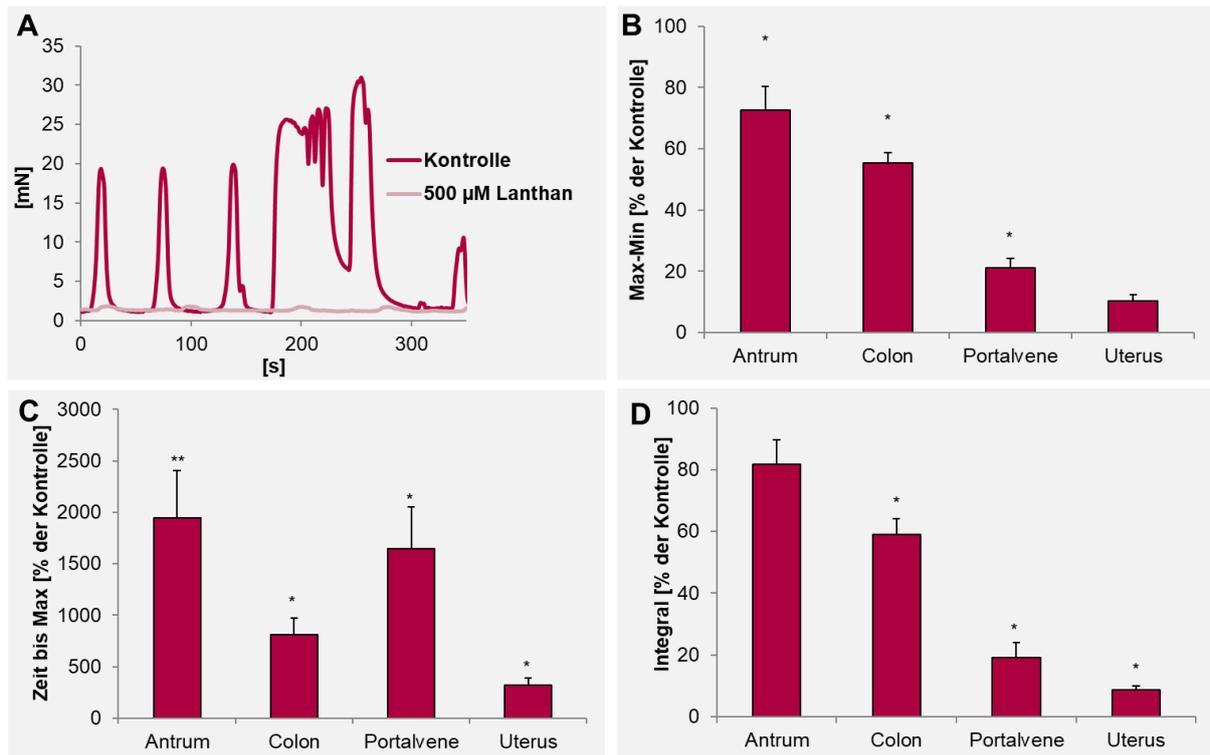


Abbildung 19: Effekte von Lanthan auf die Kontraktibilität der Organe

(A) Exemplarischer Verlauf der durch ACh-induzierten Kontraktionsantwort des Colons vor und nach Zugabe des Lanthan. Der Zeitpunkt der Zugabe ist mit einem Pfeil markiert. (B) Veränderung der Kontraktionsamplitude, (C) Veränderung der Zeit bis zum Erreichen des Maximums, (D) Veränderung des Integrals.

Antrum (KCl: n= 9, ACh: n= 7), Colon (KCl: n= 6, ACh: n= 5), Portalvene (KCl: n= 8, ACh: n= 5) und Uterus (KCl: n= 7, ACh: n= 6). Fehlerbalken zeigen SEM, *p <0,05, **p <0,01 bezogen auf den Wert unter Kontrollbedingungen.

3.1.7 EFFEKTE DURCH FLUFENAMINSÄURE

3.1.7.1 EFFEKTE AUF DIE SPONTANAKTIVITÄT

Durch Zugabe der Testsubstanz FFA zeigten sich in den unterschiedlichen Organpräparaten dosisabhängige Veränderungen von Frequenz, Amplitude und Integral. Die folgende Abbildung 20 stellt diese Effekte exemplarisch anhand einer Originalregistrierung des Colons bei einer Dosis von 50 µM FFA dar. Hier lässt sich eine deutliche Verkleinerung der Amplitude der "giant contractions" sowie angedeutet eine Frequenzverlangsamung erkennen.

Nachfolgend sollen daher die Veränderungen der Organpräparate nach Frequenz, Amplitude, Integral und Kontraktibilität im Einzelnen dargestellt werden.

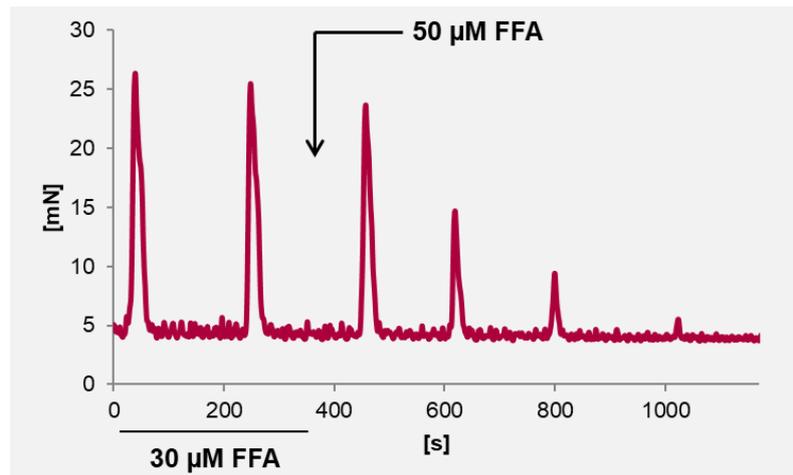


Abbildung 20: Originalregistrierung der Spontanaktivität des Colons unter Einfluss der Testsubstanz FFA (50 µM).

Die Zugabe ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Vorangegangen ist die Gabe von 30 µM FFA.

FREQUENZ

Die Testsubstanz FFA führte ab einer Konzentration von 5 – 10 µM zu ausgeprägten Effekten auf die Frequenz der Spontanaktivität der einzelnen Organgewebe.

Insbesondere das Antrum reagierte sehr sensitiv auf FFA. Bereits 5 µM der Testsubstanz führte zu einer Reduktion der Frequenz auf $56,27 \pm 13,84\%$ ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrollmessung. So zeigten sich ein vollkommener Wegfall der Aktivität bei zwei der sechs Präparate und eine leichte Frequenzsenkung der noch aktiven Präparate. Durch eine Erhöhung der Dosis bis auf 50 µM kam es zu einer weiteren signifikanten Frequenzreduktion auf $17,59 \pm 8,23\%$ ($p < 0,05$) verglichen zur Kontrolle und einem Aktivitätsverlust von vier der noch verbliebenen sechs Präparate. Die noch aktiven Präparate zeigten eine deutliche Verminderung der Frequenz.

Colon und Uterus reagierten erst ab einer Konzentration von 10 µM FFA mit einer Veränderung der Frequenz. Das Colon reduzierte seine Kontraktionsfrequenz auf $72,59 \pm 5,65\%$ ($p < 0,05$), der Uterus auf $79,17 \pm 9,36\%$ ($p > 0,05$). Eine weitere Steigerung der Testkonzentration auf 30 µM FFA ließ zwei der sechs Colonpräparate ihre Aktivität verlieren, während die Uteruspräparate durchweg aktiv blieben. Die maximal getestete Konzentration von 50 µM FFA führte schließlich in beiden Organgeweben zu einem Ausfall von vier der sechs Präparate und einer Reduktion der Frequenz in den noch aktiven Präparaten, sodass sich im Mittel eine Minderung auf $15,74 \pm 8,23\%$ ($p < 0,05$) im Colon und $21,11 \pm 9,88\%$ ($p < 0,05$) im Uterus verglichen zur Kontrollmessung feststellen ließ.

Die Portalvene reagierte auch ab einer Konzentration von 10 μM FFA mit einer signifikanten Abnahme der Kontraktionsfrequenz auf $83,14 \pm 3,42\%$ ($p < 0,05$). Bei weiterer Steigerung der Dosis auf 30 μM FFA kam es bei der Hälfte der Präparate zum Aktivitätsverlust, sodass sich eine im Vergleich zur Kontrollmessung auf $30,46 \pm 11,56\%$ ($p < 0,05$) reduzierte Frequenz ergab. Bei der Höchstdosis (50 μM FFA) kam es schließlich in allen getesteten Präparaten zu einem kompletten Funktionsverlust ($p < 0,01$).

Der maximale Effekt auf die Frequenz setzte unabhängig von der getesteten Konzentration etwa 2 Minuten nach Gabe des FFA ein. Nach dem Ausspülen der Testsubstanz konnte innerhalb von 35 Minuten wieder eine stabile Spontanaktivität mit gleicher Frequenz wie zu Beginn der Experimente gemessen werden.

AMPLITUDE

Auch die Amplitude der Spontanaktivität wird durch FFA dosisabhängig mit Unterschieden innerhalb der einzelnen Organgewebe moduliert.

Ähnlich wie bei der Frequenz weist auch die Amplitude der Spontanaktivität des Antrums eine deutliche Reduktion ab einer Konzentration von 5 μM FFA auf. Durch den bereits beschriebenen Wegfall der Aktivität einiger Präparate lässt sich eine Amplitudenverkleinerung auf $52,61 \pm 14,80\%$ ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrollmessung feststellen, die sich bei weiterer Dosissteigerung auf 50 μM noch weiter auf $4,80 \pm 2,48\%$ ($p < 0,05$) reduzieren lässt.

Colon und Uterus zeigen erst ab einer Konzentration von 30 μM FFA eine klare Minderung der Amplitude, die beim Uterus weniger stark ausgeprägt ist als beim Colon. So ergibt sich beim Colon eine Reduktion auf $47,96 \pm 11,95\%$ ($p < 0,05$) und beim Uterus auf $86,69 \pm 4,49\%$ ($p < 0,05$), wobei zu berücksichtigen ist, dass bereits zwei der sechs Colonpräparate in ihrer Aktivität ausfielen. Bei weiterer Steigerung der Testkonzentration auf 50 μM FFA fielen schließlich in beiden Gewebeentitäten vier der sechs Gewebe aus, sodass sich hier formal eine signifikante Amplitudenreduktion auf $16,50 \pm 8,58\%$ ($p < 0,05$) beim Colon und $22,94 \pm 11,13\%$ ($p < 0,05$) beim Uterus im Vergleich zur Kontrollmessung ergab.

Bereits bei Zugabe von 0,5 μM FFA reduzierte sich die Amplitude der Portalvene signifikant auf $84,35 \pm 4,78\%$ ($p < 0,05$) und verkleinerte sich bei weiterer Steigerung der Konzentration dosisabhängig. 30 μM FFA führte schließlich bei der Hälfte der Präparate der Portalvene zu

einem vollkommenen Aktivitätsverlust, der dann bei Testung der maximalen Konzentration (50 μM) in allen getesteten Präparaten zum Funktionsverlust führte ($p < 0,01$).

Der maximale Wirkeffekt auf die Amplitude konnte in den Organen etwa 2 Minuten nach Substanzgabe beobachtet werden und unterschied sich damit nicht von der Effektdynamik der Frequenz. Auch die Ausgangsamplitude konnte 40 Minuten nach Ausspülen des Pharmakons wieder erreicht werden. Somit nahm dies unwesentlich mehr Zeit ein als die Rückbildung der Frequenz. Das Erscheinungsbild der einzelnen Kontraktionen (Anstieg, Dauer und Abstieg) wurde durch FFA nicht beeinflusst.

INTEGRAL

Auch das Integral veränderte sich korrespondierend zu den Frequenz- und Amplitudenveränderungen dosisabhängig.

Nach Zugabe von 5 μM FFA war an Antrumpräparaten eine deutliche Verkleinerung des Kraftintegrals auf $40,30 \pm 11,44\%$ ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrollmessung zu beobachten. Durch Steigerung der Konzentration auf 50 μM FFA wurde dieses weiter auf $3,00 \pm 1,45\%$ ($p < 0,05$) gesenkt.

Colon und Uterus zeigten ebenso eine deutliche Verkleinerung des Integrals, welche beim Colon schon ab einer Konzentration der Testsubstanz von 5 μM auf $79,32 \pm 2,71\%$ ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrollmessung reduziert wurde, während sich beim Uterus erst ab einer Konzentration von 10 μM eine Minimierung auf $79,39 \pm 7,02\%$ ($p < 0,05$) zeigte. Die maximale Testkonzentration (50 μM FFA) sorgte schließlich in beiden Organgeweben für eine signifikante Minimierung des Integrals auf $10,33 \pm 5,60\%$ ($p < 0,05$) beim Colon und $8,14 \pm 5,20\%$ ($p < 0,05$) beim Uterus.

Die Veränderungen des Integrals der Portalvene entsprachen der Minimierung der Amplitude. Bereits 0,5 μM FFA bedingten eine signifikante Reduktion des Integrals auf $75,30 \pm 5,22\%$ ($p < 0,01$) im Vergleich zur Kontrollmessung. Auch hier stellte sich eine dosisabhängige Verminderung des Kraftintegrals ein, die schließlich durch den Verlust der Spontanaktivität bei 50 μM formal zu einem Wert von 0 führte ($p < 0,001$).

Ein Effekt auf den Grundtonus von Antrum, Colon, Portalvene und Uterus konnte auch bei Zugabe höherer Dosen FFA nicht beobachtet werden.

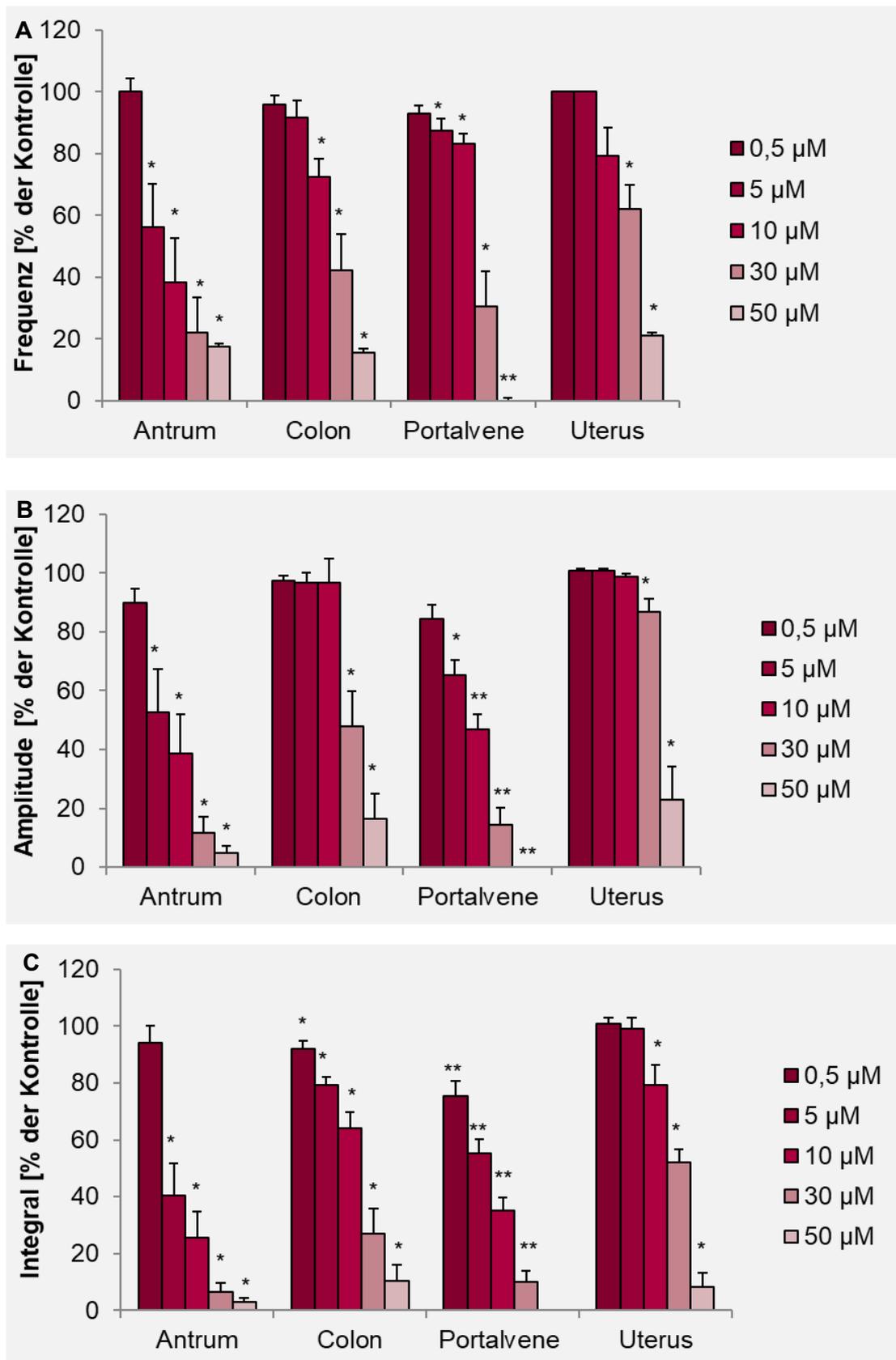


Abbildung 21: Statistische Darstellung der Effekte von FFA

auf die Frequenz (A), Amplitude (B) und Integral (C) der Spontanaktivität angegeben in Prozent im Vergleich zur Messung unter Kontrollbedingungen ohne pharmakologische Beeinflussung.

Antrum (n= 6), Colon (n= 6), Portalvene (n= 9) und Uterus (n= 6).

Fehlerbalken zeigen SEM, *p <0,05, **p <0,01 bezogen auf den Wert unter Kontrollbedingungen.

3.1.7.2 EFFEKTE AUF DIE KONTRAKTILITÄT

Auch die exogene Aktivierbarkeit der Organe zeigt sich durch die Testsubstanz beeinflusst, jedoch abhängig vom Organ in unterschiedlicher Ausprägung.

Die durch KCl-induzierte Kontraktion zeigte sich im Antrum und Colon hinsichtlich ihrer Amplitude mäßig gedämpft auf $68,77 \pm 9,67\%$ ($p < 0,05$) und $61,34 \pm 6,95\%$ ($p < 0,05$), während der Effekt im Uterus etwas stärker ausgeprägt war mit einer Minimierung der Kontraktionsamplitude auf $56,03 \pm 6,21\%$ ($p < 0,01$). Die stärkste Wirkung des FFA zeigt sich am Präparat der Portalvene, dessen Kontraktionsamplitude signifikant auf $19,10 \pm 5,57\%$ ($p < 0,05$) gesenkt wurde.

Die Zeit bis zum Erreichen dieses Maximums war im Antrum und Colon erhöht auf $202,15 \pm 52,46\%$ ($p > 0,05$) und $130,86 \pm 12,78\%$ ($p < 0,05$), während sich bei der Portalvene eine signifikante Verlängerung der Zeit bis zum Maximum auf $2070,19 \pm 422,73\%$ ($p < 0,05$) einstellte. Der Uterus hingegen benötigte im Mittel bis zum Erreichen des Maximums die gleiche Zeit wie unter Kontrollbedingungen $92,15 \pm 6,05\%$.

Entsprechend der zuvor erläuterten Veränderungen der KCl-induzierten Kontraktion durch FFA stellte sich auch das Integral verändert dar: Antrum: $61,22 \pm 8,84\%$ ($p < 0,05$), Colon: $64,11 \pm 7,00\%$ ($p < 0,05$), Portalvene: $18,28 \pm 3,64\%$ ($p < 0,05$), Uterus: $45,31 \pm 5,53\%$ ($p < 0,01$).

Die Amplitude der ACh-induzierten Kontraktionsantwort stellte sich im Antrum mit $44,48 \pm 7,15\%$ ($p < 0,01$) und im Colon mit $69,52 \pm 8,74\%$ ($p < 0,05$) als reduziert im Vergleich zu Kontrollmessung dar. Deutlich stärker war die Dämpfung der Amplitude in der Portalvene mit einer signifikanten Verkleinerung auf $26,38 \pm 3,56\%$ ($p < 0,01$). Hingegen wurde die Höhe der ACh-induzierten Kontraktion des Uterus mit einer Minimierung auf $91,83 \pm 2,40\%$ ($p > 0,05$) durch FFA kaum beeinflusst.

Einer Verlängerung der Zeit bis zum Erreichen des maximalen Kontraktionspunktes zeigte sich bei der ACh-induzierten Kontraktion in allen Organen, allerdings war diese im Antrum, im Colon und im Uterus mit einer Steigerung auf $139,19 \pm 22,26\%$ ($p > 0,05$), auf $141,28 \pm 28,60\%$ ($p > 0,05$) und auf $119,51 \pm 19,94\%$ ($p > 0,05$) moderat ausgeprägt und nicht signifikant. Die Portalvene allerdings zeigte eine signifikante Verlängerung der Zeit auf $233,14 \pm 46,82\%$ ($p < 0,05$).

Nach Ausspülen des KCl und ACh gelangten alle Organe innerhalb von Minuten ihren vorherigen Grundtonus zurück.

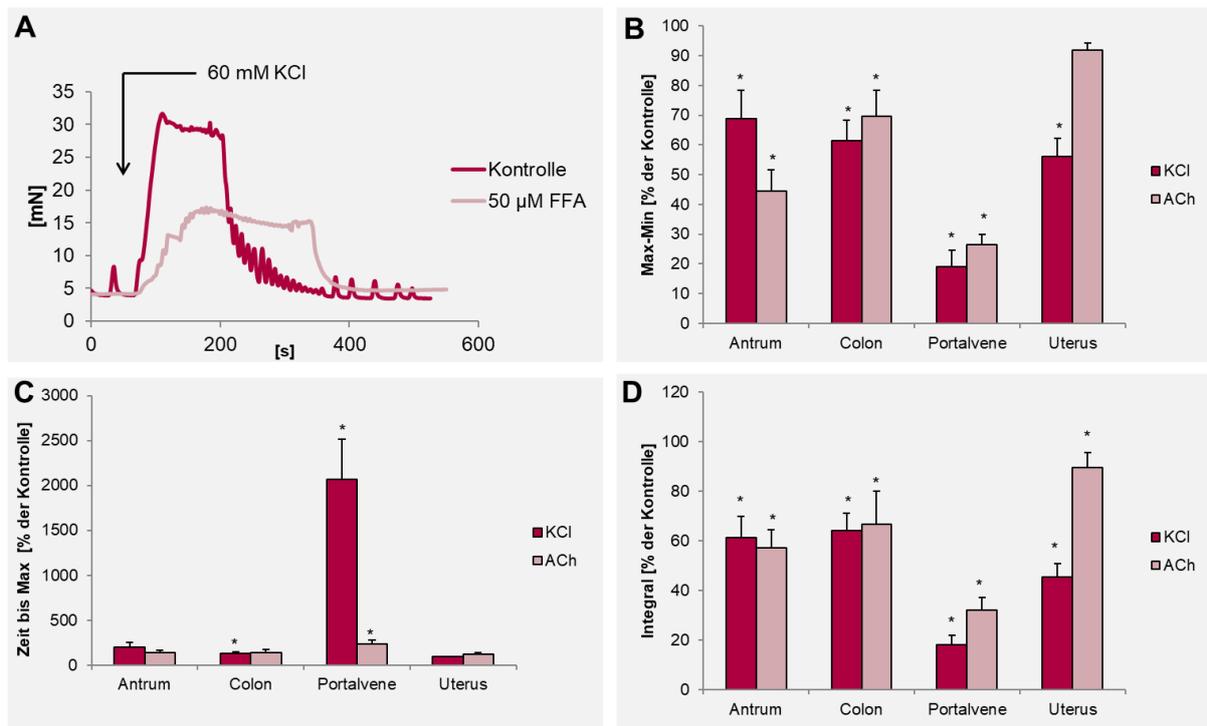


Abbildung 22: Effekte von FFA auf die Kontraktibilität der Organe

(A) Veränderung der KCl-induzierten Depolarisation unter Einfluss von 50 µM FFA am Beispiel des Magenantrums. (B) Veränderung der Kontraktionsamplitude. (C) Veränderung der Zeit bis zum Erreichen des Maximums (D) Veränderung des Integrals. Antrum (KCl: n= 5, ACh: n=8), Colon (KCl: n= 6, ACh: n= 6), Portalvene (KCl: n= 6, ACh: n= 8) und Uterus (KCl: n= 8, ACh: n=5). Fehlerbalken zeigen SEM, *p <0,05, **p <0,01 bezogen auf den Wert unter Kontrollbedingungen.

Abbildung 22 A zeigt exemplarisch die Veränderung der KCl-induzierten Kontraktionsantwort unter dem Einfluss von 50 µM FFA im Vergleich zur Messung ohne pharmakologische Beeinflussung. Unter Einfluss des FFA stellt sich die Kontraktionsamplitude deutlich abgeschwächt dar. Auch die Zeit bis zum Erreichen dieses Maximums ist verlängert, d.h. der Anstieg ist flacher. Auch hier zeigt sich eine Auflösung der biphasischen Kontraktionsantwort unter Einfluss der Testsubstanz. Die Kontraktion geht unmittelbar in die Plateauphase über, deren Höhe deutlich abgenommen hat. Der Wegfall dieser ersten Kontraktionsphase konnte bei allen Präparaten und allen Geweben gleichermaßen beobachtet werden.

3.1.8 EFFEKTE DES CHINIDINS

3.1.8.1 EFFEKTE AUF DIE SPONTANAKTIVITÄT

Das Antiarrhythmikum Chinidin modulierte konzentrationsabhängig die Spontanaktivität der unterschiedlichen glattmuskulären Präparate mit gewebeabhängiger Effektstärke. Abbildung 23 zeigt exemplarisch den Effekt von 100 μM Chinidin am Beispiel der Portalvene. Nach Zugabe des Chinidins zeigt diese eine deutliche Reduktion der Amplitude und eine Erhöhung der Kontraktionsfrequenz.

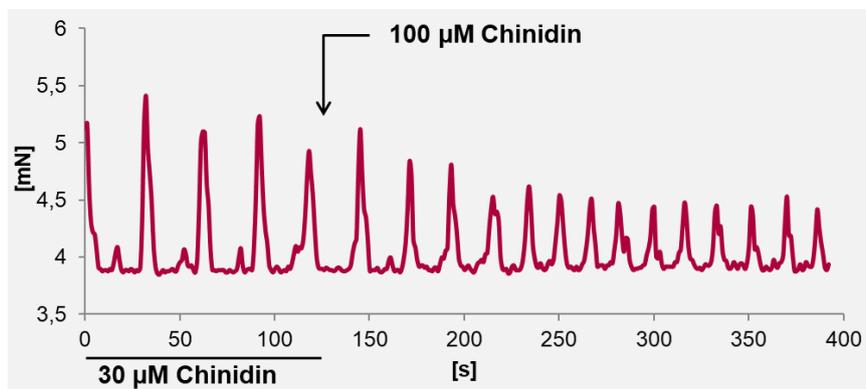


Abbildung 23: Registrierung der Spontanaktivität der Portalvene unter Einfluss der Testsubstanz Chinidin. Die Zugabe ist mit einem Pfeil markiert. Vorangegangen ist die Gabe von 30 μM FFA.

Es folgt eine detaillierte Darstellung der Effekte auf Frequenz, Amplitude, Integral und Kontraktilität der einzelnen Gewebe.

FREQUENZ

Durch Zugabe der Testsubstanz Chinidin wurde die Frequenz der Spontanaktivität innerhalb der Gewebe unterschiedlich stark moduliert.

Das Antrum zeigt eine signifikante Frequenzveränderung bei einer Konzentration von 30 μM Chinidin, die zu einer Reduktion auf $71,78 \pm 8,11\%$ ($p < 0,01$) im Vergleich zur Kontrollmessung führte. Bei weiterer Dosiserhöhung kam es zu einem kontinuierlichen Ausfall einzelner Präparate, woraus bei einer Testkonzentration von 300 μM Chinidin schließlich eine Frequenzabnahme auf $17,90 \pm 10,15\%$ ($p < 0,01$) resultierte. Dabei waren noch drei der elf getesteten Präparate aktiv.

Colon, Portalvene und Uterus präsentierten sich hinsichtlich der Frequenz mit einem "decrecendo-crescendo-decrecendo-Muster". Das bedeutet, es kam zunächst zu einer leichten Frequenzabnahme, auf die eine zwischenzeitliche Zunahme folgte und letztlich aber in einer Frequenzabnahme endete, welche sich vorwiegend aus dem Ausfall vieler Präparate bei einer Konzentration von 300 μ M Chinidin ergab. So erreichten die Präparate unter Einfluss von 100 μ M Chinidin ihre maximale Frequenz, die beim Colon bei $143,57 \pm 18,75\%$ ($p > 0,05$), bei der Portalvene bei $141,98 \pm 21,92\%$ ($p > 0,05$) und beim Uterus bei $159,47 \pm 12,34\%$ ($p < 0,01$) lag. Eine weitere Dosissteigerung auf 300 μ M Chinidin brachte schließlich – wie bereits erwähnt – die Mehrzahl der Präparate zum Erliegen.

Die Präparate, die unter Einfluss von 300 μ M Chinidin noch Aktivität zeigten, wurden schließlich durch die Zugabe von 1 mM zum Erliegen gebracht.

Unabhängig von der Konzentration des Chinidin konnte der vollständige Effekt in allen Geweben innerhalb von 3 Minuten nach Zugabe beobachtet werden. Nach Ausspülen der Testsubstanz konnte eine vollständige Reversibilität des Frequenzeffektes innerhalb von 20 Minuten festgestellt werden.

AMPLITUDE

Auch die Amplitude der Spontanaktivität wurde durch die Testsubstanz Chinidin in allen Organgeweben in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusst.

So zeigten Antrum und Uterus bei ab einer Konzentration von 30 μ M Chinidin eine leichte Minderung der Amplitude auf $86,0 \pm 12,58\%$ ($p > 0,05$) und $89,98 \pm 3,50\%$ ($p < 0,01$) des Wertes unter Kontrollbedingungen, die bei weiterer Steigerung der Dosierung auf schließlich 300 μ M Chinidin zum Wegfall der spontanen Kontraktionen bei sieben der elf Antrumpräparate bzw. acht der elf Uteruspräparate und einer deutlich erkennbaren Amplitudenminimierung der noch aktiven Muskelstreifen führte. Hieraus ergab sich eine signifikante Reduktion der mittleren Amplitude auf $25,04 \pm 13,9\%$ ($p < 0,01$) für das Antrum bzw. $11,62 \pm 6,35\%$ ($p < 0,01$) für den Uterus.

Das Colon zeigte bereits bei einer Konzentration von 3 μ M Chinidin erste Effekte auf die Amplitude, die sich auf $87,53 \pm 5,04\%$ ($p > 0,05$) im Vergleich zur Kontrollmessung minimierte. Bei weiterer Erhöhung der Konzentration der Testsubstanz zeigte sich eine signifikante dosisabhängige Reduktion der Amplitude, die bei Einsatz von 300 μ M Chinidin zu einem Ausfall der Spontanaktivität bei drei der fünf Präparate führte, so wie es auch bei Antrum und Uterus zu

beobachten war. Daraus resultierte im Mittel eine Dämpfung der Amplitude auf $18,83 \pm 7,81\%$ ($p < 0,05$) verglichen mit den Ausgangswerten.

Die Portalvene zeigte ab einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ Chinidin erste Veränderungen der Kontraktionsamplitude. Sie zeigte eine Reduktion auf $88,45 \pm 4,83\%$ ($p < 0,05$), die sich bei weiterer Steigerung der Konzentration signifikant verstärkte und schließlich bei $300 \mu\text{M}$ Chinidin in einen Aktivitätsverlust von vier der acht Präparate mündete. Folglich verminderte sich auch hier die Amplitude signifikant im Mittel auf $28,56 \pm 10,50\%$ ($p < 0,01$) im Vergleich zur Messung unter Kontrollbedingungen.

Der maximale Wirkeffekt auf die Amplitude zeigte sich ebenso wie der Effekt auf die Frequenz etwa 3 Minuten nach Substanzgabe. 30 Minuten nach Ausspülen des Pharmakons konnte die Ausgangsamplitude wieder erreicht werden. Somit nahm dies etwas mehr Zeit ein als die Rückbildung der Frequenz. Das Erscheinungsbild der einzelnen Kontraktionen (Anstieg, Dauer und Abstieg) wurde durch Chinidin nicht beeinflusst.

INTEGRAL

Korrespondierend zu den Veränderungen in Frequenz und Amplitude durch die steigende Konzentration des Chinidin änderte sich auch das Kraftintegral der Organpräparate.

Das Antrum und das Colon zeigten eine dosisabhängige Verkleinerung des Integrals ab einer Konzentration von $3 \mu\text{M}$ Chinidin, bei der sich das Integral mit $84,73 \pm 8,02\%$ ($p = 0,05$) für das Antrum und $84,25 \pm 4,52\%$ ($p < 0,05$) für das Colon änderte. Die Steigerung der Konzentration führte durch den bereits beschriebenen Aktivitätsausfall einiger Präparate dazu, dass sich das Integral auf $8,39 \pm 4,30\%$ ($p < 0,01$) im Antrum und $32,67 \pm 13,67\%$ ($p < 0,05$) im Colon verminderte.

Bei der Portalvene ließ sich erst ab einer Konzentration von $30 \mu\text{M}$ Chinidin ein Effekt auf das Integral beobachten, was sich durch eine Verkleinerung auf $84,76 \pm 6,10\%$ ($p > 0,05$) äußerte. Wie auch bei Antrum und Colon beschrieben, kam es in Folge des Ausfalls einiger Präparate unter Einfluss von $300 \mu\text{M}$ Chinidin zur deutlichen Reduktion des Integrals auf $35,15 \pm 13,37\%$ ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrollmessung. Dieser zeigte sich beim Uterus mit einer Minimierung auf $12,61 \pm 7,10\%$ ($p < 0,01$) noch deutlicher ausgeprägt.

Der Grundtonus der glattmuskulären Gewebe blieb dabei durch die Testsubstanz unbeeinflusst.

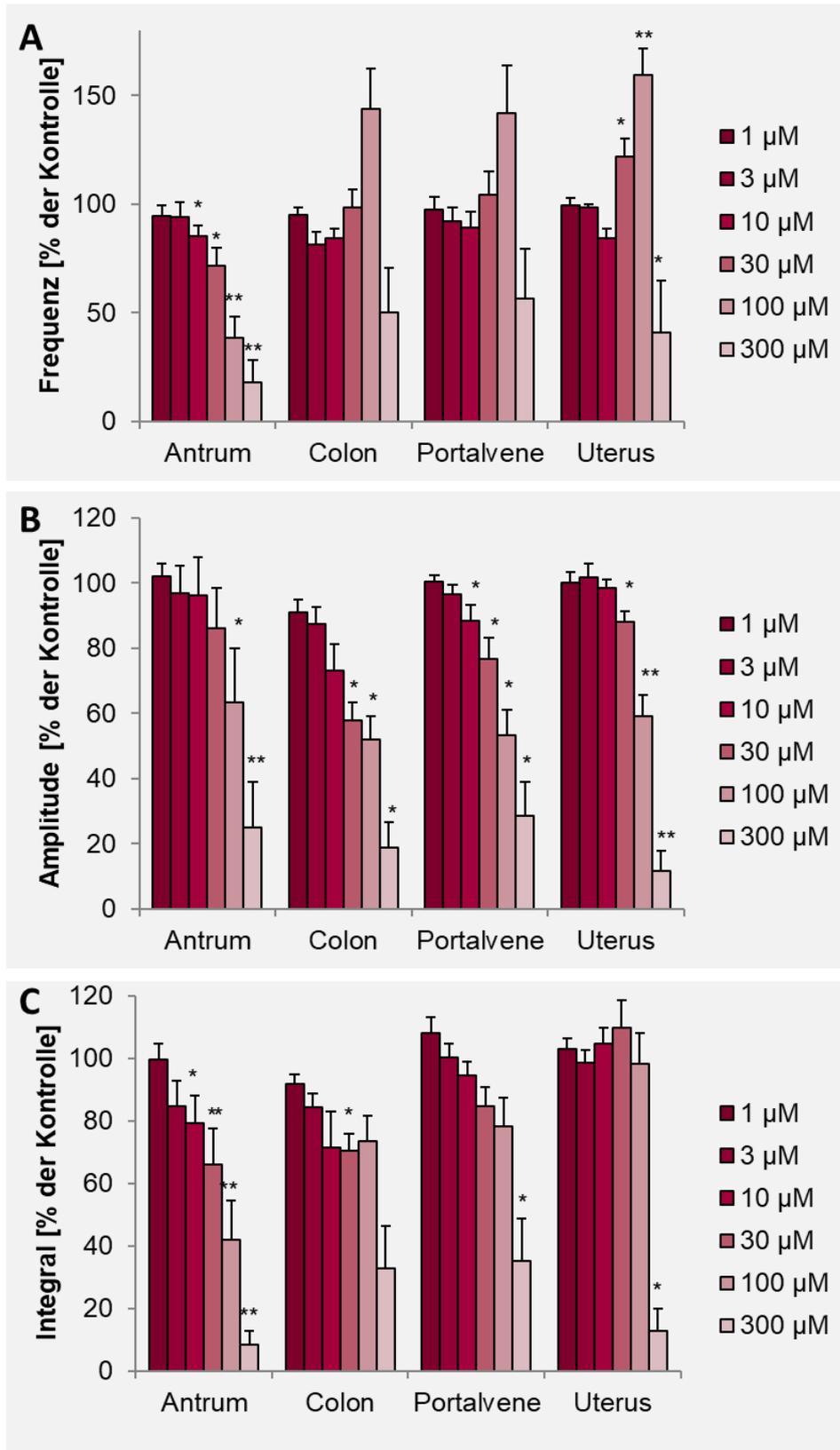


Abbildung 24: Statistische Darstellung der Effekte von Chinidin

auf die Frequenz (A), Amplitude (B) und Integral (C) der Spontanaktivität angegeben in Prozent im Vergleich zur Messung unter Kontrollbedingungen ohne pharmakologische Beeinflussung.

Antrum (n= 11), Colon (n= 5), Portalvene (n= 8) und Uterus (n= 11)

Fehlerbalken zeigen SEM, *p <0,05, **p <0,01 bezogen auf den Wert unter Kontrollbedingungen.

3.1.8.2 EFFEKTE AUF DIE KONTRAKTILITÄT

Die exogene Aktivierbarkeit mittels KCl und ACh wurde unter dem Einfluss von 300 μ M Chinidin stark vermindert.

Die durch KCl-induzierte Kontraktionsantwort wurde in seiner Amplitude durch Chinidin insbesondere beim Antrum, bei der Portalvene und bei dem Uterus deutlich gedämpft. Im Vergleich zur Messung unter Kontrollbedingungen erreichten diese Präparate nur noch $18,09 \pm 6,40\%$ ($p < 0,01$), $11,39 \pm 3,13\%$ ($p < 0,01$) und $5,20 \pm 2,67\%$ ($p < 0,01$). Dabei ist anzumerken, dass sechs der neun Uteruspräparate keine Kontraktionsantwort unter Einfluss des Chinidin zeigten, während an allen Muskelpräparaten von Antrum und Portalvene eine Reaktion – wenn auch in abgeschwächtem Maße – auslösbar war.

Die Kontraktionsamplitude des Colons wurde mit einer Reduktion auf $49,02 \pm 9,50\%$ ($p > 0,05$) im Vergleich zur Kontrollmessung weniger stark durch das Chinidin beeinflusst.

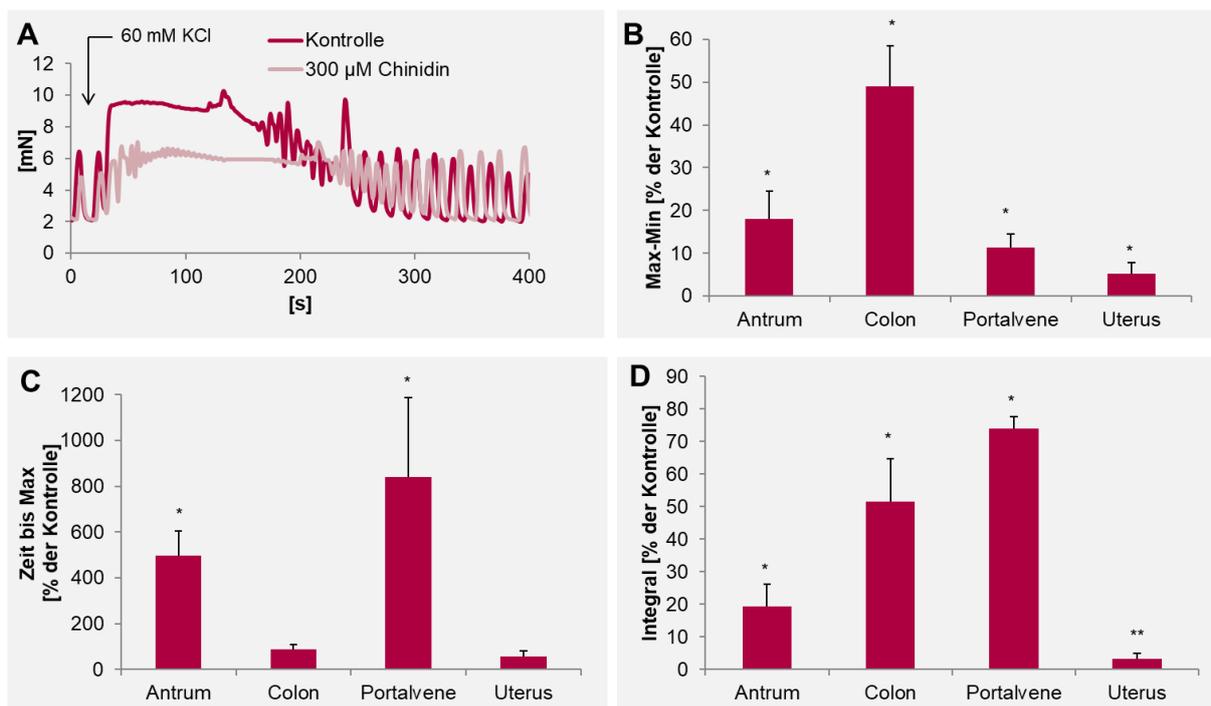


Abbildung 25: Effekte auf die exogene Kontrahierbarkeit durch Chinidin

(A) zeigt die Veränderung der KCl-induzierten Depolarisation unter Einfluss von 300 μ M Chinidin im Vergleich zur Kontraktion unter Kontrollbedingungen am Beispiel des Magenantrums. (B) zeigt die Änderung der Kontraktionsamplitude. (C) zeigt die Verlängerung der Zeit bis zum Erreichen des Maximums. (D) zeigt die Änderung des Integrals unter dem Einfluss von 300 μ M Chinidin.

Antrum (n= 11), Colon (n= 5), Portalvene (n= 8) und Uterus (n= 11)

Fehlerbalken zeigen SEM, *p < 0,05, **p < 0,01 bezogen auf den Wert unter Kontrollbedingungen.

Die Zeit bis zum Erreichen des verminderten Maximums verlängerte sich bei Antrum und Portalvene durch das Chinidin auf das fünf- bzw. achtfache im Vergleich zur Messung unter Kontrollbedingungen. So ergab sich hier beim Antrum eine Steigerung auf $495,52 \pm 109,32\%$ ($p < 0,05$) und bei der Portalvene auf $840,48 \pm 364,35\%$ ($p > 0,05$). Beim Colon hingegen minimierte sich die Zeit bis zum maximalen Punkt der Kontraktion auf $88,58 \pm 20,94\%$ ($p > 0,05$).

Da an der überwiegenden Anzahl der Uteruspräparate unter Einfluss von Chinidin keine KCl-Antwort zu induzieren war und sich so formal ein Wert von 0 ergab, reduzierte sich die Zeit hier im Mittel auf $55,31 \pm 25,06\%$ ($p > 0,05$). Bei den noch auslösbaren Antworten der aktiven Uteruspräparate zeigte sich eine Verlängerung der Zeit bis zum Erreichen des Maximums.

Entsprechend der veränderten Parameter von Amplitude und Zeit ergab sich auch eine deutliche Veränderung des Integrals. Das Integral des Antrums reduzierte sich signifikant auf $19,37 \pm 6,70\%$ ($p < 0,01$), während sich das der Portalvene mit einer Reduktion auf $74,00 \pm 3,64\%$ ($p < 0,01$) nur moderat verminderte. Auch am Colonpräparat konnte unter dem Einfluss des Chinidin eine Halbierung des Integrals verzeichnet werden. Wie zu erwarten, kam es durch den Ausfall der Aktivierungskontraktionen des Uterus unter Chinidin hier zu einer sehr deutlichen Abnahme des Integrals auf $3,34 \pm 1,65\%$ ($p < 0,01$).

Die durch ACh-induzierte Kontraktionsantwort konnte unter dem Einfluss der Testsubstanz Chinidin in keinem der getesteten Gewebepreparaten ausgelöst werden, sodass sich hier formal bei allen gemessenen Parametern der Wert 0 ergab.

3.2 FUNKTIONELLE MESSUNGEN AM KONFOKALMIKROSKOP

3.2.1 MORPHOLOGIE DER ZELLEN DER PRIMÄRKULTUR

Die Kulturen, die sich mit Spontanaktivität in der konfokalmikroskopischen Messung zeigten, wurden zunächst unter dem Mikroskop im Phasenkontrast dargestellt. Die Aufnahmen wurden zu morphologischen Untersuchungen genutzt, um Charakteristika der spontanaktiven Zellen herauszuarbeiten.

Vereinzelt fanden sich myozytenähnliche spindelförmige Zellen, die parallel ausgerichtet waren. Sie besaßen große, ovale Zellkerne. Im Zellverband waren auch einige Fibroblastenähnliche Zellen zu finden. Diese hatten verschieden geformte Zellkörper. Dieser Zelltyp trat häufiger mit zunehmendem Abstand zum Zentrum des Zellverbands auf (vgl. Abb. 26).

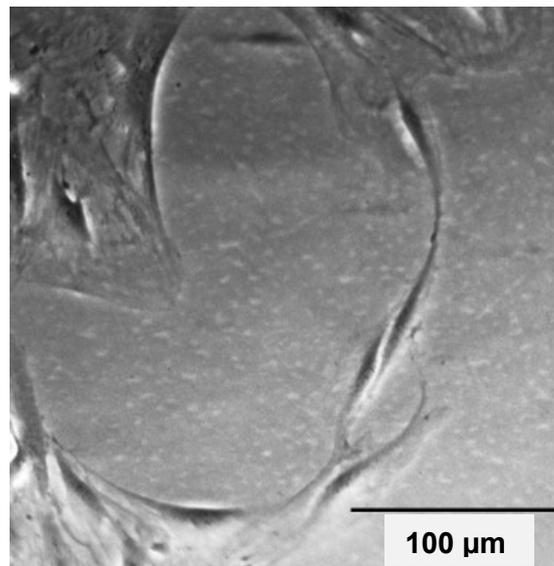


Abbildung 26: Darstellung von Zellen mit SMC-ähnlicher Morphologie im Phasenkontrast

Doch überwiegend präsentierten sich Zellen, deren Zellkörper unregelmäßig geformt waren. Die Somata der Zellen zeigten große, oval und mittelständig liegende Zellkerne. Die Zellen besaßen mehrere Fortsätze. Diese hatten eine äußerst feine Struktur und teilweise die mehrfache Länge des Somas. Sie strahlten bipolar oder sternförmig vom Soma aus und stellten Kontakte mit anderen Zellen her (Abb. 27).

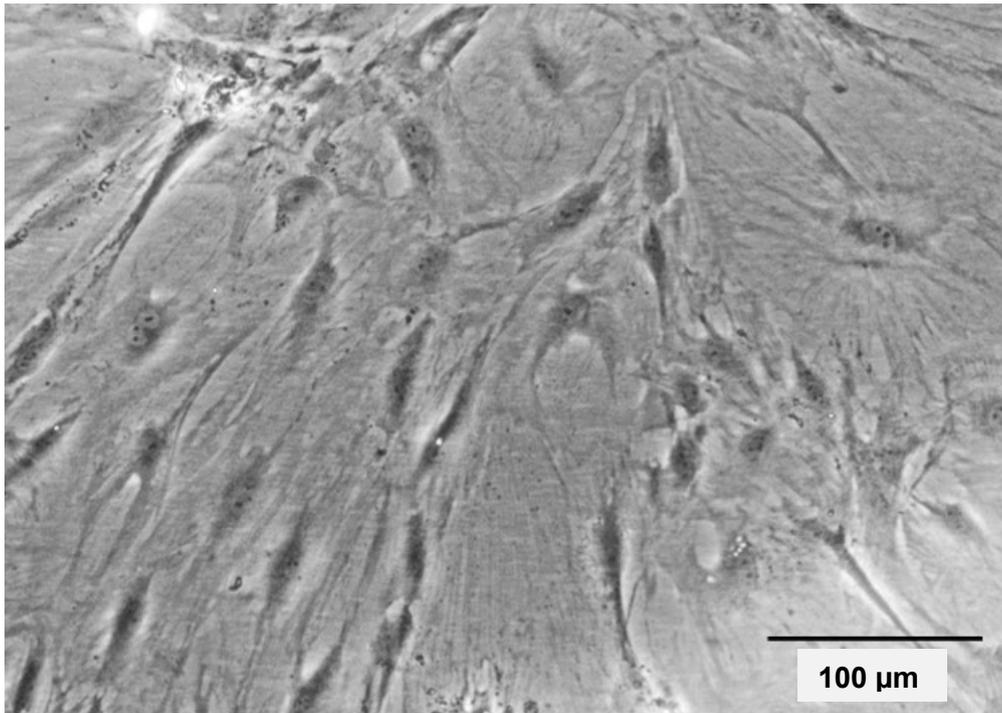


Abbildung 27: Darstellung von Zellen mit ICC-ähnlicher Morphologie im Phasenkontrast

Die Abstände zwischen den Zellen waren regelmäßig. Es bildete sich ein geordnetes, feinmaschiges Netzwerk aus. Die Dichte der Zellen nahm zum Rand hin ab. Während sich die zuvor beschriebenen Netzwerke eher im Zentrum der Kultur zeigten, fand man zum Rand hin eher einzeln liegende Zellen.

Auch eine quantitative Bestimmung der Zellkerndichte im Phasenkontrast auf einer Fläche von 200 x 200 μm an je fünf Regionen in Zentrum und Peripherie zeigte eine dichte und homogene Zellverteilung im Zentrum der Primärkultur und einzeln, aber dennoch gleichmäßig angeordnete Zellen in der Peripherie.

Tabelle 10: Verteilung der Zellkerne in Zentrum und Peripherie der Zellkultur in 200 x 200 μm-Regionen

Region	1	2	3	4	5
Zentral	46	45	49	43	40
Peripher	5	8	6	10	8

Der Phänotyp der Zellen war in allen Regionen der gleiche, unabhängig davon, ob diese zentral oder peripher lagen. Vereinzelt fanden sich lokalisiert und dicht liegende Zellcluster, aus denen die Zellen aussprossen und sich organisierten. Diese gliederten sich in das Netzwerk ein und bildeten Fortsätze zu den umgebenden Zellen aus.

3.2.2 SPONTANAKTIVITÄT UNTER NORMALBEDINGUNGEN

Die Grundlage der Messungen der ICC am Konfokalmikroskop mit einem Ca^{2+} -Indikator geht auf die Erkenntnis zurück, dass für die Entstehung der Spontanaktivität Ca^{2+} -Oszillationen in ICC von Bedeutung sind [76]. Aus diesem Grund können zeitliche und räumliche Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zum Nachweis von Spontanaktivität genutzt werden.

Abbildung 28 stellt exemplarisch den zeitlichen Verlauf der Spontanaktivität dar, der durch die periodischen Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration gekennzeichnet ist. Diese Änderungen sind auch in den vier Einzelbildern zu erkennen. Die zentral liegende Zelle zeigt eine zeitabhängige Zu- und Abnahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, während die am unteren Bildrand liegende Zelle zwar eine relativ höhere intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration aufweist, diese aber über die Zeit nicht oszilliert, sondern keinerlei Veränderungen bietet. Auch die umliegenden Zellen zeigen keine Signaländerungen im Zeitverlauf.

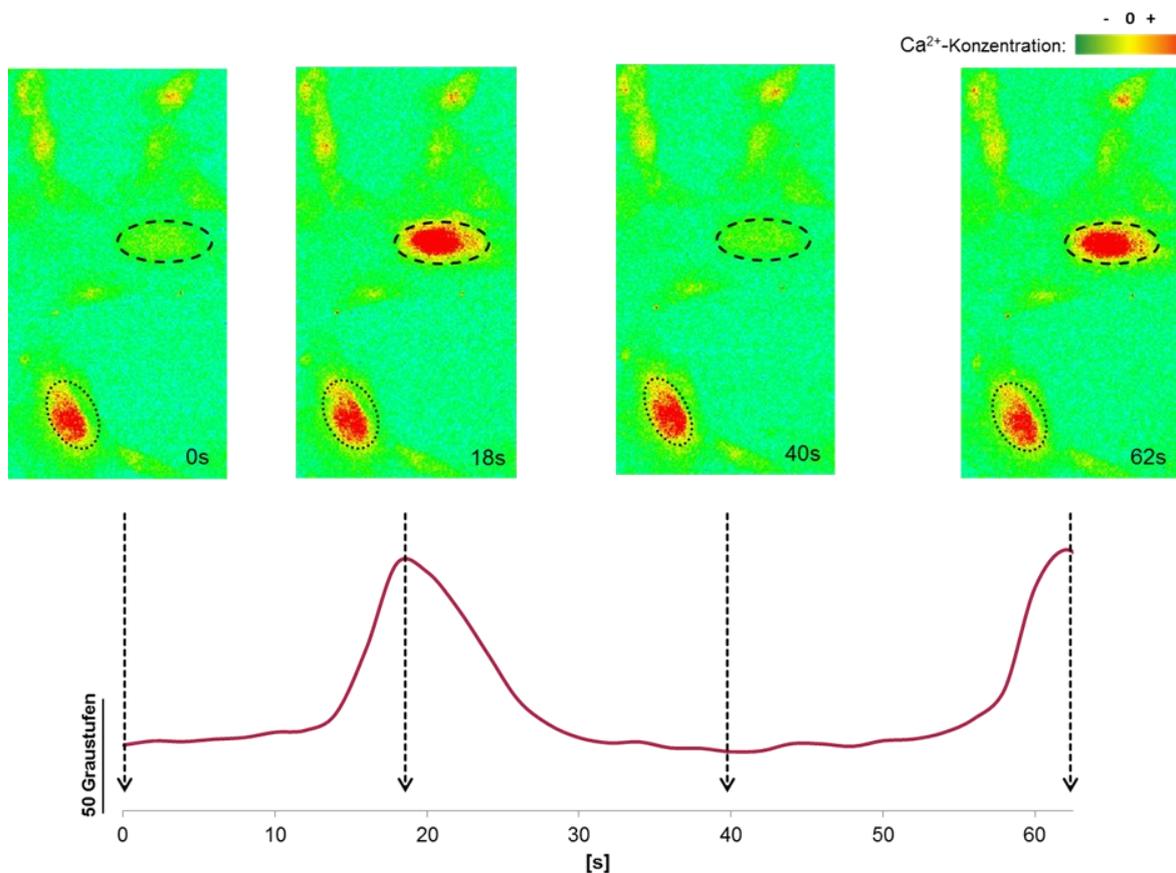


Abbildung 28: Darstellung des oszillierenden intrazellulären Ca^{2+} -Signals

Oben wird der zeitliche Verlauf der periodischen intrazellulären Ca^{2+} -Änderungen farbcodiert dargestellt. Der untere Graph zeigt den Mittelwertverlauf in der oberen der beiden markierten regions of interest. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen die untenstehenden Einzelbilder aufgenommen worden sind. Hier zeigt eine Zelle eine zeitabhängige Ca^{2+} -Anreicherung, während umliegende Zellen keine Änderungen des Signals zeigen.

Insgesamt konnte nur an 15% der Zellkulturen eindeutig eine phasisch-rhythmische Spontanaktivität in Form von periodischen wellenförmigen Oszillationen des Calcium-Fluoreszenz-Signals nachgewiesen werden. Innerhalb dieser Kulturen zeigten sich jedoch jeweils mehrere Regionen, die diese Aktivität widerspiegeln. Die mittlere Frequenz unter Spontanbedingungen betrug bei diesen spontanaktiven Zellkulturen 1,4/min (SEM= 0,14, n= 8).

Ein deutlicher Bleichungseffekt zeigte sich auch bei Messungen mit einer Dauer von 15 Minuten im Signalverlauf nicht. Das Fluoreszenzsignal blieb über die gesamte Dauer der Messungen stabil mit nahezu gleichbleibender Amplitude der Calcium-Fluoreszenzsignale im Zeitverlauf.

Allerdings konnte eine starke Temperaturabhängigkeit der Spontanaktivität verzeichnet werden. Bei einer Minderung der Temperatur $<30\text{ }^{\circ}\text{C}$ kam es zum Sistieren der phasischen Ca^{2+} -Oszillationen.

Eine spontanaktive Zellkultur konnte lediglich über 30 Minuten für die Versuchsreihen verwendet werden, da dann eine Ablösung der Zellcluster vom Boden des μ -Dish einsetzte und so nur noch artefaktbeladene Messungen generiert werden konnten.

3.2.3 VERGLEICH SPONTANAKTIV OSZILLIERENDER REGIONEN

Innerhalb eines Bildausschnitts zeigten mehrere Areale eine phasisch-rhythmische Aktivität. Um eine Aussage über die Periodizität der Regionen zu treffen, wurden drei Messfelder in dem zeitlichen Verlauf ihrer Aktivität verglichen.

Messfeld I liegt in der Randzone des aufgezeichneten Bereichs, das Messfeld II und das Messfeld III befinden sich im Zentrum. Die Konzentrationsschwankungen des Kalziums der drei Messfelder sind in Abbildung 29 dargestellt. Auf der Abszisse ist die Zeitachse abgebildet, dabei beträgt der zeitliche Abstand zweier Messpunkte 0,5 s. Das Kalziumsignal des ersten (rot), zweiten (orange) und dritten Messfeldes (pink) zeigen deutliche periodische Oszillationen mit nur geringem Phasenversatz.

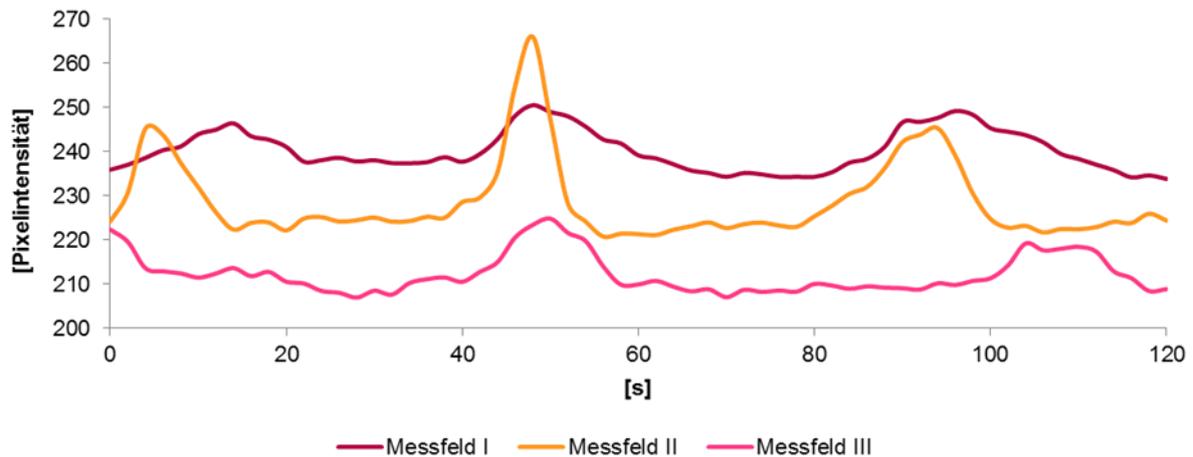


Abbildung 29: Graphische Darstellung der zeitabhängigen Kalziumoszillation dreier Messfelder.

3.2.4 EINFLÜSSE DER TESTSUBSTANZ SPERMIN AUF DIE SPONTANAKTIVITÄT

Im Folgenden wurde der Effekt des Polyamins Spermin in einer Konzentration von 700 μM auf die Ca^{2+} -Oszillationen der spontanaktiven Primärzellkultur aus dem Corpus gastrici getestet. Nach 300 s stabiler Spontanaktivität wurde die Testsubstanz hinzugegeben. Abbildung 30 zeigt den Signalverlauf einer oszillierenden Region unter Einfluss von Spermin.

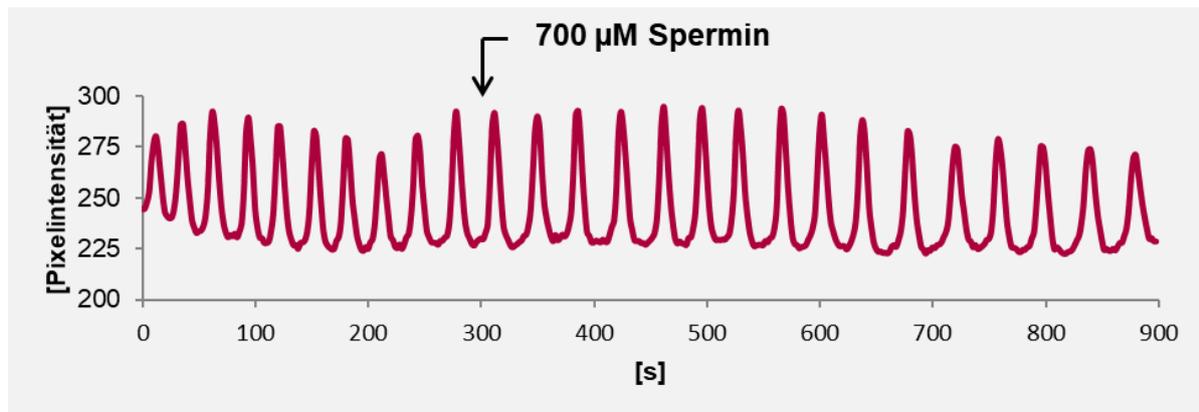


Abbildung 30: Registrierung einer Region mit stabiler oszillierender Aktivität unter Einfluss von Spermin aus einer Zellkultur aus dem Corpus des Magens

Die Abszisse zeigt den Zeitverlauf und die Ordinate definiert die Graustufe. Der Zeitpunkt der Zugabe ist mit einem Pfeil markiert.

In der abgebildeten Originalregistrierung lassen sich keine wesentlichen Veränderungen im Aktivitätsmuster der oszillierenden Regionen erkennen.

Im Vergleich zum Kontrollzeitraum veränderte sich die Frequenz der Ca^{2+} -Oszillationen nicht. Auch im Nachbeobachtungsintervall zeigte sich keine Änderung. Die Oszillationsfrequenz blieb also über den kompletten Messzeitraum von 15 Minuten – auch unter Einfluss des Spermin – konstant. Die Oszillationsamplitude hingegen zeigte eine minimale Reduktion auf $96,21 \pm 4,53\%$ unter Einfluss der Testsubstanz und nahm auch im

Nachbeobachtungszeitraum weiter ab, was durch die lange Dauer der Belichtungszeit und die damit einhergehende Bleichung zu erklären sein kann.

Eine weitere Erhöhung der Spermindosis brachte keine deutlicheren Effekte auf die Ca^{2+} -Oszillationen.

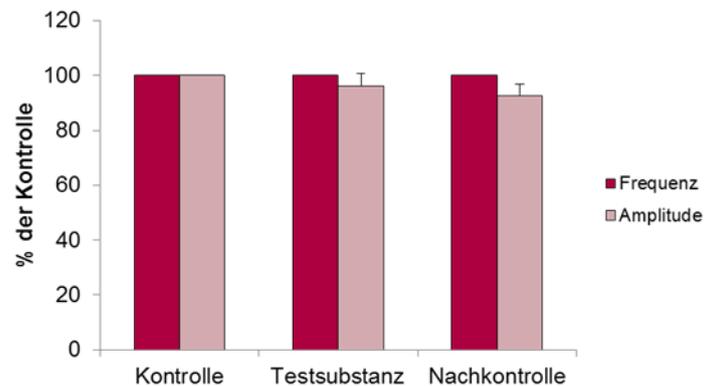


Abbildung 31: Statistische Darstellung der Änderung der Aktivität unter der Testsubstanz Spermin angegeben in Prozent im Vergleich zur Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen SEM. Frequenz und Amplitude wurde zu drei festgelegten Zeitpunkten über eine Zeit von 300 s gemessen. n= 3, Fehlerbalken zeigen SEM, *p <0,05, **p <0,01

3.2.5 EINFLÜSSE DER TESTSUBSTANZ LANTHAN AUF DIE SPONTANAKTIVITÄT

Auch der Einfluss des Lanthan auf die spontanaktiven ICC-Cluster des Corpus wurde hinsichtlich seiner Modulation der rhythmischen Ca^{2+} -Oszillationen getestet.

Abbildung 32 stellt den Einfluss von 1 mM Lanthan auf die Aktivität einer ICC exemplarisch dar.

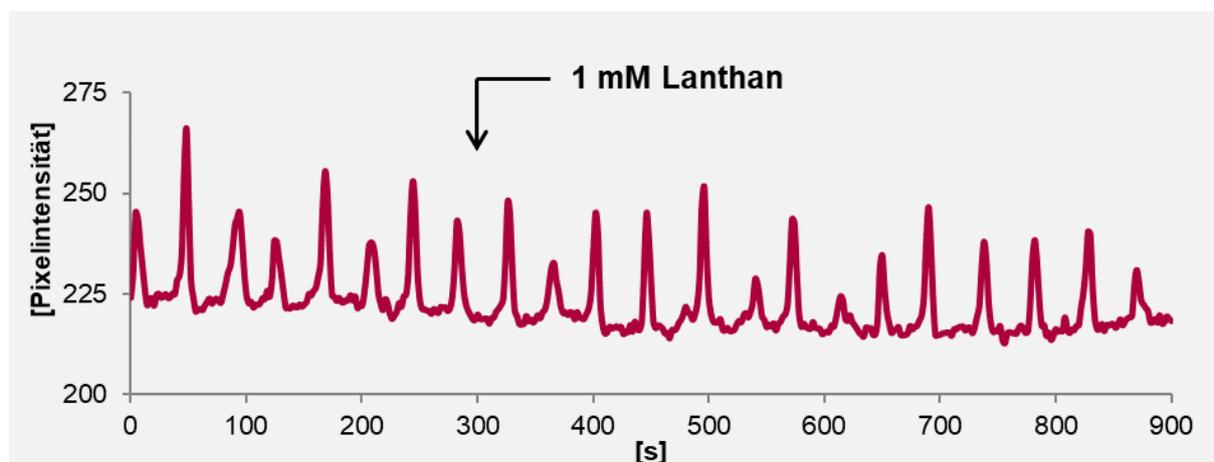


Abbildung 32: Registrierung einer Region mit stabiler oszillierender Aktivität unter Einfluss von Lanthan. Die Abszisse zeigt den Zeitverlauf und die Ordinate definiert die Änderung der Graustufe. Der Zeitpunkt der Zugabe ist mit einem Pfeil markiert.

In der Originalregistrierung lassen sich diskrete Veränderungen in Frequenz und Amplitude der oszillierenden Region erkennen. In der Zusammenschau aller Messreihen zeigte sich eine im Vergleich zum Kontrollzeitraum verminderte Frequenz der Ca^{2+} -Oszillationen auf $73,92 \pm 7,92\%$ ($p > 0,05$), die auch innerhalb des Nachbeobachtungsintervalls nicht auf das Ausgangsniveau zurückkam.

Auch die Oszillationsamplitude verkleinerte sich unter dem Einfluss des Lanthan leicht auf $77,40 \pm 2,82\%$ ($p > 0,05$) und stieg im Nachbeobachtungszeitraum wieder an ($82,42 \pm 4,85\%$, $p > 0,05$), erreichte aber innerhalb dieser Zeit die Ausgangsamplitude nicht.

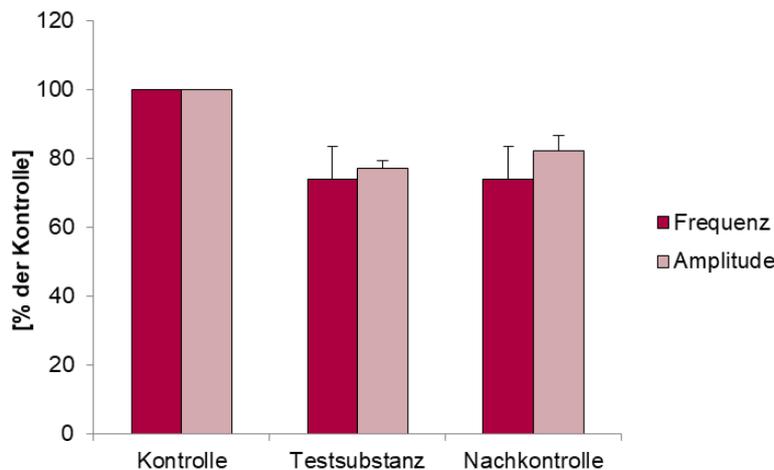


Abbildung 33: Veränderung von Frequenz und Amplitude durch Lanthan angegeben in Prozent im Vergleich zur Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen SEM. Frequenz und Amplitude wurde zu drei festgelegten Zeitpunkten über eine Zeit von 300s gemessen. $n = 4$, Fehlerbalken zeigen SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

3.2.6 EINFLUSS DER TESTSUBSTANZEN AUF DEN KCl-INDUZIERTEN KALZIUMANSTIEG

Durch die Erhöhung des extrazellulären K^+ kommt es zu einer Depolarisation der Zellmembran und damit einhergehend zu einer Öffnung spannungsgesteuerter Calciumkanäle. Dies bedingt einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Bei Zellkulturen, die keine phasisch-rhythmische Aktivität aufwiesen, wurde die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration unter Einfluss von KCl gemessen. In 75% der Kulturen, die auf KCl-Kontraktibilität getestet wurden, war eine Änderung der kalziumabhängigen Fluoreszenz erkennbar.

Sie zeigten unmittelbar nach Zugabe der Testsubstanz einen steilen Anstieg des Fluoreszenzsignals, welches anschließend in eine Plateauphase überging.

Eine Veränderung der KCl-Response unter dem Einfluss der TRPM7-Kanalblocker Spermin und Lanthan auf die nicht-spontane corporale ICC-Kultur wurde ermittelt. Abbildung 34 zeigt die Reaktivität von KCl unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von 700 μ M Spermin im Vergleich.

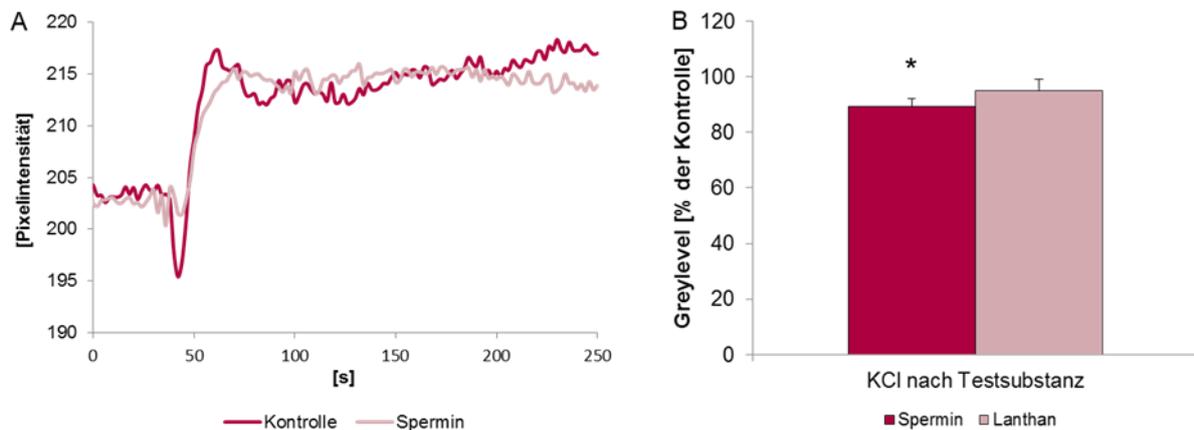


Abbildung 34: Reaktivität auf KCl bei einer nicht-spontanaktiven ICC

(A) zeigt exemplarisch den Verlauf der Kontraktion unter Kontrollbedingungen und unter Spermineinfluss. Die Abszisse zeigt den Zeitverlauf und die Ordinate definiert die Änderung der Graustufe. Der Zeitpunkt der Zugabe ist mit einem Pfeil markiert. (B) zeigt die statistische Darstellung der Änderung des Fluoreszenzsignals unter dem Einfluss der Testsubstanzen

Spermin: n= 9, Lanthan: n= 6, Fehlerbalken zeigen SEM, *p <0,05, **p <0,01

Der initiale Abfall des Greylevels ist durch das Pipettieren des KCl bedingt und in der Kontrolle etwas stärker ausgeprägt. Der sich anschließende Anstieg des Greylevels stellt die Wirkung des KCl dar und mündet in die Plateau-Phase. Die Amplitude des Anstiegs zeigt sich unter der Wirkung des Spermin moderat auf $89,34 \pm 2,68\%$ ($p < 0,05$) vermindert. Unter dem Einfluss von 500 μ M Lanthan zeigte sich eine geringer ausgeprägte Abnahme der Amplitude auf $92,50 \pm 3,54\%$ ($p > 0,05$).

IV. DISKUSSION

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert und in einen Zusammenhang mit den bisher zum Thema publizierten Daten und Konzepten gestellt.

4.1 BEWERTUNG DER ERGEBNISSE IM ORGANBAD

4.1.1 INTERPRETATIONSANSATZ

Die zu prüfende Hypothese war, dass der TRPM7-Kanal eine fundamentale Bedeutung für die Generierung der Spontanaktivität im glatten Muskel hat.

Nach klassischer Herangehensweise könnte bei Anwendung von selektiven Antagonisten des TRPM7-Kanals die Hypothese angenommen werden, wenn ein hemmender Effekt auf die mechanische Spontanaktivität zu verzeichnen wäre, und abgelehnt werden, wenn die Aktivität unter dem Antagonisten unverändert bliebe oder gar anstiege (vgl. Abb. 35 A).

Da zur Blockade des TRPM7-Kanals zwar keine selektiven, aber sehr wohl potente Antagonisten verfügbar sind, gilt es zu beachten, dass eine Reduktion der Spontanaktivität nicht zwangsläufig zur Annahme der Hypothese führt: Die Hemmung der Spontanaktivität kann auch über vielfältige TRPM7-unabhängige Wirkungen der Substanzen, z.B. eine Hemmung von Chlorid- oder Kalziumkanälen oder aber eine direkte Hemmung der Myosinleichtkettenphosphorylierung, bedingt sein. Aufgrund der geringen Selektivität der verfügbaren Testsubstanzen kann der klassische Ansatz daher für die Interpretation der Ergebnisse keine Anwendung finden.

Betrachtet man den klassischen Ansatz allerdings aus einer anderen Richtung, so erlauben die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse dennoch eindeutige Schlussfolgerungen. Jenseits aller Bedenken hinsichtlich der Spezifität muss nämlich die Hypothese unbedingt abgelehnt werden, wenn unter Einfluss potenter Antagonisten keine Aktivitätsänderung oder gar eine Aktivitätssteigerung zu beobachten ist.

Eine Minderung der Aktivität allein ist also anders als bei Experimenten mit spezifischen Antagonisten nicht gleichbedeutend mit der Annahme der Hypothese. Hier bedarf es zusätzlich einer zumindest semiquantitativen Bestimmung des Ausmaßes der nicht-spezifischen Substanzeffekte.

Diese Bestimmung erfolgte im Rahmen dieser Arbeit durch die Messung von Änderungen der exogenen Aktivierbarkeit unter dem Einfluss der Testsubstanz. Zeigen sich auch die exogen ausgelösten Kontraktionen unbeeinflusst, so gibt es keinen Anhalt für unspezifische Substanzeffekte und die Hypothese kann als wahr angenommen werden. Andernfalls kann keine eindeutige Aussage getroffen werden. Dieser Ansatz wird im Folgenden als "erweiterter Ansatz" beschrieben (vgl. Abb. 35 B).

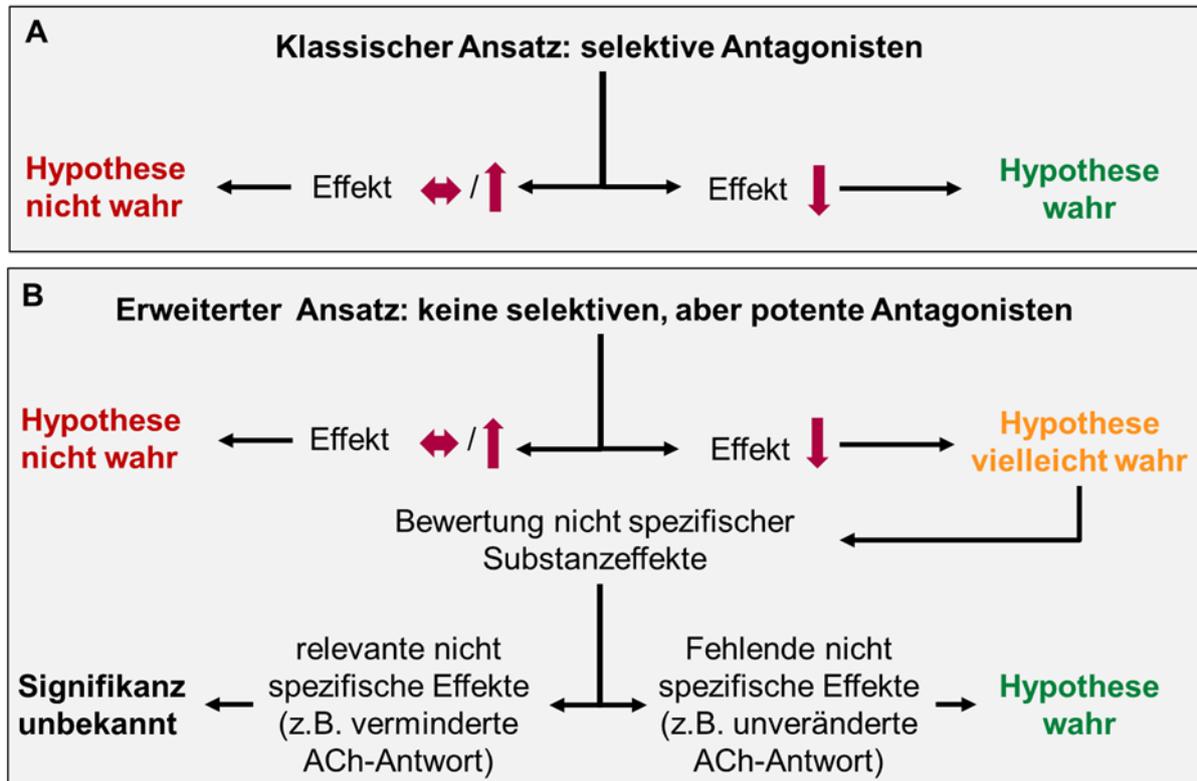


Abbildung 35: Ansatz für die Interpretation der Ergebnisse im Organbad

(A) zeigt den klassischen Ansatz, der sich auf den Einsatz selektiver Antagonisten bezieht. Hier sind eine unveränderte Aktivität bzw. eine Aktivitätszunahme gleichbedeutend mit der Ablehnung der gestellten Hypothese und entsprechend einer Aktivitätsabnahme gleichbedeutend mit der Annahme der Hypothese.

(B) zeigt den "erweiterten Ansatz", der als Interpretationsgrundlage bei dem Einsatz nicht selektiver, aber potenter Antagonisten dient. Entsprechend dem klassischen Ansatz kann bei gleichbleibender bzw. erhöhter Aktivität die Hypothese abgelehnt werden. Bei Minderung der Aktivität jedoch kann die Hypothese nur als vielleicht wahr angenommen werden und muss unter Hinzuziehung nicht spezifischer Substanzeffekte weiter überprüft werden. Die Hypothese kann angenommen werden, wenn sich **keine** nicht spezifischen Effekte zeigen.

4.1.2 MÖGLICHE ANGRIFFSORTE DER TESTSUBSTANZEN

Wie im vorangegangenen Abschnitt bereits angedeutet, zeigen die verwendeten Ionenkanalblocker zwar eine hohe Potenz für den TRPM7-Kanal, beeinflussen aber gleichzeitig auch andere Ionenkanäle, die für die glattmuskuläre Kontraktion von großer Relevanz sind.

Im Folgenden werden die für die Spontanaktivität relevantesten Angriffsorte und deren Funktion dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die Effekte der Testsubstanzen für drei unterschiedliche Funktionssysteme diskutiert:

- Elektrische Aktivität der ICC (Spontanaktivität)
- Elektrische Aktivität der SMC (verstärkte Propagation, Kontraktionssteuerung)
- Elektrische Kopplung von ICC und SMC durch GJ bzw. Connexine (Cx) (Propagation).

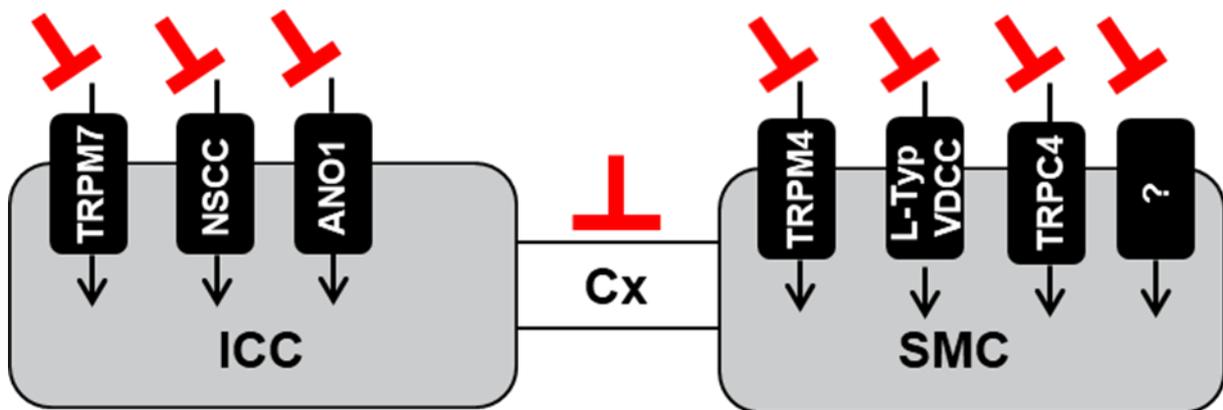


Abbildung 36: Potenzielle Angriffsorte der Ionenkanalblocker in ICC, SMC und Cx.

Die unterschiedlichen Kanäle werden je nach Zelltyp unterschiedlich exprimiert. Daraus resultieren auch unterschiedliche Effekte auf die Motorik der Gewebe:

- ICC: Hemmung des primären Schrittmacherprozesses (z.B.: mitochondriales Ca^{2+} -Handling) oder des nachgeschalteten Amplifizierungsprozesses (z.B. $\text{Cl}^-_{(\text{Ca}^{2+})}$ -Kanäle oder ggf. TRPM7-Kanäle)
- SMC: Hemmung der Verstärkung des Signals durch spannungsabhängige Einwärtsströme (v.a. L-Typ Kalziumkanal) oder Hemmung des nachgeschalteten Signalwegs/der eigentlichen kontraktile Prozesse, z.B. durch metabolische Alterationen oder Störungen in der Myosin-Leichtkettenkinaseaktivität.
- Gap Junctions: Blockierungen führen zur schlechteren Kopplung, es werden also weniger SMC von den durch die ICC erzeugten Erregungen erreicht, vgl. Abb. 4)

Es kann davon ausgegangen werden, dass jegliche Substanz, deren hemmende Wirkung sich auf ICC und Cx beschränkt, *keinen* Einfluss auf Kontraktionen hat, die durch exogene Aktivierungen über Acetylcholin oder eine hohe $[\text{K}^+]$ hervorgerufen werden. Diese exogen evozierten

Antworten bilden praktisch ausschließlich die Funktionalität der SMC ab und werden daher als Maß der Größe "Kontraktilität" bezeichnet.

Die folgende Tabelle 11 gibt einen Überblick über wichtige Kanalinteraktionen, deren Funktion sowie der durch die Blockade zu erwartende Effekt auf die messbare mechanische Spontanaktivität.

Tabelle 11: Erwartete Effekte einer Hemmung ausgewählter Ionenkanäle auf die Spontanaktivität der glattmuskulären Präparate

Kanal	Physiologische Funktion	Erwarteter Effekt bei Hemmung			Quelle
		Frequenz	Amplitude	Kontraktilität	
TRPM7	postulierter Schrittmacherstrom	↓	↓	↔	[13, 14]
L-Typ VDCC	Depolarisation und Kontraktion	↑ / ↔ / ↓	↓	↓	[77]
TRPM4	Regulation des Membranpotenzials	↔ / ↓	↓	↓	[78, 79]
Connexine	interzelluläre Kopplung	↑	↓	↔	[25]
TRPC4	muscarinerg induzierter Kationenstrom	↔	↔	↓	[80]

Steigerung: ↑, "scheinbare" Steigerung: ↑, keine Änderung: ↔, Reduktion: ↓, "scheinbare" Reduktion: ↓

SPERMIN

Eine Dosis Spermin, die den TRPM7-Kanal und damit auch den Schrittmacherstrom blockiert, sollte eine Frequenz- und Amplitudenabnahme zur Folge haben. Bei 10-100 µM Spermin sollten sich somit auch Effekte in der mechanischen Spontanaktivität der glattmuskulären Gewebe zeigen [14, 54-56]. Durch die Zugabe der Testsubstanz Spermin konnten in allen Geweben auch dosisabhängige Effekte auf die Spontanaktivität beobachtet werden.

Bei 10 µM Spermin zeigte sich noch keine Änderung im mechanischen Kontraktionsverhalten der Gewebe, während 100 µM in allen Geweben zu einer Reduktion der Kontraktionsamplitude führte. Ein Effekt auf die Frequenz konnte erst bei 300 µM Spermin verzeichnet werden. Dieser zeigte sich in den Geweben mit einer Abnahme, nur an der Portalvene war ein Anstieg der Kontraktionsfrequenz zu beobachten.

Wie in der untenstehenden Tabelle 12 veranschaulicht, zeigen Konzentrationen mit starker Hemmung auf den TRPM7-Kanal keinen Effekt auf die Frequenz und Amplitude. Erst höhere Konzentrationen der Testsubstanz führen zu einer signifikanten Reduktion der Kontraktionsamplitude, und zwar in Bereichen, die TRPM4 hemmen [83, 84]. Dazu passt auch die Frequenzreduktion des Uterus, die sich durch den Ausfall nur einzelner Kontraktionen kennzeichnet, und damit als "unecht" charakterisiert werden kann. Dieses Muster deutet also eher auf eine Störung in Amplifizierungsprozess durch die Hemmung von TRPM4 und leichte Hemmung der L-Typ VDCC hin, welche sich auch in signifikanter, aber nur leichter Minderung der KCl-induzierten Kontraktion zeigt.

Die paradoxe Frequenzsteigerung der PV kann auf die auf Hemmung der Cx zurückgeführt werden, die die Kopplung der Zellen untereinander verschlechtert. Der Effekt stellt sich damit eher bei der PV dar, da dieses Gewebe von Haus aus bereits schlechter gekoppelt ist als andere Organe (vgl. Abb. 13), so dass der Effekt dort am deutlichsten zu beobachten ist.

Eine Dosis Spermin, die den TRPM7-Kanal und damit auch den Schrittmacherstrom blockiert, sollte eine Frequenz- und Amplitudenabnahme zur Folge haben. Bei 10-100 μM Spermin sollten sich somit auch Effekte in der mechanischen Spontanaktivität der glattmuskulären Gewebe zeigen [14, 54-56]. Durch die Zugabe der Testsubstanz Spermin konnten in allen Geweben auch dosisabhängige Effekte auf die Spontanaktivität beobachtet werden.

Bei 10 μM Spermin zeigte sich noch keine Änderung im mechanischen Kontraktionsverhalten der Gewebe, während 100 μM in allen Geweben zu einer Reduktion der Kontraktionsamplitude führte. Ein Effekt auf die Frequenz konnte erst bei 300 μM Spermin verzeichnet werden. Dieser zeigte sich in den Geweben mit einer Abnahme, nur an der Portalvene war ein Anstieg der Kontraktionsfrequenz zu beobachten.

Wie in der untenstehenden Tabelle 11 veranschaulicht, zeigen Konzentrationen mit starker Hemmung auf den TRPM7-Kanal keinen Effekt auf die Frequenz und Amplitude. Erst höhere Konzentrationen der Testsubstanz führen zu einer signifikanten Reduktion der Kontraktionsamplitude, und zwar in Bereichen, die TRPM4 hemmen [83, 84]. Dazu passt auch die Frequenzreduktion des Uterus, die sich durch den Ausfall nur einzelner Kontraktionen kennzeichnet, und damit als "unecht" charakterisiert werden kann. Dieses Muster deutet also eher auf eine Störung in Amplifizierungsprozess durch die Hemmung von TRPM4 und leichte Hemmung der L-Typ VDCC hin, welche sich auch in signifikanter, aber nur leichter Minderung der KCl-induzierten Kontraktion zeigt.

Die paradoxe Frequenzsteigerung der PV kann auf die auf Hemmung der Cx zurückgeführt werden, die die Kopplung der Zellen untereinander verschlechtert. Der Effekt stellt sich damit eher bei der PV dar, da dieses Gewebe von Haus aus bereits schlechter gekoppelt ist als andere Organe (vgl. Abb. 13), so dass der Effekt dort am deutlichsten zu beobachten ist.

Tabelle 12: Beobachtete Konzentrationsabhängigkeit der Effekte von Spermin verglichen mit bekannten Effekten auf einzelne Ionenkanäle.

	1 μM	10 μM	100 μM	1000 μM	Quelle
Dosisrange	1-700 μM				
Beobachteter Effekt	Frequenz \leftrightarrow Amplitude \leftrightarrow		Frequenz \downarrow Amplitude \downarrow Kontraktilität \downarrow		
TRPM7					[54] [14] [55] [56]
L-Typ VDCC					[53]
TRPM4					[83, 84]
Connexine					[85]
TRPC4					[86]

kein Effekt/keine Daten
 Aktivierung
 leichte Hemmung
 moderate Hemmung
 starke Hemmung

Zu betonen ist, dass auch in Konzentrationsbereichen, die in anderen Studien zu einer nahezu vollständigen Blockierung von TRPM7 führten, in unseren Experimenten die Spontanaktivität zwar stark verändert, aber nicht erloschen war. Auch dies spricht gegen eine essentielle Rolle von TRPM7 in der primären Generierung der Schrittmacheraktivität. Entsprechend des in Abschnitt 4.1.1. dargestellten Interpretationsansatzes und dem konstruierten Fließschema ergibt sich, dass eine Blockade des TRPM7-Kanals zu keinem Effekt auf die mechanische Spontanaktivität im glattmuskulären Gewebe führt. Damit kann für die Testsubstanz Spermin die Hypothese, dass der TRPM7-Kanal Hauptkomponente mit Schrittmacherprozess des glatten Muskels ist, abgelehnt werden.

Die in den höheren Dosisbereichen beobachteten Effekte spielen im Fließschema keine Rolle, lassen sich aber klar durch die in der Tabelle dargestellten Interaktionen mit den Ionenkanälen der SMC bzw. den Connexinen erklären.

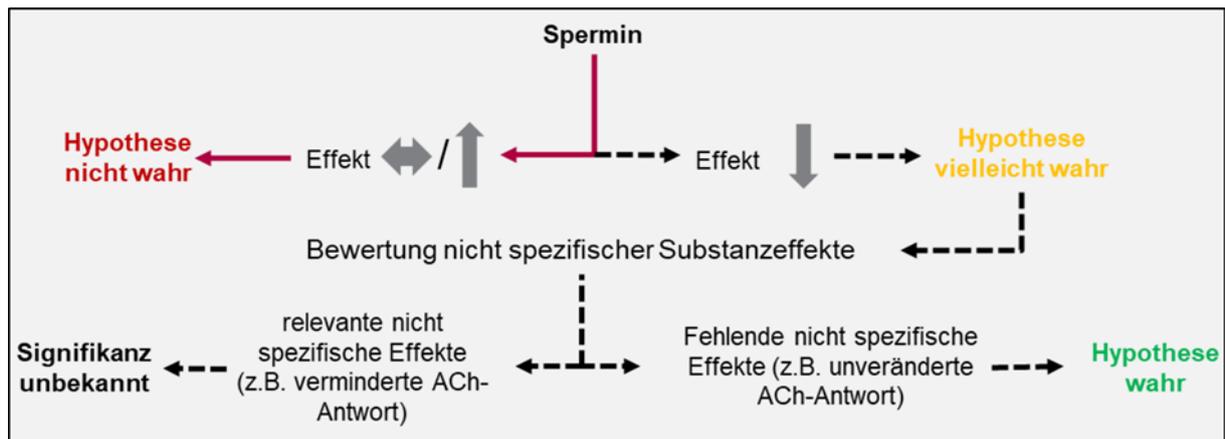


Abbildung 37: Interpretation der Ergebnisse mit Spermin

10 μM Spermin hemmen den TRPM7-Kanal stark. Innerhalb dieses Konzentrationsbereichs zeigt sich allerdings kein Effekt auf die Spontanaktivität der glattmuskulären Gewebepräparate. Demnach ist die Hypothese, dass der TRPM7-Kanal ein wichtiges Element im Pacemaking ist, abzulehnen.

LANTHAN

Eine Dosis Lanthan, die den TRPM7-Kanal und damit auch den Schrittmacherstrom blockiert, sollte eine Frequenz- und Amplitudenabnahme zur Folge haben. Bei 1 mM Lanthan sollten sich somit auch Effekte in der mechanischen Spontanaktivität der glattmuskulären Gewebe zeigen [40, 55, 56, 60]. Signifikante Änderungen der Kontraktionsparameter konnten im Falle des Lanthans jedoch schon bei geringeren Testkonzentrationen verifiziert werden. So konnte bei 100 μM eine Frequenzsteigerung in Antrum und PV und eine Frequenzminderung in Colon und Uterus, mit komplettem Wegfall der Kontraktionen im Colon beobachtet werden. Auch auf die Amplitude hatte diese Konzentration dosisabhängige Effekte. Eine signifikante Minderung der KCl-induzierten Kontraktion zeigte sich ebenfalls. Die ACh-Antwort konnte in allen Geweben nicht mehr ausgelöst werden.

Die in Colon und Uterus beobachtete Änderung des Kontraktionsmusters entspricht dem bei einer TRPM7-Blockade zu erwartenden Effekt, jedoch in Konzentrationsbereichen, in denen noch kein Effekt auf den TRPM7-Kanal beschrieben wurde. Allerdings werden in diesem Konzentrationsbereich die Connexine beeinflusst, was sich ebenfalls so bemerkbar machen kann [87, 88].

Dazu passt auch das paradoxe Frequenzverhalten von Antrum und PV. Die Frequenzzunahme dieser beiden Gewebe kann durch eine Entkopplung der SMC entstehen. Durch Connexin-Blockade kontrahieren die SMC nicht mehr synchron, d.h. es entwickelt sich weniger Kraft bei höherer Frequenz. Dieses Verhalten ist typisch für Gewebe mit schlechter Kopplung,

wie es bei PV und Antrum der Fall ist. Der komplette Ausfall der ACh-induzierten Kontraktion durch Hemmung ist durch die starke Blockade des TRPC4-Kanals zu erklären.

Tabelle 13: Beobachtete Konzentrationsabhängigkeit der Effekte von Lanthan verglichen mit bekannten Effekten auf einzelne Ionenkanäle.

	1 μM	10 μM	100 μM	1000 μM	Quelle
Dosisrange	----- 5-500 μM -----				
Effekte	Frequenz \leftrightarrow Amplitude \downarrow		Frequenz \uparrow/\downarrow Amplitude \downarrow Kontraktilität \downarrow		
TRPM7					[40, 55, 56, 60]
L-Typ VDCC					
TRPM4					
Connexine					[87, 88]
TRPC4					[89]

kein Effekt/keine Daten
 Aktivierung
 leichte Hemmung
 moderate Hemmung
 starke Hemmung

Zu betonen ist, dass auch in Konzentrationsbereichen, die in anderen Studien zu einer nahezu vollständigen Blockierung von TRPM7 führten, in unseren Experimenten die Spontanaktivität zwar stark verändert, aber nicht erloschen war. Auch dies spricht gegen eine essentielle Rolle von TRPM7 in der primären Generierung der Schrittmacheraktivität.

Entsprechend des in Abschnitt 4.1.1. dargestellten Interpretationsansatzes und dem konstruierten Fließschema ergibt sich, dass die unter der Testsubstanz Lanthan beobachteten Effekte sowohl durch Blockade des TRPM7-Kanals, als auch durch nicht spezifische Effekte begründet werden können. Somit ist die Signifikanz in diesem Fall unbekannt.

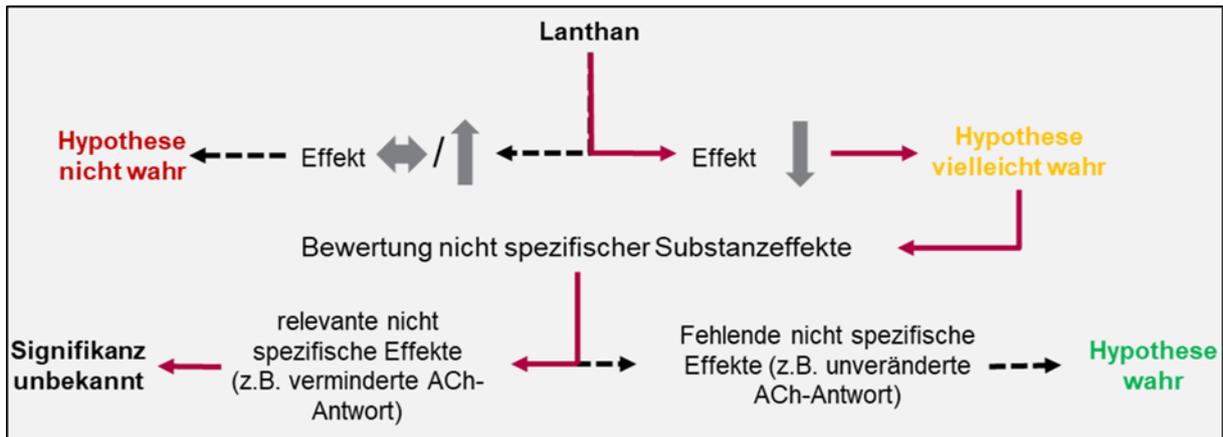


Abbildung 38: Interpretation der Ergebnisse mit Lanthan

1 mM Lanthan hemmt den TRPM7-Kanal stark. Schon vor Applikation dieser Konzentration zeigen sich deutliche Effekte auf die Spontanaktivität der glattmuskulären Gewebepreparaten. Da auch die Response der Gewebe auf KCl und ACh deutlich reduziert wird, ist die Signifikanz unbekannt.

FLUFENAMINSÄURE

Nach Applikation von 100 μM FFA sollte eine Reduktion von Frequenz und Amplitude durch die Blockade des TRPM7-Kanals beobachtet werden [14, 55, 56, 65].

Allerdings konnte in den durchgeführten Versuchsreihen schon vor dem Erreichen dieser Konzentration ein signifikanter Effekt im Sinne einer Frequenz- und Amplitudenminderung in allen Geweben beobachtet werden. Bei der Portalvene zeigte sich sogar ein vollkommener Wegfall der Aktivität.

Tabelle 14: Beobachtete Konzentrationsabhängigkeit der Effekte von Flufenaminsäure verglichen mit bekannten Effekten auf einzelne Ionenkanäle.

	1 μM	10 μM	100 μM	1000 μM	Quelle
Dosisrange	0,5-50 μM				
Effekte	Frequenz ↓ Amplitude ↓	Frequenz ↓↓ Amplitude ↓↓ Kontraktivität ↓↓			
TRPM7			leichte Hemmung	starke Hemmung	[14, 55, 56, 65]
L-Typ VDCC			leichte Hemmung	starke Hemmung	[90]
TRPM4	starke Hemmung	starke Hemmung	starke Hemmung	starke Hemmung	[91]
Connexine	leichte Hemmung	starke Hemmung	starke Hemmung	starke Hemmung	[92]
TRPC4			leichte Hemmung	starke Hemmung	[93]
Ca²⁺-aktivierte Cl-Kanäle			starke Hemmung	starke Hemmung	[91, 94]

kein Effekt/keine Daten
 Aktivierung
 leichte Hemmung
 moderate Hemmung
 starke Hemmung

Setzt man die dosisabhängigen Substanzeffekte in Zusammenhang mit den Kanalinteraktionen des FFA, so lässt sich erkennen, dass die beobachteten Effekte durch die Interaktionen mit TRPM4-Kanals sowie der Connexine zu erklären sind [91, 92]. Dabei ist besonders auffällig, dass die Gewebe sich in ihrer Kontraktionsantwort auf die Zugabe des FFA unterscheiden. Während die Amplitude bei Colon und Uterus zunächst stabil bleibt, zeigen PV und Antrum schon bei 5 μM signifikante Amplitudeneffekte. Auch hier lässt sich wieder ein Zusammenhang mit schlechterer Kopplung in Antrum und PV herstellen.

Am eingeführten Schema zeigt die Zugabe des FFA einen supprimierenden Effekt auf die Spontanaktivität des glatten Muskels. Allerdings zeigen sich eben auch KCl- und ACh-Response deutlich beeinflusst, sodass auch hier formal die Signifikanz unbekannt ist. Allerdings gilt es zu beachten, dass die beobachteten Effekte bereits bei Konzentrationen auftreten, die weit unter der IC 50 des TRPM7-Kanals liegen, sodass die hier beobachteten Effekte am ehesten auf eine Blockade im Amplifizierungsprozess und nicht im Schrittmacherprozess zurückzuführen sind.

Außerdem zeigt die Testsubstanz ausgeprägte hemmende Effekte auf Chloridkanäle. Insbesondere Ca²⁺-aktivierte Cl-Kanäle werden durch FFA gehemmt. Die IC 50 liegt zwischen 28 bis 35 μM [91, 94]. Innerhalb dieses Bereichs zeigen sich auch in der vorliegenden Versuchsreihe deutliche hemmende Effekte auf die Spontanaktivität der Gewebe. Schließlich ist FFA

die einige Substanz, die in einigen Geweben zu einem kompletten Wegfall der Spontanaktivität führt.

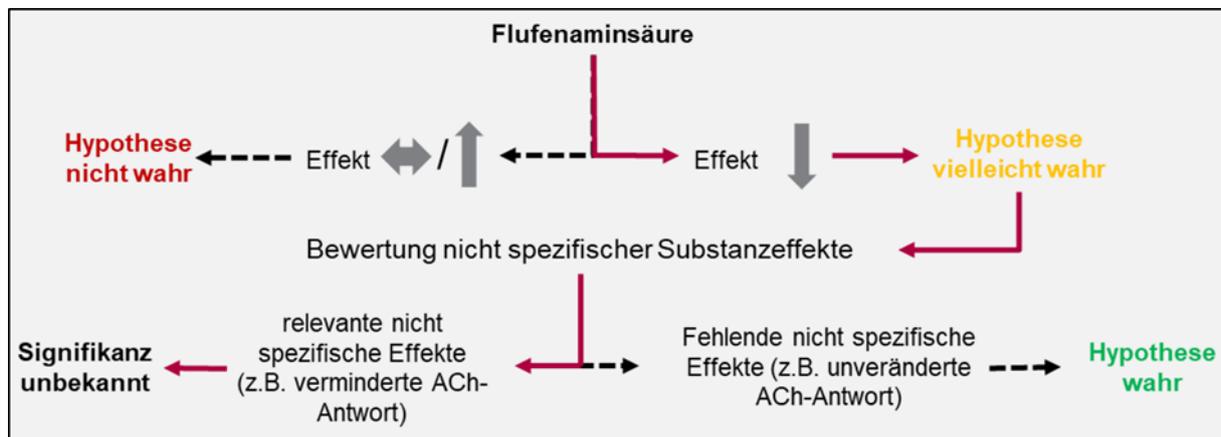


Abbildung 39: Interpretation der Ergebnisse mit FFA

100 µM FFA hemmen den TRPM7-Kanal moderat. Schon vor Applikation dieser Konzentration zeigen sich deutliche Effekte auf die Spontanaktivität der glattmuskulären Gewebepräparaten. Da auch die Response der Gewebe auf KCl und ACh deutlich reduziert wird, ist die Signifikanz unbekannt.

CHINIDIN

Ab einer Konzentration von 1 mM sollte in den getesteten Gewebe ein Effekt auf die Spontanaktivität beobachtet werden, da diese Konzentration den TRPM7-Kanal blockiert [14, 56]. Innerhalb der Versuchsreihen konnten allerdings ähnlich wie bei FFA bereits in geringeren Dosisbereichen deutliche Effekte auf Frequenz und Amplitude beobachtet werden.

Tabelle 15: Beobachtete Konzentrationsabhängigkeit der Effekte von Chinidin verglichen mit bekannten Effekten auf einzelne Ionenkanäle.

	1 µM	10 µM	100 µM	1000 µM	Quelle
Dosisrange	1-300 µM				
Effekte	Frequenz ↔ Amplitude ↓		Frequenz ↓ Amplitude ↓↓ Kontraktilität ↓		
TRPM7					[14, 56]
L-Typ VDCC					[95]
TRPM4					
Connexine					
TRPC4					[96]

kein Effekt/keine Daten
 Aktivierung
 leichte Hemmung
 moderate Hemmung
 starke Hemmung

Ab 10 μM kam es zu einer Minderung der Amplitude. In diesem Konzentrationsbereich ist eine Blockade der L-Typ VDCC beschrieben [95], die für die glattmuskuläre Kontraktionsantwort unabdingbar sind. Dies zeigte sich auch in einer deutlichen Reduktion der KCl-induzierten Kontraktionsantwort. Die ACh-induzierte Kontraktionsantwort kam in allen Geweben komplett zum Erliegen, was durch die starke Hemmung der TRPC4-Kanäle zu erklären ist [96]. Die bei 100 μM beobachtete Frequenzzunahme in Colon, Portalvene und Uterus lässt sich durch die bekannten Interaktionen der Testsubstanz Chinidin nicht erklären.

Im bekannten Schema zeigt die Zugabe des Chinidin einen supprimierenden Effekt auf die Spontanaktivität des glatten Muskels. Allerdings zeigen sich eben auch KCl- und ACh-Response deutlich beeinflusst, sodass auch hier formal die Signifikanz unbekannt ist. Allerdings gilt es zu beachten, dass die beobachteten Effekte bereits bei Konzentrationen auftreten, die weit unter der Blockade des TRPM7-Kanals liegen, sodass die hier beobachteten Effekte auf eine Blockade im Amplifizierungsprozess und nicht im Schrittmacherprozess zurückzuführen sind.

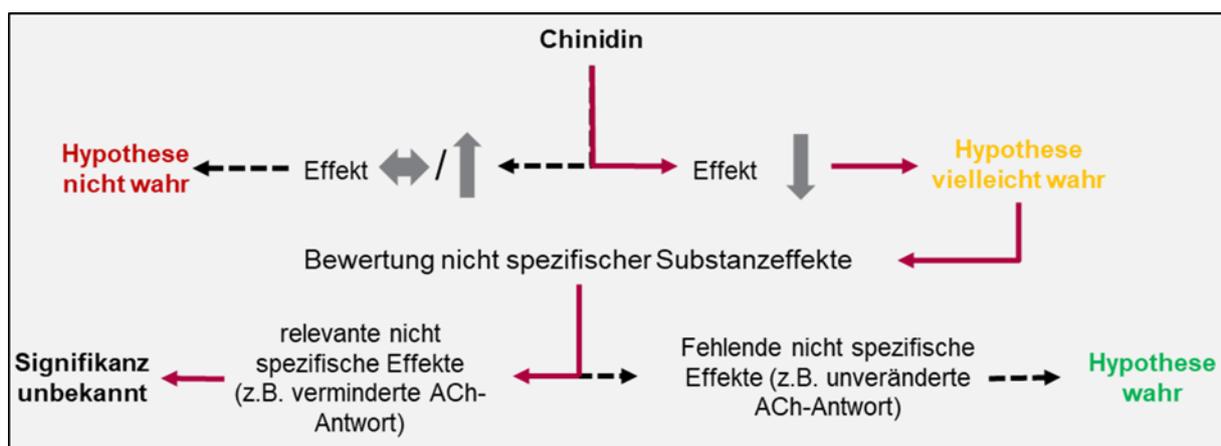


Abbildung 40: Interpretation der Ergebnisse mit Chinidin

100 μM FFA hemmen den TRPM7-Kanal moderat. Schon vor Applikation dieser Konzentration zeigen sich deutliche Effekte auf die Spontanaktivität der glattmuskulären Gewebepreparate. Da auch die Response der Gewebe auf KCl und ACh deutlich reduziert wird, ist die Signifikanz unbekannt.

4.1.3 VERGLEICH DER GEWEBESPEZIFISCHEN UNTERSCHIEDE

Ein Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse über den Schrittmacherprozess der bislang weniger untersuchten extraintestinalen Gewebe, wie in diesem Fall PV und Uterus zu sammeln. Vergleicht man die Änderungen der Spontanaktivität dieser Gewebe unter dem Einfluss der Testsubstanzen miteinander, so fällt auf, dass alle Gewebe zumindest in der Tendenz gleiche Veränderungen in ihrem Kontraktionsmuster zeigen.

Die zu beobachtenden Effekte zeigen nur wenige Unterschiede zwischen intestinalen und extraintestinalen Geweben. Dies deutet darauf hin, dass alle untersuchten Gewebe große Ähnlichkeiten im Schrittmacherprozess haben. Die zu beobachtenden Unterschiede hängen viel eher z.B. von der unterschiedlich starken Kopplungsreserve der Gewebe ab.

So zeigen Colon und Uterus ähnliche Änderungen in der Aktivität nach Zugabe der Testsubstanzen als beispielsweise Colon und Antrum, wohingegen sich das Antrum oft ähnlich verhält wie die Portalvene.

4.2 BEWERTUNG DER FLUORESCENZSMIKROSKOPISCHEN MESSUNGEN

4.2.1 ZELLMORPHOLOGIE

Da für die Erstellung der Primärkultur die Muscularis aus dem Bereich Corpus/Antrum des Rattenmagens entnommen wurde, konnte eine Zellkultur mit unterschiedlichen Zelltypen und nicht ausschließlich mit ICCs erwartet werden.

Neben ICC enthält die Kultur

- Myozyten, da es sich um glattes Muskelgewebe handelt.
- Fibroblasten, da diese im Bindegewebe der Proben enthalten sind und zudem im Allgemeinen eine höhere Wachstumsrate aufweisen als andere Zelltypen.

Zur morphologischen Differenzierung dieser Zelltypen wurden diese nach Fixierung unter dem Mikroskop im Phasenkontrast betrachtet. ICC-MY sind an ihrem sternförmigen Zellkörper zu erkennen. Es gibt sehr wenig perinukleäres Cytoplasma. Sie bilden mehrere feine Fortsätze, die in engem Kontakt mit Fortsätzen anderer ICC stehen [97]. Myozyten sind spindelförmig und bilden selten Ausläufer. Der Zellkern ist oval bzw. langgezogen. Sie wachsen in paralleler Ausrichtung und hoher Dichte [98]. Fibroblasten können in vielfältigen Formen auftreten, sowohl gestreckt als auch sternförmig. Sie haben einen flachen Zellkörper und bilden Ausläufer. Der Zellkern ist groß und rund.

Die im Rahmen dieser Arbeit angelegten Zellkulturen beinhalteten alle diese Zelltypen. Das verwendete Protokoll wurde auf Grundlage verschiedener publizierter Protokolle zur Gewinnung kultivierter ICC entwickelt. Im Gegensatz zu diesen konnten wir auch ohne Zusatz spezieller Wachstumsfaktoren kulturelle aktive ICC erzeugen.

Den wichtigsten Indikator dafür, dass die von uns kultivierten und für die Versuche verwendeten Zellen auch tatsächlich funktionsfähige ICC enthielten, liefert das Charakteristikum der Spontanaktivität, welches durch die oszillierenden Ca^{2+} -Signale in den einzelnen Zellen dargestellt werden konnte. Denn weder Myozyten noch Fibroblasten weisen die Eigenschaft der endogenen Rhythmizität auf.

4.2.2 FREQUENZ UND RHYTHMIK

Innerhalb der konfokalmikroskopischen Messungen konnten spontanaktive Zellen identifiziert werden. Die mittlere Frequenz der Ca^{2+} -Oszillationen liegt mit 1,4/min im unteren Bereich der durchschnittlichen Frequenz der phasisch rhythmischen mechanischen Aktivität unter isometrischen Bedingungen im Organbad (3/min) bzw. der publizierten Frequenz der Slow Waves im Rattenmagen, die gemessen mit extrazellulären Elektroden zwischen 1,3 bis 5,3/min lag [99].

Auch die Rhythmik der Ca^{2+} -Oszillationen entsprach den durchgehenden oszillierenden Kraftänderungen des Antrums bei den Versuchen im Organbad.

4.2.3 EFFEKTE DER TESTSUBSTANZEN AUF DIE SPONTANAKTIVITÄT

Da innerhalb der Organbadversuche lediglich die Kraft als Gradmesser von Effekten zur Verfügung stand, konnten Effekte, die einseitig auf den kontraktile Prozess wirkten, nicht von solchen abgegrenzt werden, die über Effekte an Ionenkanälen die Erregbarkeit und damit schließlich indirekt die Mechanik veränderten. Um Effekte auf die spontanen Rhythmen unter Umgehung der chemisch-mechanischen Kopplung beobachten zu können, wurde die Methode des Ca^{2+} -Imaging an primären Zellkulturen als weiterer Ansatz ausgewählt.

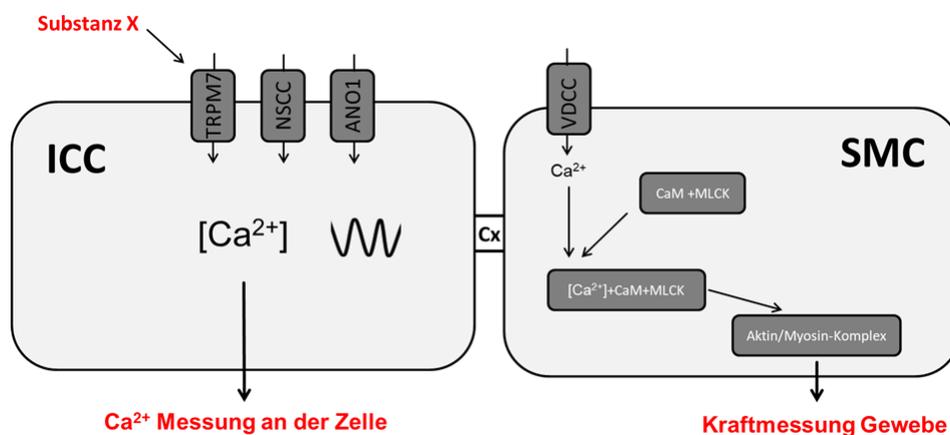


Abbildung 41: Darstellung der gemessenen Endpunkte in Organbad und Konfokalmikroskopie

Der Beweis, dass es sich bei den von uns kultivierten bzw. gemessenen Zellen tatsächlich um ICC handelt, wurde nicht direkt, sondern indirekt durch den Nachweis von spontanen Ca^{2+} -Oszillationen erbracht. Dass diese Aktivität nicht zufällige Oszillationen oder eine rhythmische Ebenendrift ist, konnte durch die Temperatursensitivität dieser Zellen gezeigt werden. Bei einer Abnahme der Temperatur unter $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ kam die Spontanaktivität zum Erliegen. Diese starke Temperaturabhängigkeit wurde auch für eine glattmuskulären mechanischen Spontanaktivität beschrieben [71].

Zur Blockade des TRPM7-Kanals in den kultivierten Zellen wurden die Testsubstanzen Spermin und Lanthan ausgewählt, da für diese die meisten Referenzen zur Blockade des Kanals in der Literatur vorlagen. Für Spermin wurde eine Konzentration von $700\text{ }\mu\text{M}$ gewählt. Dieser Wert entspricht der höchsten Konzentration, die innerhalb der Organbadexperimente getestet wurde und liegt weit über der für den TRPM7-Kanal inhibierenden IC_{50} (vgl. Tab.1).

Nach Zugabe der Testsubstanz Spermin wurden keine Effekte auf die Ca^{2+} -Oszillationen beobachtet. Weder die Frequenz noch die Amplitude zeigten signifikante Unterschiede zur Messung unter Kontrollbedingungen.

Diese Tatsache bekräftigt die Ergebnisse der Organbadexperimente. Zwar konnten dort moderate Effekte auf die Amplitude der Aktivität festgestellt werden, die jedoch durch die nicht-spezifischen Wirkungen des Spermin in hohen Dosisbereichen erklärbar waren. Die Frequenz der Aktivität blieb sowohl am intakten Muskelpräparat als auch an der primären Zellkultur unbeeinflusst. Eine trotz Blockade des Kanals fehlende Beeinflussung der mechanischen Spontanaktivität und spontanen Ca^{2+} -Oszillationen belegen deutlich, dass der TRPM7-Kanal nicht die initiierende Stromkomponente im Schrittmacherprozess sein kann.

Die Testsubstanz Lanthan wurde in einer Konzentration von 1 mM gewählt, da dies der bekannten IC_{50} für den TRPM7-Strom entspricht [40]. Lanthan zeigte auf die Ca^{2+} -Oszillationen einen schwachen Effekt mit größerer Beeinflussung der Amplitude als der Frequenz. Daraus lässt sich folgern, dass die Blockade des TRPM7-Kanals in isolierten ICC keinen Effekt auf die Aktivität hat.

4.3 FEHLERQUELLEN UND LIMITATIONEN DER METHODIK

4.3.1 ORGANBAD

Das Organbad ist eine probate Methode, den glatten Muskel non-invasiv unter annähernd physiologischen Bedingungen hinsichtlich seiner pharmakologischen Beeinflussung zu studieren.

Um zufällige Messfehler so gering wie möglich zu halten, wurden alle Einflussgrößen des Organbades sorgfältig überwacht. Hierzu zählten die Konstanthaltung der Temperatur auf 37 °C, die Sicherstellung der Begasung und die vor Versuchsbeginn stets frisch zubereitete modifizierte Krebslösung. Ferner wurden vor jedem Versuch die zur Kraftmessung genutzten mechanischen Transducer mit einem Gewicht geeicht.

Durch die Methode des Organbades ist es möglich, den glatten Muskel in seiner Gesamtheit, d.h. Myozyten, ICC und Neurone zu untersuchen. Allerdings stehen zur pharmakologischen Blockade des TRPM7-Kanals zwar potente, aber gleichzeitig auch unselektive Substanzen zur Verfügung, sodass durch den Einsatz der Testsubstanzen auch einige für die Kontraktilität des glatten Muskels wichtige Ionenkanäle oder Rezeptoren beeinflusst werden. Aus diesem Grund konnten die beobachteten Effekte in vielen Fällen nicht zweifelsfrei den SMC oder ICC zugeordnet werden, sodass erweiterte Untersuchungen notwendig waren, um eine klare Aussage über den Stellenwert des TRPM7-Kanals im Pacemaking zu treffen.

Im Vergleich zu den Voruntersuchungen der Forschungsgruppe *Kim et al.*, deren Ergebnisse deutliche Abweichungen zu den innerhalb dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse zeigten, gibt es Unterschiede in der verwendeten Spezies, dem Alter der Tiere sowie dem untersuchten Gewebe [14]. Die folgende Tabelle fasst die Unterschiede zusammen:

Tabelle 16: Vergleich der verwendeten Gewebe

	Spezies	Alter	Gewebe
<i>Kim et al.</i>	BALB/c mice	8-13 Tage	Dünndarm
vorliegende Versuche	Wistar Ratten	200-250 Tage	Magen, Colon, PV, Uterus

4.3.2 ZELLKULTUR

Die Zellkultur bietet im Vergleich zum Organbad zwar eine Methode, mit der man einzelne Zelltypen, wie in diesem Fall die ICC, isoliert betrachten und pharmakologisch beeinflussen kann, allerdings ist diese damit auch wenig physiologisch. Um dennoch möglichst gering veränderte Zellen zu messen, wurde die Herstellung von primären Zellkulturen der Verwendung von permanenten Linien vorgezogen. Durch die enzymatische Behandlung der Kulturen kann es zu einem Verlust der Oberflächenproteine, einschließlich c-Kit kommen [100]. Allerdings ist bekannt, dass Ionenströme auch in primärer Zellkultur verändert werden können [101-103].

Zur Herstellung der Zellkultur wurde ausschließlich Gewebe aus dem Bereich des Magens (Corpus-/Antrumbereich) entnommen. Grund dafür, dass nur dieses Gewebe verwendet wurde, war zum einen die Tatsache, dass das Gewebe dort steril entnommen werden kann. Die Sterilität ist eine wichtige Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Etablierung einer Zellkultur. Zum anderen ist die Grundfrequenz des Magens hoch und damit auch unter instabileren Bedingungen besser zu beobachten als es beispielsweise beim Uterus der Fall ist (vgl. Abb. 10).

Zu berücksichtigen ist außerdem, dass die Ausbeute der tatsächlich aktiven Zellkulturen gering war und daher nur eine geringe Anzahl an Zellkulturen für die fluoreszenzmikroskopischen Messungen herangezogen werden konnte. Grund für die geringe Anzahl an untersuchten Präparaten war unter anderem auch der hohe Zeitaufwand zur Etablierung der ohne äußerlich zugesetzten Wachstumsfaktor spontanaktiven Zellkultur.

Eine weitere Schwierigkeit bei den Messungen am Konfokalmikroskop war die Temperaturkontrolle. Im Vergleich zu den Organbadversuchen zeigte sich die Temperatur stets ca. 4 °C geringer. Dies erklärt die Frequenzunterschiede, die sich zwischen Organbad und Konfokalmikroskop ergaben, da die Frequenz unmittelbar von der Temperatur abhängig ist [71].

V. **SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK**

Zwar konnten unter Einfluss der Testsubstanzen Spermin, Lanthan, FFA und Chinidin ausgeprägte Effekte auf die mechanische Spontanaktivität der unterschiedlichen Gewebe beobachtet werden, dennoch kann in der Zusammenschau der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten nicht die Modulation des TRPM7-Kanals der Grund für diese Effekte sein. Die Ergebnisse der Untersuchungen ergeben keine Hinweise darauf, dass der TRPM7-Kanal eine Schlüsselfunktion im Pacemaking der untersuchten Organe einnimmt. Vielmehr sind die beobachteten Effekte durch die Beeinflussung anderer, bereits bekannter Ionenkanäle zu erklären.

Ein knock down des Kanals unter den hier getesteten Kulturbedingungen könnte weitere wichtige Ergebnisse liefern, da durch diese Methode das TRPM7-Protein selektiv ausgeschaltet wird und die gewählte Kulturmethode möglicherweise repräsentativer für das biologische Verhalten der Organe im adulten Tier ist.

Ein von der der Forschungsgruppe *Kim et al.* publizierter knock down des TRPM7-Kanals führte zwar zu einem kompletten Verlust der elektrischen Spontanaktivität an kultivierten ICC, allerdings zeigt die in der Literatur dargestellte Registrierung eine deutliche Verschiebung des Membranpotenzials. Während die Kontrollmessung noch ein Membranpotenzial der ICC zwischen -70 bis -20mV zeigte, betrug es nach dem knock down zwischen -36 bis -20mV [14].

Diese Verschiebung könnte einerseits neben zahlreichen anderen Effekten dazu führen, dass die für die aufsteigende Phase verantwortlichen, spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle bereits inaktiviert sind und somit keine weitere Depolarisation der ICC möglich machen, sodass es in der Folge zu keiner Aktivität der ICC kommt. Andererseits kann eine derartig starke, dauerhafte Abweichung der Zelle von ihrem physiologischen Membranpotenzial schlicht Ausdruck einer schweren Störung des allgemeinen Zellmetabolismus sein, z.B. durch eine dysregulierte Magnesiumhomöostase. Der Wegfall der PP wäre in diesem Fall eher als eines von vielen möglichen Symptomen der Zellschädigung zu interpretieren und passt nicht in die postulierte Funktion des TRPM7-Kanals als Schrittmacher der Spontanaktivität.

Alles in allem sind also weitere Untersuchungen notwendig, um den genauen Mechanismus des Pacemaking im glatten Muskel erklären zu können. Die eingangs dieser Arbeit formulierte These, dass der TRPM7-Kanal ein zentrales Element des Pacemaking im glatten Muskel sein könnte, konnte sich aufgrund der dargestellten Untersuchungsbefunde dieser Arbeit nicht bestätigen.

VI. LITERATUR

1. Goyal RK, Chaudhury A (2008) Physiology of normal esophageal motility. *J Clin Gastroenterol* 42(5): 610–619.
 2. Toouli J (1984) Sphincter of Oddi motility. *Br J Surg* 71(4): 251-256
 3. Lang RJ, Davidson ME, Exintaris B (2002) Pyeloureteral motility and ureteral peristalsis: essential role of sensory nerves and endogenous prostaglandins. *Exp Physiol* 87(2): 129-146
 4. van Helden DF (1993) Pacemaker potentials in lymphatic smooth muscle of the guinea-pig mesentery. *J Physiol* 471: 465-479
 5. Bortoff A (1976) Myogenic control of intestinal motility. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS* 56(2): 418-434
 6. Axelsson J, Wahlstrom B, Johansson B et al. (1967) Influence of the ionic environment on spontaneous electrical and mechanical activity of the rat portal vein. *Circ Res* 21(5): 609-618
 7. Bengtsson B, Chow EM, Marshall JM (1984) Activity of circular muscle of rat uterus at different times in pregnancy. *Am J Physiol* 246(3 Pt 1): C216-23
 8. Bayliss WM, Starling EH (1899) The movements and innervation of the small intestine. *J Physiol* 24(2): 99-143
 9. Hungin APS, Whorwell PJ, Tack J et al. (2003) The prevalence, patterns and impact of irritable bowel syndrome: an international survey of 40,000 subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 17(5): 643-650
 10. Bomzon A, Huang YT (2001) Vascular smooth muscle cell signaling in cirrhosis and portal hypertension. *Pharmacol Ther* 89(3): 255-272
 11. Shafik A, Shafik I, El-Sibai O et al. (2004) Vesical pacing in patients with overactive bladder: Technique and results. *Int Urol Nephrol* 36(1): 29-34
 12. Huizinga JD, Thuneberg L, Vanderwinden JM et al. (1997) Interstitial cells of Cajal as targets for pharmacological intervention in gastrointestinal motor disorders. *Trends Pharmacol Sci* 18(10): 393-403
 13. Kim BJ (2009) Identification of TRPM7 channels in human intestinal interstitial cells of Cajal. *WJG* 15(46): 5799.
 14. Kim BJ, Lim H-H, Yang DK et al. (2005) Melastatin-type transient receptor potential channel 7 is required for intestinal pacemaking activity. *Gastroenterology* 129(5): 1504-1517.
 15. Minke B (2010) The history of the Drosophila TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *J Neurogenet* 24(4): 216-233.
-

16. Golenhofen K (1976) Spontaneous activity and functional classification of mammalian smooth muscle. In: Bulbring E, Shuba MF (eds) *Physiology of Smooth Muscle*: pp 91-97
 17. Schuster MM, Crowell MD, Koch KL (2002) *Atlas of gastrointestinal motility*, 2nd ed. B C Decker, Hamilton, Ont., London
 18. Edwards FR, Hirst GD, Suzuki H (1999) Unitary nature of regenerative potentials recorded from circular smooth muscle of guinea-pig antrum. *J Physiol* 519 Pt 1: 235-250
 19. Kito Y, Suzuki H, Edwards FR (2002) Properties of unitary potentials recorded from myenteric interstitial cells of Cajal distributed in the guinea-pig gastric antrum. *J Smooth Muscle Res* 38(6): 165-179
 20. Thuneberg L. Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology* 1982(71): 1-130
 21. Sanders, Ordog, Koh et al. (1999) Development and plasticity of interstitial cells of Cajal. *Neurogastroenterol Motil* 11(5): 311–338. doi: 10.1046/j.1365-2982.1999.00164.x
 22. Burns AJ, Herbert TM, Ward SM et al. (1997) Interstitial cells of Cajal in the guinea-pig gastrointestinal tract as revealed by c-Kit immunohistochemistry. *Cell Tissue Res* 290(1): 11-20
 23. Barajas-Lopez C, Berezin I, Daniel EE et al. (1989) Pacemaker activity recorded in interstitial cells of Cajal of the gastrointestinal tract. *Am J Physiol* 257(4 Pt 1): C830-5
 24. Cajal R (1893) Sur les ganglions et plexus nerveux d'intestin. *C R Soc Biol, Paris*
 25. Daniel EE, Wang YF (1999) Gap junctions in intestinal smooth muscle and interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech* 47(5): 309-320.
 26. Cousins HM, Edwards FR, Hickey H et al. (2003) Electrical coupling between the myenteric interstitial cells of Cajal and adjacent muscle layers in the guinea-pig gastric antrum. *J Physiol* 550(Pt 3): 829–844.
 27. Dickens EJ, Hirst GD, Tomita T (1999) Identification of rhythmically active cells in guinea-pig stomach. *J Physiol* 514 (Pt 2): 515-531
 28. Patejdl R, Noack T (2010) The propagation of excitation in portal vein smooth muscle – evidence for coupled “Hot Spots”. *TE* 27(10): 202-208.
 29. Sims SM, Daniel EE, Garfield RE (1982) Improved electrical coupling in uterine smooth muscle is associated with increased numbers of gap junctions at parturition. *J Gen Physiol* 80(3): 353-375
 30. Sanders KM, Koh SD, Ward SM (2006) Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol* 68: 307-343.
 31. Lees-Green R, Du P, O'Grady G et al. (2011) Biophysically based modeling of the interstitial cells of cajal: current status and future perspectives. *Front Physiol* 2: 29.
 32. Sanders KM, Ordog T, Koh SD et al. (2000) A Novel Pacemaker Mechanism Drives Gastrointestinal Rhythmicity. *News Physiol Sci* 15: 291-298
-

33. Koh, S.D., Jun, J.Y., Kim, T.W., Sanders, K.M.a (2002) A Ca²⁺-inhibited non-selective cation conductance contributes to pacemaker currents in mouse interstitial cell of Cajal. Blackwell Science Inc
 34. Huizinga JD, Zhu Y, Ye J et al. (2002) High-conductance chloride channels generate pacemaker currents in interstitial cells of Cajal. *Gastroenterology* 123(5): 1627-1636
 35. Hirst GDS, Bramich NJ, Teramoto N et al. (2002) Regenerative component of slow waves in the guinea-pig gastric antrum involves a delayed increase in Ca²⁺(i) and Cl⁻ channels. *J Physiol* 540(Pt 3): 907-919
 36. Kunzelmann K, Tian Y, Martins JR et al. (2011) Anoctamins. *Pflugers Arch* 462(2): 195-208.
 37. Goto K, Matsuoka S, Noma A (2004) Two types of spontaneous depolarizations in the interstitial cells freshly prepared from the murine small intestine. *J Physiol* 559(Pt 2): 411–422.
 38. Takeda Y, Koh SD, Sanders KM et al. (2008) Differential expression of ionic conductances in interstitial cells of Cajal in the murine gastric antrum. *J Physiol* 586(3): 859-873.
 39. Jin J, Desai BN, Navarro B et al. (2008) Deletion of Trpm7 disrupts embryonic development and thymopoiesis without altering Mg²⁺ homeostasis. *Science* 322(5902): 756-760.
 40. Monteilh-Zoller MK, Hermosura MC, Nadler MJS et al. (2003) TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *J Gen Physiol* 121(1): 49-60
 41. Li M, Jiang J, Yue L (2006) Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7. *J Gen Physiol* 127(5): 525-537.
 42. Kozak JA, Kerschbaum HH, Cahalan MD (2002) Distinct properties of CRAC and MIC channels in RBL cells. *J Gen Physiol* 120(2): 221-235
 43. Penner R, Fleig A (2007) The Mg²⁺ and Mg²⁺-nucleotide-regulated channel-kinase TRPM7. *Handb Exp Pharmacol*(179): 313-328.
 44. Paravicini TM, Chubanov V, Gudermann T (2012) TRPM7: a unique channel involved in magnesium homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* 44(8): 1381-1384.
 45. Dal Santo P, Logan MA, Chisholm AD et al. (1999) The inositol trisphosphate receptor regulates a 50-second behavioral rhythm in *C. elegans*. *Cell* 98(6): 757-767
 46. Vriens J, Owsianik G, Voets T et al. (2004) Invertebrate TRP proteins as functional models for mammalian channels. *Pflugers Arch* 449(3): 213-226.
 47. Patejdl R, Noack T (2015) Melastatin – type transient receptor potential channel 7 (TRPM7) function in smooth muscle. *TE* 32(04): 97-104.
 48. Weiner H, Wang TT, Farres J et al. (1989) Precursors and post translational modification of mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Prog Clin Biol Res* 290: 81-92
 49. Pegg AE (1986) Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem J* 234(2): 249-262
-

50. Tabor CW, Tabor H (1984) Polyamines. *Annu Rev Biochem* 53: 749–790.
 51. Casero RA, Pegg AE (1993) Spermidine/spermine N1-acetyltransferase--the turning point in polyamine metabolism. *FASEB J* 7(8): 653-661
 52. Fakler B, Brandle U, Glowatzki E et al. (1995) Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K⁺ channels is caused by intracellular spermine. *Cell* 80(1): 149-154
 53. Williams K (1997) Modulation and block of ion channels: a new biology of polyamines. *Cell Signal* 9(1): 1-13
 54. Kerschbaum HH, Kozak JA, Cahalan MD (2003) Polyvalent cations as permeant probes of MIC and TRPM7 pores. *Biophys J* 84(4): 2293-2305.
 55. Guilbert A, Gautier M, Dhennin-Duthille I et al. (2009) Evidence that TRPM7 is required for breast cancer cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 297(3): C493-502.
 56. Jiang X, Newell EW, Schlichter LC (2003) Regulation of a TRPM7-like current in rat brain microglia. *J Biol Chem* 278(44): 42867-42876.
 57. Hochstrate P (1989) Lanthanum mimicks the trp photoreceptor mutant of *Drosophila* in the blowfly *Calliphora*. *J Comp Physiol A* 166(2): 179-187
 58. Halaszovich CR, Zitt C, Jungling E et al. (2000) Inhibition of TRP3 channels by lanthanides. Block from the cytosolic side of the plasma membrane. *J Biol Chem* 275(48): 37423-37428.
 59. Runnels LW, Yue L, Clapham DE (2001) TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science* 291(5506): 1043-1047.
 60. Zhang Y-H, Sun H-Y, Chen K-H et al. (2012) Evidence for functional expression of TRPM7 channels in human atrial myocytes. *Basic Res Cardiol* 107(5): 282.
 61. Flower RJ (1974) Drugs which inhibit prostaglandin biosynthesis. *Pharmacol Rev* 26(1): 33-67
 62. Ravi S, Keat AC, Keat EC (1986) Colitis caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Postgrad Med J* 62(730): 773-776
 63. Lee J, Kim YD, Park CG et al. (2012) Neurotensin modulates pacemaker activity in interstitial cells of Cajal from the mouse small intestine. *Mol Cells* 33(5): 509-516.
 64. Han S, Kim JS, Jung BK et al. (2012) Effects of ginsenoside on pacemaker potentials of cultured interstitial cells of Cajal clusters from the small intestine of mice. *Mol Cells* 33(3): 243-249.
 65. Guinamard R, Paulais M, Lourdel S et al. (2012) A calcium-permeable non-selective cation channel in the thick ascending limb apical membrane of the mouse kidney. *Biochim Biophys Acta* 1818(5): 1135-1141.
 66. Imaizumi Y, Giles WR (1987) Quinidine-induced inhibition of transient outward current in cardiac muscle. *Am J Physiol* 253(3 Pt 2): H704-8
-

67. Holzer P (2011) Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system. *Pharmacol Ther* 131(1): 142-170.
 68. Fastier, F.N., Reid C.S.W. (1949) "Constant Flow" organ-bath techniques. *Brit. J. Pharmacol.*(4): 109-110
 69. K. Golenhofen „Untersuchungen am isolierten glatten Muskel“. In: Weinheim, Weinheim-Deerfield Beach, Florida-Basel, Wienbeck, M; Lux, G, 1983Gastrointestinale Motilität-klinische Untersuchungsmethoden Edition Medizin, pp 139-149
 70. Yurtcu N, Cetin A, Karadas B et al. (2006) Comparison of effects of formoterol and BRL 37344 on isolated term-pregnant rat myometrial strips in vitro. *Eur J Pharmacol* 530(3): 263-269.
 71. Loh, v. D. und Golenhofen K. (1970) Temperatureinflüsse auf die Spontanaktivität der isolierten Taenia coli vom Meerschweinchen. *Pflügers Arch.*(Bd. 318): 35-50
 72. Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter J.D. und Hermann, B. (1999) Measurement of Intracellular Calcium. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS* Vol. 79(No. 4)
 73. Kao JP, Harootunian AT, Tsien RY (1989) Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3. *J Biol Chem* 264(14): 8179-8184
 74. Yokogawa Electric Corporation Confocal Laser Microscope Scanner and CCD Camera
 75. Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD et al. (1999) Measurement of intracellular calcium. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS* 79(4): 1089-1125
 76. Koh SD, Sanders KM, Ward SM (1998) Spontaneous electrical rhythmicity in cultured interstitial cells of cajal from the murine small intestine. *J Physiol* 513 (Pt 1): 203-213
 77. Golenhofen K, Lammel E (1972) Selective suppression of some components of spontaneous activity in various types of smooth muscle by iproveratril (Verapamil). *Pflugers Arch* 331(3): 233-243
 78. Earley S (2013) TRPM4 channels in smooth muscle function. *Pflugers Arch* 465(9): 1223-1231.
 79. Dwyer L, Rhee P-L, Lowe V et al. (2011) Basally activated nonselective cation currents regulate the resting membrane potential in human and monkey colonic smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301(2): G287-96.
 80. Kim YC, Kim SJ, Sim JH et al. (1998) Suppression of the carbachol-activated nonselective cationic current by antibody against alpha subunit of Go protein in guinea-pig gastric myocytes. *Pflugers Arch* 436(3): 494-496
 81. Nilius B, Prenen J, Droogmans G et al. (2003) Voltage dependence of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4. *J Biol Chem* 278(33): 30813-30820.
 82. Sanders KM (2008) Regulation of smooth muscle excitation and contraction. *Neurogastroenterol Motil* 20 Suppl 1: 39-53.
-

83. Ullrich ND, Voets T, Prenen J et al. (2005) Comparison of functional properties of the Ca^{2+} -activated cation channels TRPM4 and TRPM5 from mice. *Cell Calcium* 37(3): 267-278.
 84. Nilius B, Prenen J, Voets T et al. (2004) Intracellular nucleotides and polyamines inhibit the Ca^{2+} -activated cation channel TRPM4b. *Pflugers Arch* 448(1): 70-75.
 85. Skatchkov SN, Bukauskas FF, Benedikt J et al. (2015) Intracellular spermine prevents acid-induced uncoupling of Cx43 gap junction channels. *Neuroreport* 26(9): 528-532.
 86. Kim J, Moon SH, Shin Y-C et al. (2016) Intracellular spermine blocks TRPC4 channel via electrostatic interaction with C-terminal negative amino acids. *Pflugers Arch* 468(4): 551-561.
 87. Martinez-Palomo A, Benitez D, Alanis J (1973) Selective deposition of lanthanum in mammalian cardiac cell membranes. Ultrastructural and electrophysiological evidence. *J Cell Biol* 58(1): 1-10
 88. Brokamp C, Todd J, Montemagno C et al. (2012) Electrophysiology of single and aggregate Cx43 hemichannels. *PLoS One* 7(10): e47775.
 89. Walker RL, Koh SD, Sergeant GP et al. (2002) TRPC4 currents have properties similar to the pacemaker current in interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Cell Physiol* 283(6): C1637-45.
 90. Shimamura K, Zhou M, Ito Y et al. (2002) Effects of flufenamic acid on smooth muscle of the carotid artery isolated from spontaneously hypertensive rats. *J Smooth Muscle Res* 38(1-2): 39-50
 91. Guinamard R, Simard C, Del Negro C (2013) Flufenamic acid as an ion channel modulator. *Pharmacol Ther* 138(2): 272–284.
 92. Harks EG, Roos AD de, Peters PH et al. (2001) Fenamates: a novel class of reversible gap junction blockers. *J Pharmacol Exp Ther* 298(3): 1033-1041
 93. Jiang H, Zeng B, Chen G-L et al. (2012) Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs and new fenamate analogues on TRPC4 and TRPC5 channels. *Biochem Pharmacol* 83(7): 923-931.
 94. White MM, Aylwin M (1990) Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca^{2+} -activated Cl^- channels in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol* 37(5): 720-724
 95. Scamps F, Undrovinas A, Vassort G (1989) Inhibition of I_{Ca} in single frog cardiac cells by quinidine, flecainide, ethmozin, and ethacizin. *Am J Physiol* 256(3 Pt 1): C549-59
 96. So I, Kim KW (2003) Nonselective cation channels activated by the stimulation of muscarinic receptors in mammalian gastric smooth muscle. *J Smooth Muscle Res* 39(6): 231-247
 97. Iino S, Horiguchi K (2006) Interstitial cells of Cajal are involved in neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Acta Histochem Cytochem* 39(6): 145-153.
-

98. Chamley JH, Campbell GR, Burnstock G (1974) Dedifferentiation, redifferentiation and bundle formation of smooth muscle cells in tissue culture: the influence of cell number and nerve fibres. *J Embryol Exp Morphol* 32(2): 297-323
99. Wang X-Y, Lammers WJEP, Bercik P et al. (2005) Lack of pyloric interstitial cells of Cajal explains distinct peristaltic motor patterns in stomach and small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289(3): G539-49.
100. Fausson-Pellegrini MS, Thuneberg L (1999) Guide to the identification of interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech* 47(4): 248-266.
101. Mitcheson JS, Hancox JC, Levi AJ (1996) Action potentials, ion channel currents and transverse tubule density in adult rabbit ventricular myocytes maintained for 6 days in cell culture. *Pflugers Arch* 431(6): 814-827
102. Thio CL, Waxman SG, Sontheimer H (1993) Ion channels in spinal cord astrocytes in vitro. III. Modulation of channel expression by coculture with neurons and neuron-conditioned medium. *J Neurophysiol* 69(3): 819-831
103. Ihara E, Hirano K, Hirano M et al. (2002) Mechanism of down-regulation of L-type Ca²⁺ channel in the proliferating smooth muscle cells of rat aorta. *J Cell Biochem* 87(2): 242-251.

VII. ANHANG

7.1 VERÖFFENTLICHUNGEN

VORTRÄGE:

C. Adams, R. Patejdl, Th. Noack: Die Effekte von TRPM7-Kanalmodulatoren auf die Kontraktilität und Spontanaktivität der Portalvene. 44. Rostocker Gespräche über kardiovaskuläre Funktion und Hypertonie, Rostock, 04.07.2015

C. Adams, R. Patejdl, Th. Noack: Die Effekte von NSCC-Blockern und TRPM7-Kanalmodulatoren auf Kontraktilität und Spontanaktivität glatter Muskulatur. Treffen der Ostseephysiologen, Kiel, 12.10.2016

C. Adams, R. Patejdl, Th. Noack: The effects of cation channel blockers and TRPM7 modulators on contractility and phasic activity of smooth muscle. 8th Lübeck Workshop on Smooth Muscle Function, Lübeck, 12.12.2016

ABSTRACTS:

R. Patejdl, C. Adams: The role of non-specific cation channels in spontaneous activity and tone of smooth muscle. Acta Physiologica Volume 216, Supplement 707/März 2016

POSTER:

R. Patejdl, C. Adams, L. Wobig, Th. Noack: The role of non-specific cation channels in spontaneous activity and tonic contractions of smooth muscle. 94. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Magdeburg, 10.04.2015

R. Patejdl, C. Adams, Th. Noack: Tissue specific roles of non-selective cation channels in spontaneous and agonist-induced contraction of smooth muscle. 95. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Lübeck, 03.03.2016

7.2 LEBENS LAUF

Daten zur Person

Name	Carolin Mestermann geb. Adams
Anschrift	Böckelmannstr. 6, 59581 Warstein-Hirschberg
Geburtsdatum	18.10.1990 in Warstein
Familienstand	verheiratet

Schulische Ausbildung

1997–2001	St. Christophorus Grundschule Hirschberg
2001–2010	Gymnasium der Stadt Warstein Abschluss: Allgemeiner Hochschulreife
2010-2011	Westfalenakademie Lippstadt-Dedinghausen Abschluss: Staatlich geprüfte Rettungsassistentin

Akademische Laufbahn

10/2011	Studium der Humanmedizin, Universität Rostock
bis	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Frühjahr 2014
12/2018	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Herbst 2017 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Herbst 2018
11/2017	Praktisches Jahr
bis	1. Terial: Inselspital Bern- Innere Medizin
10/2018	2. Terial: St. Vincenz Krankenhaus, Paderborn- Anästhesiologie 3. Terial: Klinikum Hochsauerland, Arnsberg- Chirurgie
04/2014	Promotion am Oscar Langendorff Institut für Physiologie, Rostock
bis	„Die Bedeutung des TRPM7-Kanals auf die Spontanaktivität der glatten Mus-
12/2018	kulatur“

Beruflicher Werdegang

01/2019	Klinik für Anästhesiologie, Klinikum Hochsauerland Arnsberg
bis	Facharztweiterbildung
heute	

7.3 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden.

Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)

7.4 DANKSAGUNG

Ohne die Unterstützung vieler Personen wäre diese Dissertationsschrift nie zustande gekommen. Daher möchte ich mich an dieser Stelle bei einigen Personen bedanken:

Allen voran gilt ein großer Dank Prof. Dr. Thomas Noack, der es mir ermöglicht hat, die Forschungsarbeiten für diese Dissertationsschrift durchzuführen und der mir mit seiner Denkweise stets neue Impulse für diese Arbeit gegeben hat.

Auch bei Dr. med. Robert Patejdl möchte ich mich herzlich für den Vorschlag dieses spannenden Themas, den unermüdlichen Einsatz und die fortwährende Diskussionsbereitschaft bedanken, die maßgeblich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Allen Mitarbeitern des Instituts, namentlich Dipl.-Chemikerin Katrin Porath und Dipl.-Biologin Tina Sellmann danke ich für die stetige Hilfsbereitschaft und das angenehme Miteinander. Ebenso bedanke ich mich bei meinen Mitdoktoranden für die Motivation und Unterhaltung während der Labortage.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meiner gesamten Familie und meinem Ehemann Thomas aussprechen, die mich während meines gesamten Studiums sowie bei der Verfassung dieser Arbeit in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

THESEN DER DISSERTATION

1. Ein besseres Verständnis der Prozesse der interstitiellen Zellen nach Cajal (ICCs) stellt eine Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieansätze für gastrointestinale Motilitätsstörungen dar.
2. Glattmuskuläre Präparate von Antrum, Colon, Portalvene und Uterus der Ratte zeigen im Organbad spontane phasisch-rhythmische Kontraktionen. Die Frequenz und das Kontraktionsmuster zeigen dabei organspezifische Charakteristika.
3. Die TRPM7-Kanal Modulatoren Spermin, Lanthan, Flufenaminsäure und Chinidin zeigen dosisabhängige Effekte auf die mechanische Spontanaktivität der glattmuskulären Präparate. Frequenz, Amplitude und Integral der Kontraktionskraft werden organabhängig in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusst.
4. Neben einem Effekt auf die mechanische Spontanaktivität zeigen die TRPM7-Kanal-Modulatoren auch ausgeprägte Effekte auf die exogene Aktivierbarkeit der Präparate durch Acetylcholin und Kaliumchlorid.
5. Konzentrationen der Testsubstanz Spermin, die nachweislich zu einer Blockade des TRPM7-Kanals führen, zeigen kaum Effekte auf die mechanische Spontanaktivität der glattmuskulären Präparate.
6. Auch Primärkulturen aus dem Corpus-/Antrumbereich des Magens zeigen unter konfokalmikroskopischen Bedingungen spontane Oszillationen des Ca^{2+} -Signals. So kann diese Messmethode als probates Mittel zum Studium isolierter ICCs etabliert werden.
7. Die TRPM7 Modulatoren Spermin und Lanthan zeigen nur einen geringen Effekt auf die Ca^{2+} -Oszillationen der ICC.
8. Die TRPM7-Kanal Modulatoren zeigen ausgeprägte Effekte auf andere Ionenkanäle, die wichtige Elemente der mechanischen Spontanaktivität des glatten Muskels darstellen.