Universität Rostock Traditio et Innovatio

Aus dem Oscar Langendorff Institut für Physiologie
der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. R. Köhling

Untersuchungen zur kombinierten Wirkung von 5-Aminolävulinsäure und dem Ionenkanalmodulator BAY K 8644 unter basalen Bedingungen und Licht an glattmuskulären Organen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

Rostock, 2012

vorgelegt von:
Imke Jaborg
aus Brake (Unterweser)
geboren am 12.03.1987 in Oldenburg (i.O.)

urn:nbn:de:gbv:28-diss2014-0076-9

Gutachter:

1. Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Noack

Oscar Langendorff Institut für Physiologie, Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. med. Oliver Hakenberg

Urologische Klinik und Poliklinik, Universität Rostock

3. Gutachter:

Prof. Dr. med. Christian Stief

Urologische Klinik und Poliklinik, Universität München

Datum der Einreichung: 10. Mai 2012

Datum der Verteidigung: 06. Februar 2013

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS 3

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 6

1 EINLEITUNG 9

1.1 EINSATZ DER 5-AMINOLÄVULINSÄURE IN DER PHOTODYNAMISCHEN DIAGNOSTIK UND THERAPIE 9

1.1.1 Historischer Rückblick und Klinischer Einsatz von PDD und PDT 9

1.1.2 Funktions- und Wirkungsweise PDD und PDT 11

1.2 EINGESETZTE LICHTSENSITIVE SUBSTANZEN 12

1.2.1 5-Aminolävulinsäure 12

1.2.2 (-) Bay K 8644 16

1.3 AUSWAHL DER GLATTMUSKULÄREN PRÄPARATE UND ZENTRALE FRAGESTELLUNG 18

2 MATERIAL UND METHODEN 19

2.1 MATERIALIEN 19

2.1.1 Lösungen und getestete Substanzen 19

2.1.1.1 Präparierlösung 19

2.1.1.2 Physiologische Krebslösung 19

2.1.1.3 Testsubstanzen 20

2.1.2 Versuchstiere und Präparation 21

2.1.2.1 Magen 21

2.1.2.2 Portalvene 21

2.1.2.3 Harnblase 22

2.2 MESSUNG DER MECHANISCHEN AKTIVITÄT IM ORGANBAD 22

2.2.1 Organbad 22

2.2.2 Beleuchtung 23

2.2.3 Versuchsdurchführung 24

2.2.4 Auswertung der mechanischen Aktivität 25

2.3 MESSUNG DER INTRAZELLULÄREN CA^{2+} KONZENTRATIONEN MIT DEM FLUORESZENZMIKROSKOP 26

2.3.1 Ca^{2+} Messsystem und Aufbau des Fluoreszenzmikroskops 26

2.3.2 Beladung der Präparate mit Fura-2 ..... *30*
2.3.3 Versuchsdurchführung *31*
2.3.4 Auswertung der intrazellulären Ca^{2+} Messungen *31*
2.4 EINSSCHLUSSKRITERIEN UND STATISTIK 32

3 ERGEBNISSE 34

3.1 ÜBERSICHT ÜBER DIE DURCH ACH, BAY K UND 5-ALA AUSGELÖSTEN MOTORISCHEN EFFEKTE AN GLATTMUSKULÄREN ORGANEN 34
3.2 WIRKUNG VON 5-ALA, (-) BAY K 8644 UND LICHT AUF DEN TONUS VON VERSCHIEDENEN GLATTMUSKULÄREN ORGANEN 39
3.2.1 Motorische Effekte durch 5-ALA *39*
3.2.2 Kombinierte Wirkung von 5-ALA und (-) Bay K 8644 ..... *41*
3.3 ALLEINIGE UND KOMBINIERTE WIRKUNG VON 5-ALA, (-) BAY K 8644 UND LICHT AN ZWEI CHARAKTERISTISCHEN GLATTMUSKULÄREN ORGANEN 43
3.3.1 Magenfundus *43*
3.3.2 Harnblase *49*
3.4 ZUSAMMENFASSENDE TONUSVERÄNDERUNGEN UNTERSCHIEDLICHER GLATTMUSKLULÄRER ORGANE DURCH ALLEINIGE UND KOMBINIERTE WIRKUNG VON 5-ALA, (-) BAY K 8644 UND LICHT 55
3.4.1 Abgestufte motorische Antworten durch Konzentrations- und Kombinationsunterschiede im Kraft-Zeit-Verlauf *55*
3.4.2 Signifikanztestung aller Präparate hinsichtlich der Größen: Endprozedualer Tonus, Reagibilität, Kontraktilität und Bay K Effekt *59*
3.4.2.1 Endprozedualer Tonus 59
3.4.2.2 Reagibilität 60
3.4.2.3 Kontraktilität 62
3.4.2.4 Bay K Effekt 64
3.5 EINFLUSS VON 5-ALA UND (-) BAY K 8644 AUF DIE INTRAZELLULÄRE CA^{2+} KONZENTRATION UND DEN TONUS 64
3.5.1 Ergebnisse einzelner Fluoreszenzmessungen am Magenfundus und an der Harnblase *66*
3.5.2 Veränderung des intrazellulären Ca^{2+} und der Kraft über 3 Beleuchtungszyklen an Präparaten des Magenfundus und der Harnblase *70*

4 DISKUSSION 73

4.1 DISKUSSION DER METHODIK 73

4.1.1 Organbadversuche 73

4.1.2 Messungen mit dem Fluoreszenzmikroskop 74

4.2 DISKUSSION DER MESSERGEBNISSE 74

4.2.1 Motorische Effekte durch Licht an mit 5-ALA und Bay K behandelter überwiegend tonisch aktivierter Muskulatur am Beispiel des Magenfundus 74

4.2.2 Motorische Effekte durch Licht an mit 5-ALA und Bay K behandelter überwiegend phasisch aktivierter Muskulatur am Beispiel der Harnblase 79

4.2.3 Gemeinsamkeiten in der Tonusveränderung aller getesteten glattmuskulären Organe 83

5 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK 86

6 THESEN 88

7 ZUSAMMENFASSUNG 90

8 LITERATURVERZEICHNIS 92

DANKSAGUNG 109

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG 109

Abkürzungsverzeichnis

M	Abkürzung für mol/l
nM	Nanomolar 10^{-9}
µM	Mikromolar 10^{-6}
mM	Millimolar 10^{-3}
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
ACh	Acetylcholin
Bay K	(-) Bay K 8644, Nifedipin-Derivat und L-Typ Calciumkanal Öffner
BK Kanäle	Ca^{2+} aktivierte K^+-Kanäle mit großer Leitfähigkeit
$[Ca^{2+}]_i$	Intrazelluläre freie Ca^{2+} Konzentration
$CaCl_2$	Calciumchlorid
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N′N′-tetraessigsäure
F_{340nm}	Fluoreszenzintensität von Fura-2 bei Anregung mit einer Wellenlänge von 340nm
F_{380nm}	Fluoreszenzintensität von Fura-2 bei Anregung mit einer Wellenlänge von 380nm

Fura-2	Ca^{2+} spezifischer Farbstoff; 2[(2-Amino-5-methylphenoxy)-methyl]-6-methoxy-8-aminochinolin-N,N,N',N'-tetraessigsäure Tetrakaliumsalz $C_{29}H_{22}K_5N_3O_{14}$
Fura-2-AM	Acetoxymethylester von Fura-2; $C_{44}H_{47}N_3O_{24}$
GTP	Guanosintriphosphat
HpD	Hämatoporphyrin-Derivate
HWZ	Halbwertszeit
ICC	Interstitielle Cajal-Zellen
$KH_2PO_4^-$	Kaliumhydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
lx	Lux, Einheit der Beleuchtungsstärke, 1lx = 1lm (Lichtstrom Lumen) / m^2
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MLCP	Myosin-Light-Chain-Phosphatase
NaCl	Natriumchlorid
$NaHCO^{3-}$	Natriumhydrogencarbonat
NO	Stickstoffmonoxid
PBG	Porphobilinogen
PBR	Peripherer mitochondrialer Benzodiazepinrezeptor
PDD	Photodynamische Diagnostik
PDT	Photodynamische Therapie

PKC	Proteinkinase C
PPIX	Protoporphyrin IX
RF	Ratio der Fluoreszenzintensität F_{340nm}/F_{380nm}
SEM	Standard error of the mean, dt.: Standardfehler des Mittelwertes
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum

1 Einleitung

1.1 Einsatz der 5-Aminolävulinsäure in der Photodynamischen Diagnostik und Therapie

Die photodynamische Diagnostik und die photodynamische Therapie sind zwei klinisch relativ neue Verfahren, die sich die vermehrte Anreicherung von fluoreszierenden Stoffen in malignen und nicht malignen Geweben zunutze machen. Durch nachfolgende Lichteinwirkung und damit verbundene chemische Wechselwirkungen der photosensiblen Substanzen können Tumore detektiert (photodynamische Diagnostik PDD) oder nahezu selektiv behandelt werden (photodynamische Therapie PDT).

1.1.1 Historischer Rückblick und Klinischer Einsatz von PDD und PDT

Oscar Raab und Herman von Tappeiner waren anfang des 20. Jahrhunderts die ersten Wissenschaftler, die das Wirkungsprinzip der PDT entdeckten, es jedoch noch nicht erklären konnten (Raab, 1900; von Tappeiner, 1900). Raab befasste sich damals mit der Toxizität von Acridinfarbstoffen an Infusorien, als er zufällig herausfand, dass Acridin und Licht in Kombination zu einer letalen Wirkung an Pantoffeltierchen führte.
Erste klinische Untersuchungen zur Tumorlokalisation durch Hämatoporphyrin-Derivate (HpD) (Lipson und Baldes, 1960) läuteten 1960 das Zeitalter der PDD und PDT ein. 1975 konnte im Tierversuch die erste erfolgreiche Tumorheilung mittels PDT gezeigt werden (Dougherty et al., 1975). Bei der photosensiblen Substanz handelte es sich um HpD. Anknüpfend an diese Erfolge wurden 1976 die ersten Studien der PDT am Menschen unter Einsatz von HpD durchgeführt (Kelly und Snell, 1976). Die PDT wurde hierbei zur Behandlung von Blasenkrebs eingesetzt.

Aufgrund der bedeutenden Nebenwirkungen von HpD und anderen Photosensibilatoren, wurde nach besser verträglichen Substanzen für die PDD und PDT gesucht. Zu den bedeutsamsten Nebenwirkungen zählte die lang andauernde Photosensibilisierung der Haut, da die photosensiblen Substanzen lange Halbwertszeiten besaßen und in der Haut akkumulierten. Das Risiko für gravierende phototoxische Hautschäden war für Wochen, mitunter sogar für Monate erhöht. Eine dieser neueren alternativen Photosensibilatoren in der PDD und PDT ist die 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), eine Vorstufe des Häms in der Hämbiosynthese. 5-ALA ist hierbei nicht unmittelbar die photosensitive Substanz, sondern eine Vorstufe von Protoporphyrin IX (PPIX), welches eine hohe photodynamische Wirksamkeit besitzt. Die Metabolisierung von 5-ALA zu PPIX erfolgt endogen (s. 1.2.1).

Kennedy et al. begannen 1990 die ersten klinischen Studien zur PDT mit 5-ALA an Patienten mit Basalzellkarzinomen der Haut (Kennedy et al., 1990). Sie konnten zeigen, dass 90% der durch topische 5-ALA-Applikation und anschließender Beleuchtung behandelten Basalzellkarzinome 2-3 Monate nach der Therapie eine vollständige Remission aufweisen. Die umliegende gesunde Haut zeigte keine bedeutsamen Photosensibilisierungen bzw. phototoxischen Reaktionen.

Der heutige experimentelle und klinische Einsatz von 5-ALA induziertem PPIX zur PDD und PDT ist vielfältig. In der Gastroenterologie werden beispielsweise kleine Epitheldysplasien der Ösophagusmucosa und der Barret-Ösophagus mit PDT behandelt (Barr et al., 1996; Gossner et al., 1998; Ackroyd et al., 2000). Des Weiteren kommt die PDT zur Anwendung bei der Behandlung von oberflächlichen Blasentumoren (Kriegmair et al., 1996; Waidelich et al., 2001), sowie experimentell im Tiermodell beim Prostatakarzinom (Zaak et al., 2004). Erkrankungen der Haut, wie z.B. Basaliome, Spinaliome (Kennedy et al., 1990), Präkanzerosen wie M. Bowen (Cairnduff et al., 1994) und aktinische Keratose (Fink-Puches et al., 1997), wie auch Hand- und Fußwarzen (Stender et al., 1999) sind ebenfalls Anwendungsgebiete der PDT. Ein aktueller experimenteller Ansatz der PDT verfolgt die mögliche Prävention von Gefäßrestenosen. Diese treten häufig nach

vorausgegangener interventioneller Therapie von Koronarstenosen mittels Ballondilatation oder Stenteinsatz auf (Nyamekye et al., 1995; Gabeler et al., 2002; Pai et al., 2005).

Die PDD wird angewandt in der Lokalisation von Dysplasien und Tumoren der Lunge (Baumgartner et al., 1996), des Gastrointestinaltraktes (Messmann, 2000), bei der intraoperativen Lokalisation des Glioblastoma multiforme (Stummer et al., 2000), sowie bei Harnblasentumoren (Kriegmair et al., 1994; Koenig et al., 1999). Insbesondere bei Harnblasentumoren erweist sich die 5-ALA PDD als sehr effektiv und kostengünstig (Hungerhuber et al., 2007; Burger et al., 2007).

1.1.2 Funktions- und Wirkungsweise PDD und PDT

Bei der PDT wird ein Photosensitiser topisch oder systemisch appliziert und anschließend wird die Zielregion mit langwelligem, meist rotem Licht beleuchtet. Der Photosensitiser absorbiert einen Teil des Lichtes. Dieser Vorgang zieht 3 chemische Reaktionen nach sich, die nebeneinander ablaufen. Typ I und II Reaktionen benötigen O_2, bei der Typ III Reaktion ist O_2 nicht involviert. Die zytotoxischen Effekte der PDT werden u.a. durch die 3 folgenden Reaktionsprodukte hervorgerufen: bei Typ I Reaktionen bilden sich Superoxidradikale, bei Reaktionen vom Typ II entsteht Singulett-Sauerstoff ($^1O_2$) und bei Typ III Reaktionen reagieren vom Photosensitiser abgegebene Elektronen direkt mit Proteinen (Laustriat, 1986). Das bei Typ II Reaktionen gebildete Singulett-Sauerstoff ist hauptverantwortlich für die Zytotoxizität der PDT (Weishaupt et al., 1976). Demzufolge sprechen Gewebe mit niedrigen Sauerstoffkonzentrationen nur wenig auf eine PDT an (Gomer und Razum, 1984). Die PDT zeigt vielfältige Zellreaktionen und besitzt viele zelluläre Angriffspunkte, welche abhängig sind vom Zelltyp, vom eingesetzten Photosensitiser, von der applizierten Dosis des Photosensitisers sowie vielen weiteren Faktoren. Zu den Zellreaktionen zählen Apoptose (Agarwal et al., 1991; Oleinick et al., 2002) und Nekrose (Zhou, 1989). Auf subzellulärer Ebene lassen sich beispielsweise Schäden an der Zellmembran (Peng et al., 1996) und den Mitochondrien (Kessel und Luo, 1998) beobachten. Des Weiteren kommt

es bei der Behandlung von Tumoren unter Einsatz der PDT zum Zusammenbruch der Tumorvaskularisation (Star et al., 1986; Reed et al., 1989).
Es konnte gezeigt werden, dass unter 5-ALA PDT am Cremaster Muskel der Ratte der Gefäßdurchmesser abnimmt und damit einhergehend der Blutfluss sinkt bzw. die Mikrozirkulation abnimmt (Leveckis et al., 1995).
Bei der PDD wird ebenso wie bei der PDT die Tatsache ausgenutzt, dass sich Photosensitiser, z.B. 5-ALA induzierte Porphyrine, in neoplastischen, embryonalen und sich regenerierenden, traumatisierten Zellen ansammeln (Auler und Banzer, 1942; Figge et al., 1948). Der Photosensitiser wird analog der PDT lokal oder systemisch verabreicht und sammelt sich in den oben genannten Zellen annähernd selektiv an, da sie einen hohen Mitoseindex aufweisen. Im Anschluss an eine determinierte Einwirkzeit wird die Region des vermutlichen Tumorwachstums mit kurzwelligem blauem Licht bestrahlt. Dieser Lichtwellenbereich liegt im absoluten Absorptionsmaximum der Porphyrine. Durch Absorption von Photonen kann der Photosensitiser Energie freisetzen und diese auf Sauerstoff übertragen. Sauerstoff wird auf diesem Wege angeregt und in einen energetisch höheren Zustand überführt. Beim Rückfall des Sauerstoffs auf das Ausgangsenergieniveau wird die freiwerdende Energie, bei den Porphyrinen in Form einer charakteristischen Rotfluoreszenz, abgegeben. Dieses Fluoreszenzlicht wird ausgenutzt, um Tumore zum einen zu detektieren und zum anderen die Tumorränder klarer vom gesunden Gewebe abgrenzen zu können.

1.2 Eingesetzte lichtsensitive Substanzen

1.2.1 5-Aminolävulinsäure

Die 5-Aminolävulinsäure (s. Abb. 1) entsteht im ersten Schritt bei der Synthese des Porphyrinringes des Häms in der Hämbiosynthese (s. Abb. 2).

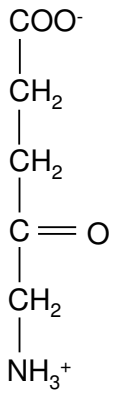


Abb. 1: Strukturformel von 5-ALA (aus Biochemie und Pathobiochemie, 2007)

Die Hämbiosynthese findet in allen kernhaltigen Zellen statt, um mitochondriale Cytochrome zu metabolisieren. Von wichtiger Bedeutung ist die Synthese des Häms im blutbildenen Gewebe des Knochenmarks bei der Herstellung des Hämoglobins.

5-ALA selbst ist keine photoaktive Substanz, sondern muss erst zum wirksamen Photosensitiser PPIX metabolisiert werden. Endogen entsteht 5-ALA im Mitochondrium durch Kondensation von Glycin, einer essentiellen Aminosäure, mit Succinyl-CoA, ein Zwischenprodukt aus dem Citratzyklus. Die Reaktion wird durch die 5-ALA-Synthase vermittelt. Aufgrund der kurzen HWZ der 5-ALA-Synthase ist diese Reaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Häm- und Porphyrinbiosynthese. Diese Schrittmacherreaktion unterliegt einer Feedback-Hemmung, die durch freies Häm als Endprodukt der Hämbiosynthese kontrolliert wird. Durch exogene Zufuhr von 5-ALA werden die 5-ALA-Synthase und der Feedback-Kontrollmechanismus umgangen. Hierdurch kann das photoaktive PPIX in den Zellen ungehindert synthetisiert werden und akkumulieren (Kennedy und Pottier, 1992).

Die weiteren Syntheseschritte der Hämbiosynthese finden zum einen im Cytosol und zum anderen im Mitochondrium statt.

Nach Übertritt ins Zytosol kondensieren 2 Moleküle 5-ALA durch das Enzym 5-ALA Dehydratase zu Porphobilinogen (PBG).

Aus 4 PBG-Molekülen katalysiert die PBG-Deaminase Tetraypyrrol. Dieses bleibt am Enzym gebunden und zyklisiert mittels einer Co-Synthase zu Uroporphyrinogen III. Nachfolgend entsteht durch Decarboxylierung der Acetatseitenketten Coproporphyrinogen III, welches ins Mitichondrium übertritt. Hier werden Doppelbindungen in den Porphyrinring eingeführt und 2 Propionatseitenketten in Vinylgruppen umgewandelt. Auf diesem Wege ist über die Zwischenstufe Protoporphyrinogen IX PPIX entstanden. Das Enzym Ferrochelatase vollendet die Hämbiosynthese und somit die Bildung von Häm durch den Einbau von zweiwertigem Eisen in PPIX.

Da in Tumorgewebe vermehrt PPIX aus 5-ALA synthetisiert wird, ist 5-ALA heutzutage ein wertvoller Photosensitiser in der PDT und PDD (s.1.1.1).

Die tumorselektive Anreicherung von 5-ALA induziertem PPIX basiert auf mehreren Faktoren. Zu diesen zählen eine verminderte Ferrochelataseaktivität (Dailey und Smith, 1984; El-Sharabasy et al., 1992) bzw. ein relativer Ferrochelatasemangel (Van Hillegersberg et al., 1992) im Tumorgewebe, eine in malignen Geweben erhöhte Aktivität der PBG-Deaminase (Gibson et al., 1998) sowie eine erniedrigte Konzentration von Eisen im Tumorgewebe (Rittenhouse-Diakun et al., 1995), sodass Häm nicht synthetisiert werden kann und PPIX akkumuliert. Auf der zellulären Ebene konnte gezeigt werden, dass bei vorausgegangener exogener 5-ALA Zufuhr eine positive Korrelation zwischen synthetisierter Menge PPIX und der Zellgröße verschiedener malignen Zellreihen besteht (Gibbs et al., 2006). Die Mitochondrienanzahl maligner Zellen zeigte keine positive Korrelation mit der Anzahl von 5-ALA induziertem PPIX.

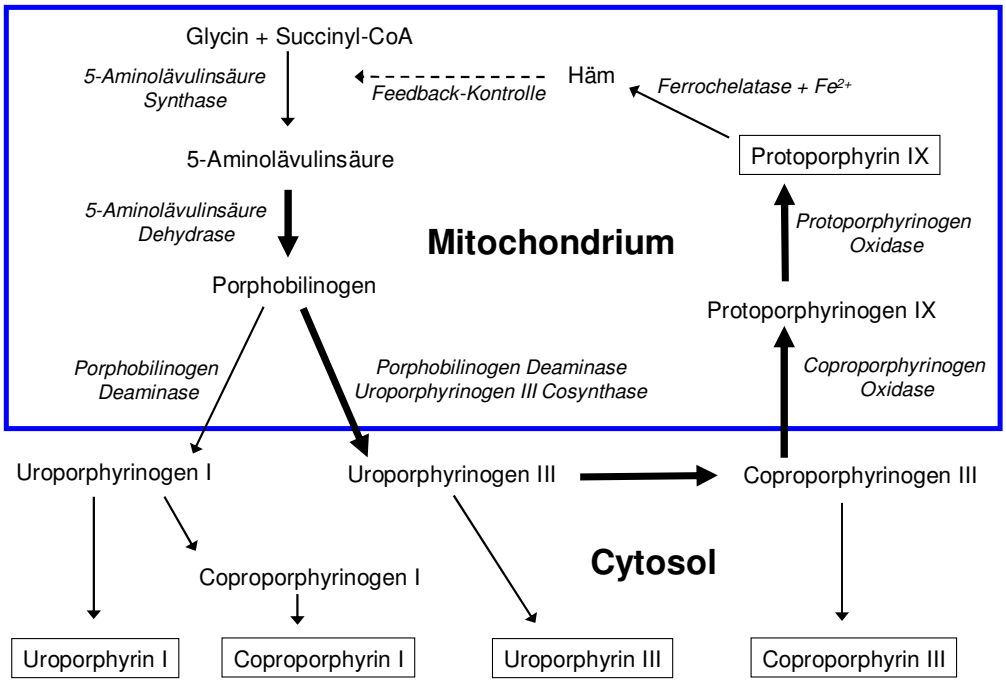


Abb. 2: Hämbiosynthese

Die Reaktionsschritte bis zum Photosensitiser PPIX sind durch dicke Pfeile repräsentiert. Die photoaktiven Vorstufen des Häms sind umrahmt (modifiziert nach Kennedy und Pottier, 1992)

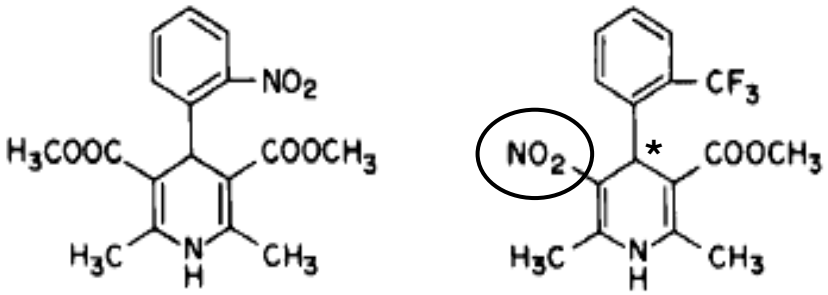
Ein weiterer Vorteil von 5-ALA gegenüber anderen Photosensitisern wie HpD beim Einsatz zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken ist die kürzere HWZ von 5-ALA. Die Photosensibilisierungsdauer der systemisch, topisch oder intradermal behandelten Zielbereiche beträgt maximal 24 h. Innerhalb dieses Zeitraumes kann es durch Lichtexposition der behandelten Areale zu phototoxischen, histaminvermittelten Reaktionen wie Juckreiz und Hautrötung oder einem leichten Sonnenbrand kommen (Kennedy und Pottier, 1992).

Im gesunden Gewebe zeigt 5-ALA induziertes PPIX unterschiedliche Anreicherungen. In der Mucosa von Hohlorganen akkumuliert PPIX schneller und in einem quantitativ größeren Ausmaß als in der Muscularis von Hohlorganen (Loh et al., 1993). Hinter diesem Ungleichgewicht vermuteten Loh et al. eine weniger effiziente 5-ALA Aufnahme in die Muskelzellen und infolgedessen eine

langsamere Synthese von PPIX in der Muscularis.
In dieser Arbeit wurde sich mit der kombinierten Wirkung von 5-ALA, Bay K und Licht am glatten Muskel befasst. Bisher konnte gezeigt werden, dass 5-ALA ohne Licht beim Kaninchen zu einer reversiblen Abnahme der Spontanaktivität an isolierten Präparaten des Duodenums und des Magenfundus führt. In Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis nehmen die Amplitude und die Frequenz der Muskelkontraktionen wie auch der Muskeltonus ab und die Erholungsphase nimmt zu (Cutler et al., 1980 und 1990). Diese hemmenden Effekte können mit Tetrodotoxin, welches spannungsabhängige Na^+-Kanäle blockiert, und α-Adrenozeptor-Antagonisten, wie Prazosin und Phentolamin, reduziert werden.

1.2.2 (-) Bay K 8644

Das Dihydropyridinderivat Bay K 8644 entsteht durch minimale Modifikationen am Nifedipin Molekül (s. Abb. 3). Aufgrund eines asymmetrischen Kohlenstoffatoms kann Bay K in Form von (-) Enantiomeren oder (+) Enantiomeren vorliegen. Schramm et al. konnten 1983 zeigen, dass das Racemat von Bay K am isolierten Meerschweinchenherzen eine positiv inotrope Wirkung besitzt und an isolierten Streifenpräparaten der Kaninchenaorta eine vasokonstringierende Reaktion auslöst. Durch den Calcium-Antagonisten Nifedipin konnten beide Reaktionen vollständig antagonisiert werden. Ohne Effekt blieben hingegen α- oder β-Rezeptorblocker. Die Ca^{2+} agonistische Wirkung von Bay K 8644 wird über potentialabhängige Ca^{2+} Kanäle vermittelt (Thomas et al., 1985), indem der Ca^{2+} Einstrom durch eine verlängerte Öffnungszeit der Kanäle gesteigert wird (Kokubun und Reuter, 1984).



Nifedipin Bay K 8644

Abb. 3: Strukturformeln der Dihydropyridinderivate Nifedipin, ein Antagonist und Bay K 8644, ein Agonist an spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} Kanälen

Bay K 8644 besitzt ein asymmetrisches Kohlenstoffatom (*) und setzt unter Bestrahlung NO aus der 3. Position des Pyridinringes frei (Kreismarkierung).

Franckowiak et al. betrachteten 1985 die Wirkungsweise der Bay K 8644 Enantiomere separat. Das (-) Enantiomer zeigte, wie das von Schramm verwendete Racemat, Ca^{2+} agonistische Wirkungen. Das (+) Enantiomer hingegen löste Ca^{2+} antagonistische Effekte aus.

Eine weitere Eigenschaft von Bay K 8644 ist die induzierte Photorelaxation an sonst lichtunempfindlicher glatter Muskulatur (Mikkelsen et al., 1985). Durch Bestrahlung mit Tages- oder UV-Licht wird die Ca^{2+} agonistische Wirkung von Bay K aufgehoben und das ansonsten lichtunempfindliche Muskelpräparat relaxiert. Nach Beendigung der Beleuchtung stellt sich das Ausgangsaktivitätsniveau wieder ein. Die Photorelaxation ist demzufolge reversibel. Darüber hinaus ist die Photorelaxation durch Bay K reproduzierbar und tritt auch dann noch in Erscheinung, wenn Bay K aus der Versuchsanordnung herausgewaschen wurde. Im Vergleich mit der natürlichen Photorelaxation an glatter Muskulatur der Kaninchenaorta (Furchgott et al., 1961) ist die Bay K induzierte Photorelaxation bedeutend stärker ausgeprägt.

Ursächlich für die Photorelaxation ist die durch Bestrahlung herbeigeführte Freisetzung von NO an 3. Position des Pyridinringes (s. Abb. 3) des Bay K-Moleküls (Golenhofen et al., 1990). NO stimuliert die cytoplasmatische Guanylatcyclase, was zu einer Zunahme des cGMP-Spiegels führt. Durch sich anschließende intrazelluläre Signalkaskaden wird die Muskelrelaxation vermittelt.

1.3 Auswahl der glattmuskulären Präparate und zentrale Fragestellung

Die in dieser Arbeit verwendeten glattmuskulären Präparate wurden zum einen nach klinischen und zum anderen nach physiologischen Aspekten ausgewählt. Zu den klinischen Aspekten zählt der heutige Einsatz von 5-ALA zur PDD und PDT von Tumoren in der Harnblase und im Gastrointestinaltrakt (s. Abschn. 1.1.1).

Bei den physiologischen Aspekten sind die unterschiedlichen Ca^{2+} Aktivierungsprozesse bei der Muskelkontraktion zu nennen (s. Abschn. 3.1). Es wurde einerseits mit tonisch aktivierten Präparaten des Magenfundus gearbeitet und andererseits mit überwiegend phasisch aktivierten Muskelstreifen der Harnblase, der Portalvene und des Magenantrums.

Das Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, welche motorischen Effekte sich am glatten Muskel durch systematische Kombination der lichtsensitiven Substanzen 5-ALA und Bay K 8644 unter Beleuchtung erzielen lassen. Die Frage, ob Bay K 8644 die apoptotische Wirkung von 5-ALA verstärkt, galt es zu klären. Aus diesem Untersuchungsansatz könnte sich demnach ein Benefit für die PDT ergeben, da durch die Kombination mit Bay K Einsparungen des Photosensitisers 5-ALA vorgenommen werden könnten. Des Weiteren wurde der Frage nachgegangen, ob sich der intrazelluläre Ca^{2+} Haushalt durch Beleuchtung der mit 5-ALA und Bay K 8644 behandelten glatten Muskelstreifen verändert.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Lösungen und getestete Substanzen

2.1.1.1 Präparierlösung

Für den Transport, die Reinigung und die Präparatur der Muskelstücke wurde eine Lösung folgender Zusammensetzung verwendet (s. Tab.1). Die Präparierlösung wurde vor jedem Versuch frisch zubereitet und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Salz	Konzentration Stammlösung in mM	Konzentration Stammlösung in g/l	Anteil in ml für 1l Präparierlösung	Konzentration Präparierlösung in mM
NaCl	154	9	929	143
KCl	154	11,5	38	5,9
$CaCl_2+2H_20$	110	15,9	33	3,6

Tab. 1: Präparierlösung

2.1.1.2 Physiologische Krebslösung

Als Nährlösung der Muskelstreifen im Organbad diente eine modifizierte Krebslösung (s. Tab.2). Auch diese Lösung wurde vor jedem Versuchstag frisch zubereitet und im Kühlschrank aufbewahrt.

Da Ca^{2+} im alkalischen Milieu ausfällt, erfolgte die Zugabe zur Krebslösung erst nachdem diese mit Carbogen durchperlt wurde (Golenhofen, 1983). Das Carbogen-Gasgemisch bestand aus 95% O_2 und 5% CO_2.

Die Krebslösung ist der interstitiellen Flüssigkeit von Säugetieren sehr ähnlich, jedoch ist die Ca^{2+} Konzentration erhöht. Diese Erhöhung verschafft einen Schutz vor unvermeidbaren Präparierschäden und führt zu einer besseren Funktionsfähigkeit der Präparate während der Anpassungsphase im Organbad.

Salz	Konzentration Stammlösung in mM	Konzentration Stammlösung in g/l	Anteil in ml für 1l Krebslösung	Konzentration Krebslösung in mM
NaCl	154	9	727	112
$NaHCO^{3-}$	155	13	161	25
$KH_2PO_4^-$	154	21	7,8	1,2
KCl	154	11,5	30,5	4,7
$MgCl_2+6H_20$	110	31,4	11	1,2
$CaCl_2+2H_20$	110	15,9	22,7	2,5
Glucose	300	54	38,3	11,5

Tab. 2: modifizierte Krebslösung

Eine weitere Abweichung zur interstitiellen Flüssigkeit in vivo besteht im erhöhten O_2-Partialdruck der modifizierten Krebslösung. Die Erhöhung von 50-100 mmHg O_2 in vivo auf 730 mmHg O_2 in der Krebslösung soll die Behinderung des O_2-Transportes in die Zellen durch den in vitro verlängerten Diffusionsweg des O_2's rekompensieren (Golenhofen, 1983). Die verlängerte Diffusionsstrecke kommt dadurch zu Stande, dass sich nur physikalisch gelöstes O_2 im Organbad befindet. Das an Hämoglobin chemisch gebundene O_2 der Erythrozyten, welches in vivo der Hauptfaktor für die O_2-Versorgung der Gewebe ist, ist in diesem Versuchsaufbau von keinerlei Bedeutung, da in den kleinen Gefäßen der Präparate keine Perfusion stattfindet.
Die für die Lösungen verwendeten Salze wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim), Merck (Darmstadt) und Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen.

2.1.1.3 Testsubstanzen

Folgende Substanzen wurden getestet:
Acetylcholin (ACh, Sigma-Aldrich, Steinheim), als Agonist durch Ca^{2+} Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR), (-) Bay K 8644 (Sigma-Aldrich, Steinheim), als L-Typ Ca^{2+} Kanal Agonist und Photorelaxator, sowie 5-Aminolävulinsäure (5-ALA, Fagron GmbH & Co. KG, Barsbüttel).

2.1.2 Versuchstiere und Präparation

Magen, Portalvene und Harnblase wurden von männlichen Wistar-Ratten entnommen und bis zur Feinpräparation in Präparierschalen mit gekühlter Präparierlösung aufbewahrt.

2.1.2.1 Magen

Für die Feinpräparation wurde der entnommene Magen in einer mit Präparierlösung befüllten Präparierschale mit Nadeln fixiert. Zuerst wurde der Magen grob von Fett und Bindegewebe unter Zuhilfenahme von Pinzette, Pinzettenschere und mikroskopischer Vergrößerung befreit. Anschließend wurden die Muskelstreifen longitudinal entlang der großen Kurvatur und zirkulär oral des Pylorus abpräpariert. Die Schnittführung folgte somit dem Verlauf der longitudinalen Muskelschicht am Fundus und der zirkulären Muskelschicht am Antrum.
Die so gewonnenen Muskelstreifen hatten ein Breite von ca. 2 mm und eine Länge von ca. 15 mm. Mit zwei Stecknadeln wurden die Enden der Präparate auf in-situ Länge in der Präparierschale fixiert und mit Zwirnsfaden angeknotet, sodass das Präparat später im Organbad an beiden Enden befestigt werden konnte. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Präparate im Kühlschrank bei 4°C in Präparierlösung aufbewahrt.

2.1.2.2 Portalvene

Die Präparation und Fixierung der Portalvene erfolgte analog derer des Magens. Unterschiede bestanden darin, dass keine Muskelstreifen abpräpariert wurden, sondern das gesamte Gefäß längs halbiert und dann an beiden Enden angeknotet wurde. Außerdem wurde wesentlich mehr Fett und Bindegewebe entfernt.
Die Gefäßstreifen hatten eine Breite von ca. 1 mm und eine Länge von ca. 20 mm.

2.1.2.3 Harnblase

Die Feinpräparation der Harnblase gestaltete sich aufwendiger als beim Magen. Zunächst wurde auch hier überschüssiges Fett und Bindegewebe entfernt. Bis auf eine Verbindung am oberen Harnblasenpool wurde die Harnblase anschließend von distal nach proximal in 2 Hälften aufgeschnitten. Die beiden Hälften wurden nun so aufgeklappt und mit Nadeln fixiert, dass die Mucosa nach oben zum Mikroskop gerichtet war und abpräpariert werden konnte. Diese Schnitttechnik erleichterte die Trennung von Mucosa und Muscularis. Anschließend wurden Muskelstreifen mit einer Breite von ca. 2 mm und einer Länge von ca. 20 mm zurechtgeschnitten. Im Weiteren wurde verfahren wie beim Magen.

2.2 Messung der mechanischen Aktivität im Organbad

2.2.1 Organbad

Für die Messung der mechanischen Aktivität wurden 4 Organbäder für je 2 Präparate verwendet. Jedes der 4 Organbäder folgte dem gleichen Aufbauschema (s. Abb.4). Als Vorratsgefäß und Organbad dienten zwei 40 ml fassende doppelwandige Glasgefäße. Diese wurden permanent mit Wasser umspült, welches von der Wärmepumpe (Lauda M3, Lab Extreme, Kent City, USA) erwärmt und transportiert wurde. Somit konnte eine konstante Temperatur von 37°C im Vorratsgefäß und im Organbad gesichert werden. Über einen Zulauf für frische Lösung war das Vorratsgefäß mit dem Organbad verbunden. Der Ablauf alter Lösung erfolgte mittels einer Wasserstrahlpumpe. Die Begasung mit 95% O_2 und 5% CO_2 konnte durch in die Glaswand eingeschmolzene Mikrofilter gewährleistet werden. Je 2 Muskelpräparate wurden mit dem einen Fadenende an der Öse eines Glashalters befestigt. Dieser wurde so ins Organbad gehängt, dass die Präparate dicht über dem Boden platziert werden konnten. Das andere Fadenende wurde am mechanischen Transducer (Swema SG4-90, Stockholm) befestigt. Dieser wandelt Längenänderungen der Muskelstreifen in elektrische Signale um. Über einen Messverstärker (Hottinger Baldwin Messtechnik KWS 3073, Darmstadt) und einen

Analog / Digitalwandler (Power Lab 16/30 ADInstruments) wurde der Transducer mit dem Computer (HP Compaq dc5800 Microtower) verbunden. Zum Aufzeichnen und Analysieren der Daten wurde die Software LabChart ver.6.1.1 von ADInstruments verwendet.

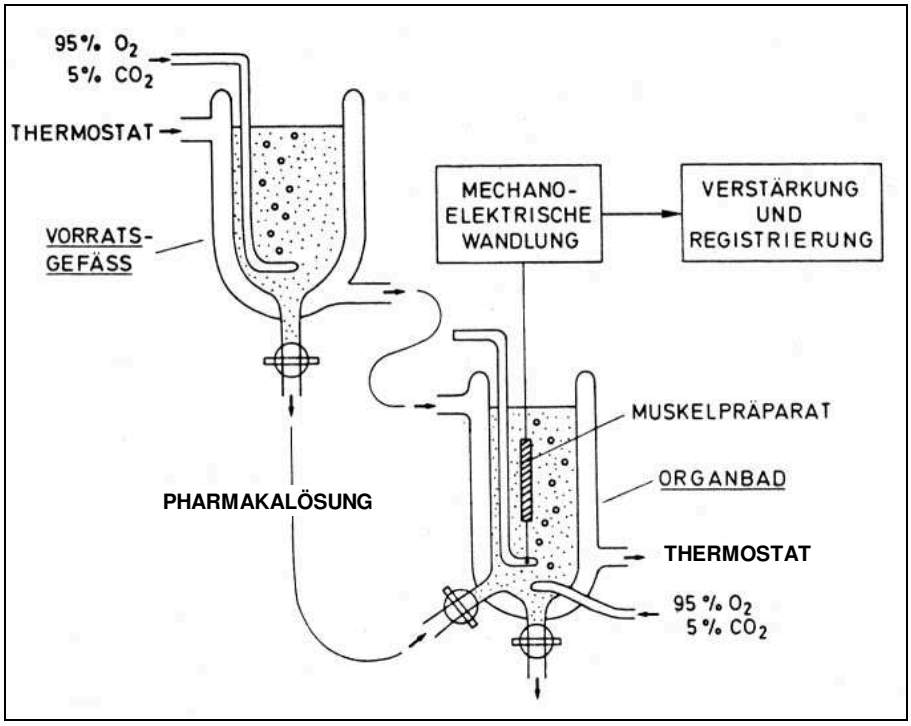


Abb. 4 Aufbau des Organbades nach Golenhofen 1983

2.2.2 Beleuchtung

Zur Vermeidung eines systematischen Fehlers, der durch den Einfluss von Tages- und Raumbeleuchtung zustande gekommen wäre, wurden alle Versuche im abgedunkelten Labor durchgeführt. Eine Natriumspektrallampe (Na-10 Spektral, 15 W, Osram) sorgte für das nötige Licht bei der Versuchsdurchführung. Das besondere an der Natriumlampe ist, dass sie monochromatisches Licht emittiert und keinen Einfluss auf den Muskeltonus der Präparate hat.

Die Beleuchtung wurde mit einer eigens für diese Versuche entworfenen Lichtanlage durchgeführt. 4 Halogenlampen (DecoStar 41861 20 W, Osram) wurden im

Abstand von ca. 1,5 cm vor den 4 Organbädern an einer Stativapparatur angebracht. Ein Fußkippschalter ermöglichte das exakte Ein- und Ausschalten des Lichtes. Die Beleuchtungsstärke in Lux (lx) konnte durch einen Beleuchtungsstärkenregler (Schott, KL 150 B, Mainz) eingestellt werden. Zur Eichung und Kontrolle der Beleuchtungsintensität wurde mittels eines Photoelementes vor dem Organbad die Beleuchtungsstärke bestimmt. Messungen vor dem Bad und Messungen innerhalb des Bades ergaben keine signifikanten Unterschiede, sodass fortan nur vor dem Bad die Beleuchtungsstärke kontrolliert wurde.

2.2.3 Versuchsdurchführung

Vor Versuchsbeginn wurden die Transducer mit einem Messinggewicht geeicht. 1g entspricht dabei einem Wert von 10 mN. Anschließend wurden die präparierten Muskelstreifen ins Organbad gehängt und in der Weise befestigt, wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben. Die Muskelstreifen wurden mit der Präparierlösung für etwa 1 Stunde bei 37°C umspült, damit sie sich an die neue Umgebung akkomodieren konnten. Nach dieser Anpassungsphase erfolgte ein Lösungswechsel zu modifizierter Krebslösung und eine Vordehnung der Präparate auf ca. 2 mN.
Anschließend wurde als Kontroll- und Bezugsreaktion eine Acetylcholin-Aktivierung in aufsteigenden Konzentrationen durchgeführt. Begonnen wurde mit ACh 10 nM und dann wurde im Abstand von je 5 Minuten um eine Zehnerpotenz kumulativ erhöht. Den Abschluss dieser Konzentrationstreppe bildete ACh 10 µM. Dieser Wert wurde als Bezugspunkt der maximalen ACh-Reaktion bei der Auswertung verwendet.
Im Anschluss an die Konzentrationstreppe wurde frische Krebslösung gegeben und das Versuchsprogramm gestartet. Dieses folgte einem ausgearbeitetem Schema mit Substanzapplikationen zu festgesetzten Zeiten und 9 Beleuchtungsphasen mit einer Dauer von je 8 Minuten bei einer Lichtintensität von 8 klx. (s. Abb. 5).

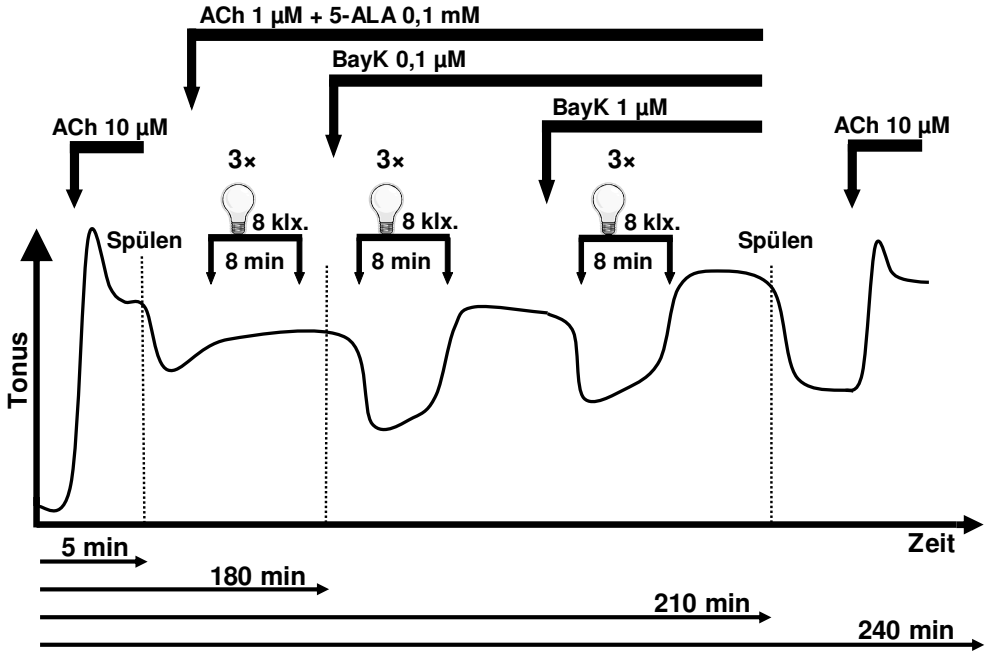


Abb. 5 Schema des Versuchsprogramms am Magenfundus

Zunächst wurden die Präparate mit ACh 1µM voraktiviert. Nachfolgend wurde 5-ALA in einer Konzentration von 0,1 mM oder 0,3 mM hinzugefügt und für 120 Minuten zur Verstoffwechselung inkubiert. Während der Metabolisierung von 5-ALA wurde nach 10, 48 und 112 Minuten beleuchtet. Anschließend wurde (-) Bay K 8644 in der Konzentration 0,1 µM gegeben und 3 × im Abstand von 10 Minuten beleuchtet. Dann wurde die Bay K Konzentration um 1 µM erhöht und gleichfalls 3 × im Abstand von 10 Minuten beleuchtet. Zum Schluss wurde gespült und die ACh Aktivierung getestet.

2.2.4 Auswertung der mechanischen Aktivität

Zur Auswertung der Organbadversuche wurde die mechanische Aktivität in % von ACh max. beschrieben. ACh max. ist der Wert in mN, der zu Beginn der Versuche bei ACh Aktivierung mit 10 µM für das jeweilige Präparat, nach Subtraktion der Vordehnung, ermittelt wurde.

2.3 Messung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentrationen mit dem Fluoreszenzmikroskop

2.3.1 Ca^{2+} Messsystem und Aufbau des Fluoreszenzmikroskops

Mit der Fura-2 Methode nach Grynkiewicz et al. wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop die intrazellulären Ca^{2+} Veränderungen gemessen (Grynkiewicz et al. 1985).

Die Methode beruht auf unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften des Ca^{2+} spezifischen Farbstoffes Fura-2 (s. Abb. 6a) in Abhängigkeit von den intrazellulären Ca^{2+} Konzentrationen $[Ca^{2+}]_i$.

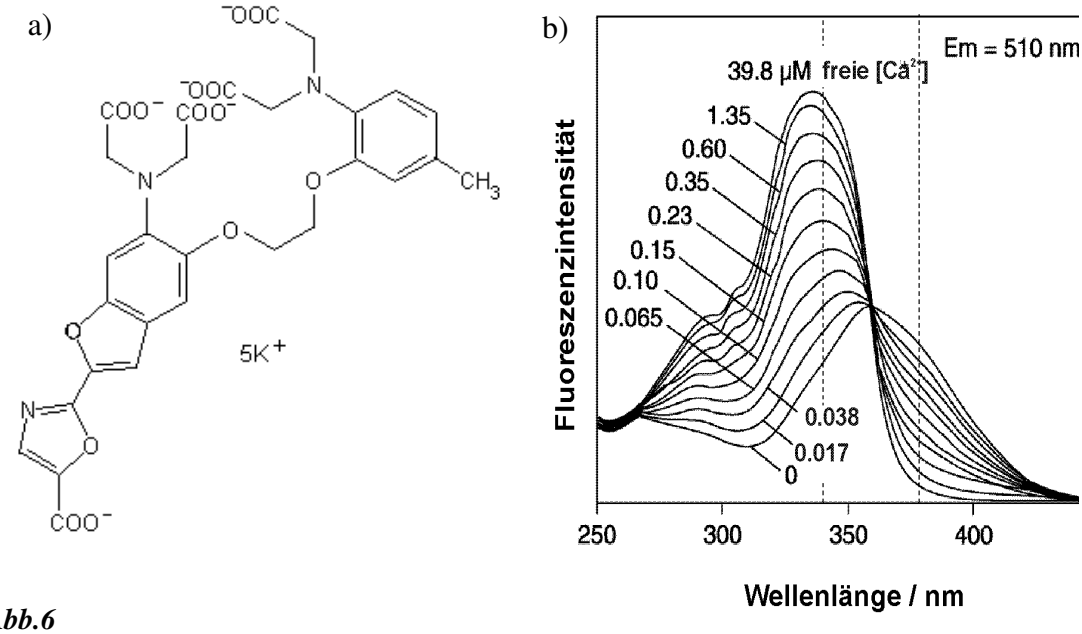


Abb.6

a) Strukturformel des Fura-2-Moleküls

Quelle: Tsien, R.Y. (1989)

b) Anregungsspektrum von Fura-2

Zu Sehen ist die gemessene Emission bei 510 nm in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge. Lösungen mit hoher Konzentration an freien Ca^{2+} Ionen zeigen bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm (gestrichelte Linie) ein Emissionsmaximum. Die Emission bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm ist maximal groß in Ca^{2+} freien Lösungen. Verändert nach: Haugland, R.P. (1996)

Der Farbstoff wurde als lipophiler Acetoxymethylester (Fura-2-AM) eingesetzt, der über die Zellmembran diffundieren kann. Durch unspezifische Esterasen werden die Esterbindungen intrazellulär hydrolysiert, sodass der Farbstoff in der Zelle akkumuliert, da er die Zellmembran nicht mehr passieren kann (Malgaroli et al. 1987). Die entstandenen freien Säuren binden Ca^{2+}. Die auf diesem Wege mit Farbstoff beladenen Präparate wurden kurz hintereinander mit Licht der Wellenlänge 340 nm und 380 nm beleuchtet. Diese Anregungswellenlängen liegen im Bereich der Emissionsmaxima von Fura-2. Die Emission wurde bei 510 nm gemessen. Bei hohem $[Ca^{2+}]_i$ und somit hoher Ca^{2+} Sättigung des Farbstoffes, steigt die gemessene Fluoreszenz bei Anregung mit 340 nm ($F_{340\ nm}$). Die Fluoreszenz bei Anregung mit 380 nm ($F_{380\ nm}$) hingegen sinkt. Diese Eigenschaft beruht auf der Verschiebung der Anregungswellenlängen zu kürzeren Wellenlängen, wenn Ca^{2+} an Fura-2 bindet (Grynkiewicz et al. 1985). Bei niedrigen $[Ca^{2+}]_i$ bzw. Ca^{2+} freien Lösungen verhält sich die gemessene Fluoreszenz genau entgegengesetzt: $F_{380\ nm}$ wird maximal groß und $F_{340\ nm}$ wird minimal klein (s. Abb. 6b). Der isosbestische Punkt für Fura-2 liegt bei der Anregungswellenlänge 360 nm. An diesem Punkt ist die gemessene Fluoreszenzintensität unabhängig von $[Ca^{2+}]_i$.

Die Absolutwerte der gemessenen Emissionsintensitäten unter beiden Anregungswellenlängen sind abhängig von $[Ca^{2+}]_i$ und sehr anfällig gegenüber Störeinflüssen. Zu diesen gehören zum Beispiel die über die Versuchsdauer abnehmende intrazelluläre Fura-2 Konzentration, die durch Ausbleichen bedingt ist, sowie ein nicht konstanter Abstand der Präparate zur Schärfenebene. Die ständige Änderung des Abstandes zur Schärfenebene ist ursächlich bedingt durch Relaxation und Kontraktion der glatten Muskulatur.

In dieser Arbeit wurden keine Absolutwerte verwendet, da sie zum einen keine zusätzlichen Informationen zur Fragestellungen erbracht hätten und zum anderen zu ungenauen Ergebnissen geführt hätten. Stattdessen wurden die Ergebnisse quantitativ mittels Ratio angegeben. Die Ratio (RF) beschreibt das Verhältnis von $F_{340\ nm}$ / $F_{380\ nm}$. Sie ist abhängig von $[Ca^{2+}]_i$ und liefert Aussagen über dessen Veränderung. Die Größe ist unabhängig von der intrazellulären Fura-2

Konzentration sowie vom Abstand zur Schärfenebene. Eine bessere Vergleichbarkeit der Präparate ist auf diesem Wege sichergestellt.

Das Fluoreszenzauflichtmikroskop (Nikon Diaphot 200) war wie folgt aufgebaut (s. Abb. 7):

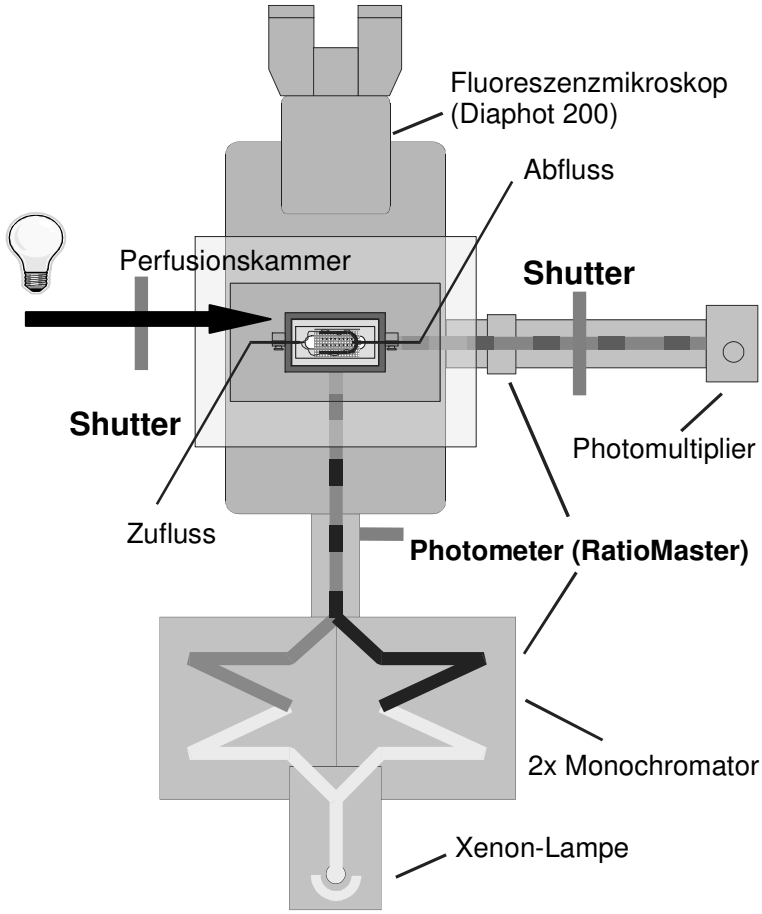


Abb. 7 Aufbau des Fluoreszenzmikroskops

Eine Xenon-Lampe lenkt Licht auf 2 Monochromatoren, die auf 340 und 380 nm eingestellt wurden. Über einen halbdurchlässigen dichroischen Spiegel gelangt das monochromatische Anregungslicht aufs Präparat. Die spezifische Emissionswellenlänge von 510 nm wird vom Spiegel durchgelassen und die einzelnen Photonen im Photomultiplier-registriert. *Fortsetzung s. S. 29 unten*

Das Licht einer Xenon-Lampe fiel auf eine schnell rotierende Scheibe (50 Hz), die in gleichen Abständen mit spiegelnden und transparenten Segmenten besetzt war. Diese Scheibe wird auch „Chopper“ genannt. Sie lenkte das Licht alternierend auf zwei Monochromatoren, die auf die Anregungslichtwellen von 340 nm und 380 nm eingestellt wurden. Das Licht wurde dann über einen dichroischen Spiegel und ein Objektiv auf das Präparat geleitet, welches sich in einer 1 ml fassenden, transparenten Messzelle auf dem Objektträger befand.

Die Besonderheit des dichroischen Spiegels ist seine Halbdurchlässigkeit, die durch eine spezifische Wellenlänge charakterisiert ist. Die kritische Wellenlänge wurde so gewählt, dass sie zwischen den Anregungswellenlängen ($F_{340\ nm}$ und $F_{380\ nm}$) einerseits und der Emissionswellenlänge (510 nm) andererseits lag. Durch diese Eigenschaft konnte sichergestellt werden, dass das Präparat mit den Anregungswellenlängen beleuchtet wurde und dass das Emissionslicht aus dem Präparat durch den Spiegel hindurch gelassen wurde.

Über ein 40 er Objektiv und einen nur für 510 nm durchlässigen Filter gelangte das Emissionslicht in den Photomultiplier (Model 714, PTI). Hier wurde das emittierte Licht, einzelne Photonen, in ein elektrisches Signal umgewandelt, welches dann vom Computer digitalisiert wurde. Die Weiterverarbeitung der Daten erfolgte mit der Software FeliX® ver.1.1 (PTI: Photon Technology International, Birmingham, New Jersey, USA).

Fortsetzung Abb. 7

Damit es in der Beleuchtungsphase des Versuchs zu keinen Fehlmessungen durch Irritation des Photomultipliers mit Streulicht kommt, wurde ein automatisiertes Blendensystem in den Mikroskopaufbau integriert. Dieses sorgte dafür, dass während der Beleuchtungsphase der Photomultiplier vom Licht abgeshuttet wurde und während der Messphase die Beleuchtungsanlage abgeriegelt wurde. Es bestand somit eine gegensätzliche Verschaltung.

Die Beleuchtung der Präparate während der Versuche stellte ein Problem dar, da die Präparate einerseits beleuchtet werden mussten und andererseits ein Emissionslicht gemessen werden sollte, um intrazelluläre Ca^{2+} Veränderungen bestimmen zu können. Die Lösung des Problems lieferte eine für die Versuche von unsrer Arbeitsgruppe neu entwickelte automatisierte Lichtanlage. Diese bestand aus einem festgelegten Verschaltungsmuster von 2 Blenden (Shuttern).
Während der Beleuchtungsphasen konnte so der Photomultiplier vom einfallenden Licht abgeriegelt werden und während der Messphasen wurde das Licht der 8 klx. starken Glasfaser abgeschirmt. Durch diese Lichtabschirmung konnten systematische Messfehler verhindert werden.

2.3.2 Beladung der Präparate mit Fura-2

Die Präparate wurden mit 4 µM Fura-2-AM (Molecular Probes Inc., Oregon, USA) ca. 60 Minuten beladen. Fura-2-AM wurde hierzu in DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich, Steinheim) mittels eines Ultraschallbades und eines Schüttlers gelöst. Um eine Schaumbildung zu verhindern und eine Dispersion zu ermöglichen, wurde Pluronic (Molecular Probes Inc., Oregon, USA) hinzugefügt. Des Weiteren wurde Cremophor (Polyethoxyliertes Rhizinusöl, Sigma-Aldrich, Steinheim) hinzugegeben, um eine bessere Gewebepenetration und eine Stabilisierung der Dispersion sicherzustellen. Die Inkubation der Präparate erfolgte im Dunkeln sowie bei Raumtemperatur. Die Dunkelheit war erforderlich um dem Ausbleichen des Farbstoffes durch Raumlicht entgegen zu wirken. Der Vorteil der Inkubation bei Raumtemperatur gegenüber der Inkubation bei 37°C besteht in der homogeneren intrazellulären Verteilung des Farbstoffes. Außerdem tritt ein geringerer Farbstoffverlust durch Membrantransporter auf, da diese bei niedrigeren Temperaturen einen geringeren Aktivitätslevel besitzen (Malgaroli et al. 1987). Die 5-ALA Inkubation erfolgte zeitlich vor der Fura-2-Beladung in einem mit Krebslösung beheizten und begasten Laborgefäß.

2.3.3 Versuchsdurchführung

Nach Beladung der Präparate mit 5-ALA und Fura-2 wurden diese in einer fluoreszenzdurchlässigen, 1ml fassenden Messzelle in horizontaler Richtung mit 2 Nadeln an Silikonkissen fixiert. Der Strahlengang führte auf diesem Wege senkrecht durch das Präparat hindurch. Eines der Silikonkissen war mit einer Spannungsschraube versehen, um das Präparat vordehnen zu können. Um parallel zur Ca^{2+} Registrierung die Kraft messen zu können, wurde das andere Silikonkissen mit einem Transducer verbunden. Die Messzelle wurde mit Krebslösung befüllt, begast und auf 37°C kontinuierlich beheizt. Der Zu- und Abfluss der Messzelle erfolgte mit 1 ml fassenden Pipetten. Alle Versuche folgten dem gleichen Ablaufschema, welches an den Versuchsablauf im Organbad angelehnt war. Nach einer Anpassungsphase der Präparate in der Messzelle und der Überprüfung der ausreichenden Beladung mit Fura-2 (Emission zu Beginn 0,5 M Impulse pro Sekunde bei $F_{340\ nm}$ und 1 M Impulse pro Sekunde bei $F_{380\ nm}$) wurde zunächst eine ACh-Konzentrationstreppe durchgeführt. Dann erfolgte die Zugabe von ACh 1 µM, (-) Bay K 8644 1 µM und das Registrier-Beleuchtungsprogramm wurde gestartet. Ein Beleuchtungszyklus beinhaltete 20 Messintervalle bestehend aus 2 Sekunden Fluoreszenzregistrierung mit 100 „Counts“ pro Sekunde und 20 Sekunden Beleuchtungsphase mit einer Beleuchtungsstärke von 8 klx. Begonnen wurde dabei jeweils mit der Fluoreszenzregistrierung. Ein Zyklus dauerte somit ca. 7,3 Minuten und jedes Präparat durchlief 3 Beleuchtungszyklen mit 10 minütiger Dunkelphase zwischen den einzelnen Zyklen.

2.3.4 Auswertung der intrazellulären Ca^{2+} Messungen

Mit FeliX® wurde aus den gewonnenen Daten die Ratio RF ($F_{340\ nm}$ / $F_{380\ nm}$) ermittelt. Nach einer Datenübertragung erfolgte die weitere Auswertung mit Microsoft Excel Version 11.0. Die 200 Datenpunkte einer Registrierung (2 Sekunden mit je 100 Counts/s) wurden mit dem arithmetischen Mittel zusammengefasst.

Die parallel registrierte mechanische Aktivität wurde in % von ACh max. ausgedrückt (s. Abschn. 2.2.4).

2.4 Einsschlusskriterien und Statistik

In der Auswertung wurden nur Präparate berücksichtigt, die folgende Kriterien erfüllten:

- Spontanaktivität zu Versuchsbeginn
- Reaktion auf ACh-Konzentrationstreppe zu Versuchsbeginn
- keine Lichtreaktion bei Kontrollbeleuchtung (ohne Pharmaka)
- ausreichende Fura-2 Beladung (Fluoreszenzmikroskopmessungen)

Die statistischen Auswertungen beinhalten Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

$$\text{SEM} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

S= Standardabweichung der Stichprobe , n= Stichprobenumfang

Zur Signifikanzprüfung wurde je nach Fragestellung der t-Test für verbundene oder für unabhängige Stichproben angewandt.
Zum Vergleich motorischer Effekte und der Veränderung von $[Ca^{2+}]_i$ vor und nach 5-ALA-, (-)Bay K 8644- und Lichtbehandlung innerhalb einer Versuchsgruppe wurde der t-Test für verbundene Stichproben verwendet. Der t-Test für unabhängige Stichproben kam zum Einsatz, um unterschiedliche Organe und Konzentrationen miteinander vergleichen zu können. Außerdem wurde mit dem unabhängigen t-Test die Versuchsgruppe mit der Kontrollgruppe verglichen.

$$t = \frac{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}}$$

unabhängige Stichproben

$$t = \frac{\overline{D}}{\sqrt{\frac{s_d^2}{N}}}$$

verbundene Stichproben

X1 und X2 = Stichprobenmittelwerte der beiden miteinander zu vergleichenden Gruppen
S1 und S2 = empirischen Varianzen
N1, N2 und N = Stichprobenumfang
D = Differenz aus den Mittelwerten der beiden Variablen
Sd = Standardabweichung der einzelnen Differenzen

Als signifikant unterschiedlich wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von < 5% ($p < 0,05$) angesehen. Die signifikanten Unterschiede sind in den Abbildungen mit einem Stern (*) versehen.

3 Ergebnisse

3.1 Übersicht über die durch ACh, Bay K und 5-ALA ausgelösten motorischen Effekte an glattmuskulären Organen

Die in dieser Arbeit verwendeten Testsubstanzen zeigen separat für sich unterschiedliche Wirkungen am glatten Muskel.

ACh führt nach Applikation zu einer Tonuszunahme der glatten Muskulatur. Diese wird durch Bindung von ACh an den M_3 Rezeptor und die darauf folgende Signalkaskade hervorgerufen. Die Signalkaskade verläuft nach ACh Rezeptorbindung wie folgt:

Aktivierung G-Protein > Aktivierung Phospholipase C > Bildung IP_3 aus Membranphospholipiden > Ca^{2+} Freisetzung aus dem SR.

Neben diesem bei der Muskelkontraktion beteiligten Ca^{2+} Aktivierungsprozess existiert noch ein zweiter Aktivierungsprozess, der durch Öffnung membranständiger Ca^{2+} Kanäle ausgelöst wird. Diese unterschiedlichen Ca^{2+} Aktivierungsprozesse wurden von Golenhofen als T- und P-Systeme beschrieben (Golenhofen 1976). Die Aktivierung des T-Systems führt zu tonischen Kontraktionen und wird durch die oben beschriebenen intrazellulären Signalkaskaden induziert. Die Aktivierung des P-Systems führt zu phasischen Kontraktionen der glatten Muskulatur und ist bedingt durch das Öffnen membranständiger Ca^{2+} Kanäle. Häufig sind Mischformen aus beiden Systemen in glatter Muskulatur zu finden. Am Beispiel der Harnblase lassen sich zudem Spezies-Unterschiede hinsichtlich der Ausprägung des Ca^{2+} Influxes über membranständige Ca^{2+} Kanäle und der intrazellulären Ca^{2+} Speicherentleerung an der Teilhabe am Kontraktionsprozess feststellen (Wuest et al., 2007).

In Abb. 8 ist die Reaktion eines Harnblasenpräparates auf ACh Applikation dargestellt. Der zweigipfelige Verlauf des $[Ca^{2+}]_i$ verdeutlicht das Vorhandensein der zwei unterschiedlichen Ca^{2+} Aktivierungsprozesse. Der erste Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ erfolgt fast zeitgleich mit der Kraftzunahme und wird ausgelöst durch eine Ca^{2+} Freisetzung aus dem SR. Der zweite Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ ist durch das schnelle

Öffnen der membranständigen Ca^{2+} Kanäle bedingt. Die erwartete phasische Aktivität der Harnblase wird nicht deutlich sichtbar, da ACh in annähernd maximaler Wirkungskonzentration verabreicht wurde und sich eine tonische Dauerkontraktion einstellte.

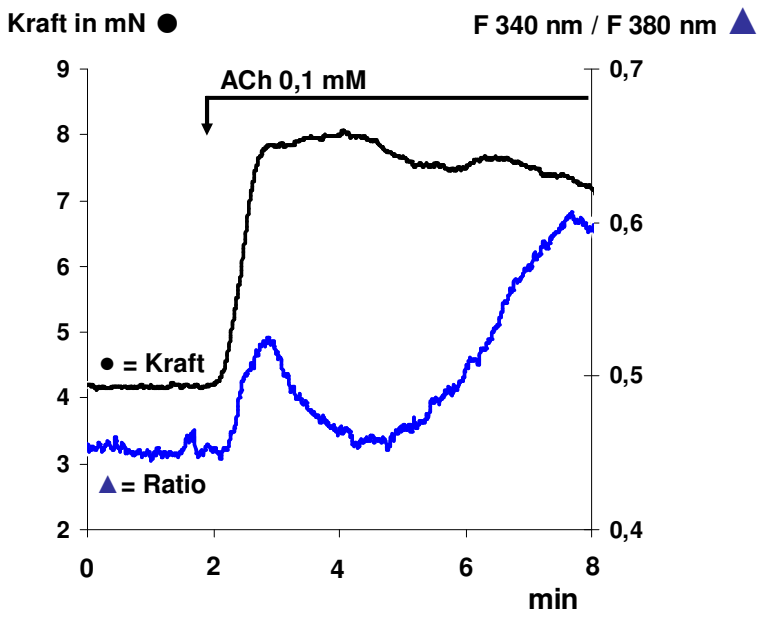


Abb. 8 Simultane Registrierung von Kraft und $[Ca^{2+}]_i$ eines Harnblasenpräparates der Ratte im Fluoreszenzmikroskop unter Applikation von ACh 0,1 mM

Die relative Änderung des $[Ca^{2+}]_i$ (Ratio) ist angegeben als Quotient der gemessenen Fluoreszenz bei 510 nm zum einen bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und zum anderen bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm.

Zu Erkennen ist eine starke Zunahme des Kraftsignals direkt im Anschluss an die ACh Applikation. Die Ratiokurve zeigt, nachdem ACh appliziert wurde, einen zweigipfeligen Verlauf. Der erste Anstieg erfolgt fast zeitgleich mit dem Kraftsignal. Der zweite Anstieg der Ratio erfolgt mit einer Latenz von etwa 2 min und fällt deutlich größer aus. Dieser zweigipfelige Kurvenverlauf der relativen $[Ca^{2+}]_i$ Änderung zeigt das Vorhandensein zweier Ca^{2+} Aktivierungsprozesse der Harnblase.

Das (-) Enantiomer von Bay K 8644 ist ein L-Typ Ca^{2+} Kanal Agonist. Durch das über die membranständigen Ca^{2+} Kanäle einströmende Ca^{2+} nimmt die phasische

Spontanaktivität der Harnblase nach Bay K Applikation zu, wie in Abb. 9 zu erkennen ist.

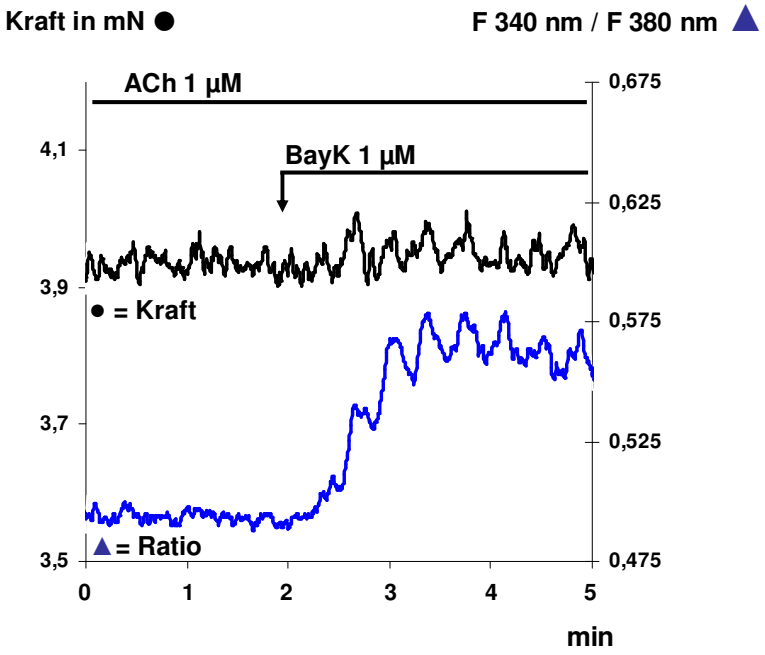


Abb. 9 Fluoreszenzmikroskopisch darstellbare Wirkung von Bay K auf die Kraft und das relative $[Ca^{2+}]_i$ an einem ACh 1 µM voraktiviertem Harnblasenpräparat der Ratte
Die Ratio nimmt kurz nachdem Bay K 1 µM appliziert wurde zu und zeigt einen phasischen Verlauf. Bei der Betrachtung des Kraftsignals fällt auf, dass die phasische Aktivität des Präparates zunimmt. Die bereits bekannte L-Typ Ca^{2+} Kanal agonistische Wirkung des Bay K kann hier gezeigt werden.

Darüber hinaus besitzt Bay K eine photorelaxierende Eigenschaft. Durch Licht wird aus dem Bay K Molekül NO freigesetzt, welches zu einer Muskelrelaxation über intrazelluläre Signalwege führt (s. Abschn. 1.2.2). Diese Signalkaskade setzt sich wie folgt zusammen:
NO aktiviert die lösliche Guanylat Cyclase, welche aus GTP durch Phosphatabspaltung den second messenger cGMP generiert. Eine Aktivierung der Myosin-leichte-Ketten-Phophatase durch cGMP führt zur Muskelrelaxation. In Abb. 10 ist

die reversible photorelaxierende Wirkung von Bay K an Kraftmessungen im Organbad bei einem Präparat des Magenfundus veranschaulicht.

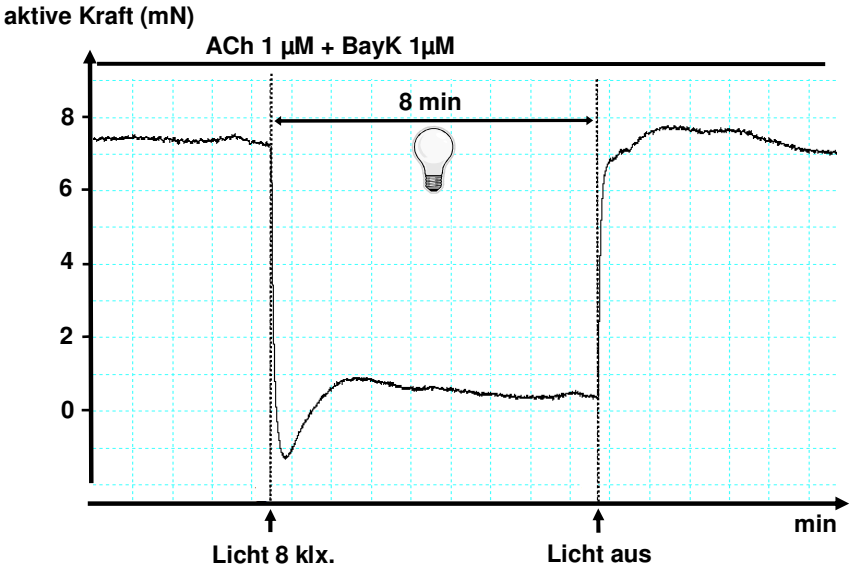


Abb. 10 Kraftmessungen im Organbad zur photorelaxierenden Wirkung von Bay K am glatten Muskel des Magenfundus

Eine Voraktivierung des Präparates mit ACh 1 µM und die Applikation von Bay K 1 µM sind vor Beleuchtungsbeginn erfolgt. Auf der y-Achse ist die aktive Kraft in mN aufgetragen. Diese wurde bestimmt durch Subtraktion der passiven Vordehnung der Präparate von den abgebildeten jeweiligen Messwerten.

Es fällt auf, dass die aktive Kraft sofort nach Einschalten des Lichtes abfällt. Initial fällt sie sogar unter den Wert der passiven Vordehnung des Präparates. Gleichermaßen schnell kehrt die aktive Kraft nach Abschalten des Lichtes zum Ausgangsniveau, welches vor der Beleuchtung herrschte, zurück.

Die motorischen Wirkungen von 5-ALA am glatten Muskel lassen sich nur in der Betrachtung des Langzeitverlaufs eines Versuchs erkennen. Das überwiegend phasische Aktivität aufweisende Magenantrumpräparat der Ratte zeigt im Langzeitverlauf im Organbad eine irreversible Abnahme der Amplitude der phasischen Komponente sowie einen Verlust der aktiven Kraft (s. Abb. 11).

Unter den 8 minütigen Beleuchtungen mit 8 klx. ist der Verlust der phasischen Aktivität am massivsten ausgeprägt.

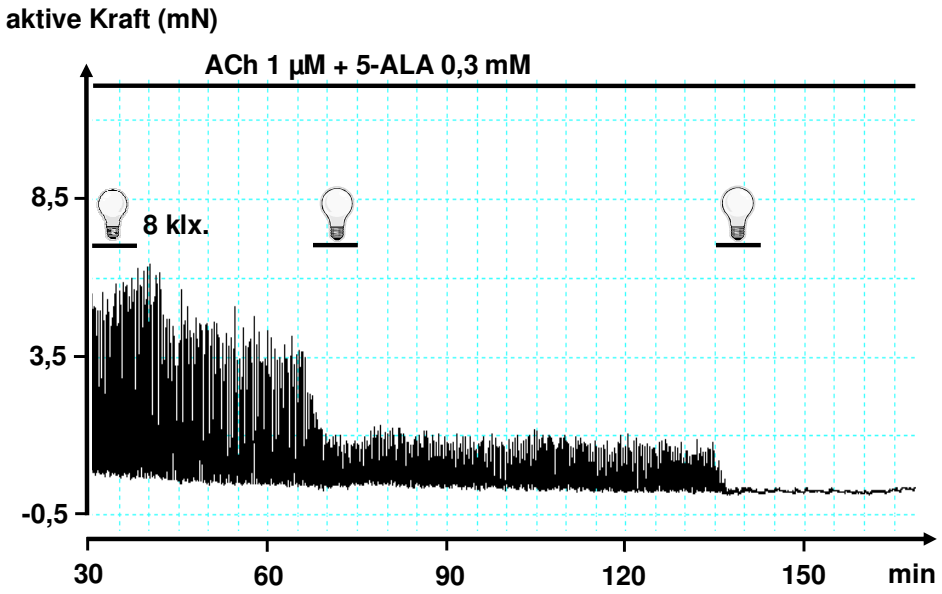


Abb. 11 Langzeitwirkung von 5-ALA 0,3 mM und Licht auf die aktive Kraft am ACh 1 µM voraktivierten Präparat des Magenantrums im Organbad

Zu bemerken ist eine irreversible Abnahme der phasischen Aktivität und der aktiven Kraft des Magenantrums über die Versuchsdauer. Unter den jeweiligen 8 minütigen Beleuchtungen mit 8 klx. ist der Verlust der phasischen Aktivität am stärksten ausgeprägt.

Zur Ausarbeitung und Systematisierung einer geeigneten Versuchsanordnung im Organbad, die später auf das Fluoreszenzmikroskop übertragen werden konnte, wurden 10 Vorversuche im Organbad durchgeführt. Durch diese Testversuche wurden die adäquaten Versuchsparameter festgesetzt. Zu diesen zählten die Auswahl der glattmuskulären Präparatetypen, die idealen Konzentrationen von 5-ALA, (-) Bay K 8644 und ACh, die Inkubationszeit der Präparate mit 5-ALA, die Dauer und Intensität der Lichtzufuhr, sowie die Anzahl der Beleuchtungs- und Dunkelzyklen.

3.2 Wirkung von 5-ALA, (-) Bay K 8644 und Licht auf den Tonus von verschiedenen glattmuskulären Organen

Um die Effekte der lichtsensitiven Substanzen am glatten Muskel der Ratte systematisch erfassen zu können, wurden die Versuche zum einen nur mit der lichtsensitiven Substanz 5-ALA durchgeführt und zum anderen in der Kombination der beiden lichtsensitiven Substanzen 5-ALA und Bay K. Als Negativkontrolle diente eine ACh 1µM Versuchsreihe. Der Versuchsablauf mit den jeweiligen Kombinationen und Konzentrationen folgte immer dem gleichen Versuchsschema (s. Abschn. 2.2.3).

3.2.1 Motorische Effekte durch 5-ALA

Nach Applikation von 5-ALA 0,3 mM, ACh 1 µM und einer 60 minütigen Inkubationszeit der Substanzen im Organbad konnte man bei den einzelnen Präparaten unterschiedliche Reaktionen auf Licht mit einer Stärke von 8 klx. feststellen (s. Abb. 12). Auf der y-Achse ist die aktive Kraft in mN dargestellt. Diese wurde, wie bereits unter 2.2.4 erläutert, durch Subtraktion der passiven Vordehnung der Präparate von den abgebildeten jeweiligen Messwerten bestimmt.
Abb. 12a zeigt einen Ausschnitt des Magenfundus. Während der 8 Minuten dauernden Beleuchtungsphase des Präparates ist ein einphasiger Verlauf der Tonuskurve zu erkennen. Er setzt sich chronologisch zusammen aus:
Abnahme-Zunahme-Abnahme des Tonus. Nach Abschalten des Lichtes zeigt die Tonuskurve einen plateauförmigen Verlauf, der schon vor Beleuchtungsbeginn zu registrieren war. Das Tonusniveau liegt dabei leicht unter dem, welches vor der Beleuchtung herrschte.
Beim Magenantrum (s. Abb. 12b) sind vor der Beleuchtung phasische Kontraktionen auszumachen. Durch Einschalten der Beleuchtung nach 60 min erlischt die phasische Aktivität fast vollständig und es kommt zu einer Tonuszunahme. Die phasische Aktivität kehrt auch nach Abschalten des Lichtes nicht zurück. Des Weiteren stellt sich nach Ende der Beleuchtung ein erhöhtes Tonusniveau, im

Vergleich zum Tonusniveau, welches vor der Beleuchtung existierte, ein.
Die Portalvene ist in Abb. 12c dargestellt. Bei ihr lassen sich eine Abnahme der phasischen Aktivität, sowie eine Abnahme der Amplitude der phasischen Komponente durch die Beleuchtung feststellen. Der Effekt tritt nach ca. 2 minütiger Beleuchtung ein und ist irreversibel. Der Tonus nimmt minimal durch die Beleuchtung zu.

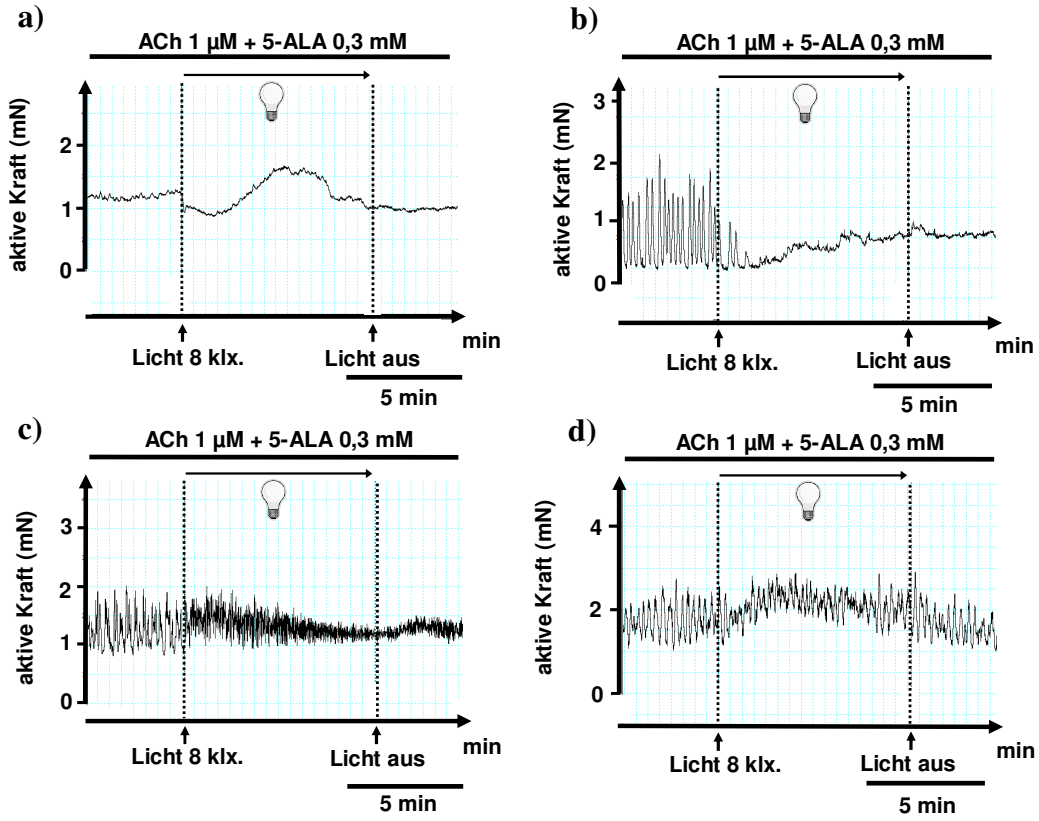


Abb. 12 Wirkung von Licht auf den Tonus verschiedener glattmuskulärer Organe der Ratte

60 Minuten vor Beginn der Beleuchtung wurde 5-ALA 0,3 mM und ACh 1 µM zu den Präparaten in die Organbäder appliziert.

a) Magenfundus b) Magenantrum c) Portalvene d) Harnblase

Zusammenfassend lassen sich eine Abnahme der phasischen Aktivität und eine Zunahme des Tonus durch die Beleuchtung feststellen.

Eine Tonuszunahme unter Beleuchtung ist bei der Harnblase zu beobachten (s. Abb. 12d). Die phasische Aktivität nimmt unter Beleuchtung ab, erreicht jedoch nach Abschalten des Lichtes, ebenso wie der Tonus, das Ausgangsniveau wieder zurück.

3.2.2 Kombinierte Wirkung von 5-ALA und (-) Bay K 8644

In der Fortsetzung der Experimente aus Abb. 12 wurde zu den mit 5-ALA 0,3 mM und ACh 1 µM behandelten Präparaten des Magenfundus, des Magenantrums, der Portalvene und der Harnblase (-) Bay K 8644 1 µM appliziert und anschließend gleichermaßen mit 8 klx. beleuchtet. Die Lichtreaktionen auf die kombinierte Gabe der beiden lichtsensitiven Substanzen sind in Abb. 13 veranschaulicht. Zwischen Abb. 12 und Abb. 13 liegt ein zeitlicher Versatz von 90 Minuten.
Alle Präparate weisen einen Zuwachs der aktiven Kraft im zeitlichen Versuchsablauf auf, der sich im Vergleich mit Abb. 12 erkennen lässt.
Beim Magenfundus (s. Abb. 13a), Magenantrum (s. Abb. 13b) und der Portalvene (s. Abb. 13c) lässt sich nach Anschalten der Beleuchtungsquelle eine initiale minimale Abnahme des Tonus erkennen. Nach Abschalten des Lichtes kehrt der Tonus zum Ausgangsniveau, das vor der Beleuchtung existierte, zurück. Darüber hinaus zeigen die drei Präparate keinerlei phasische Spontanaktivität mehr (vgl. Abb. 12 a-c).
Die Harnblase (s. Abb. 13d) zeigt als einziges Präparat in dieser Abbildung eine starke Zunahme des Tonus, welche durch die Beleuchtung ausgelöst wurde. Nach Beendigung der Lichtzufuhr nimmt der Tonus leicht ab und erreicht ein Tonusplateau, das über dem vor der Beleuchtung herrschenden Ausgangstonus liegt. Die phasische Aktivität der Harnblase hat stark abgenommen im Vergleich zu Abb.12.

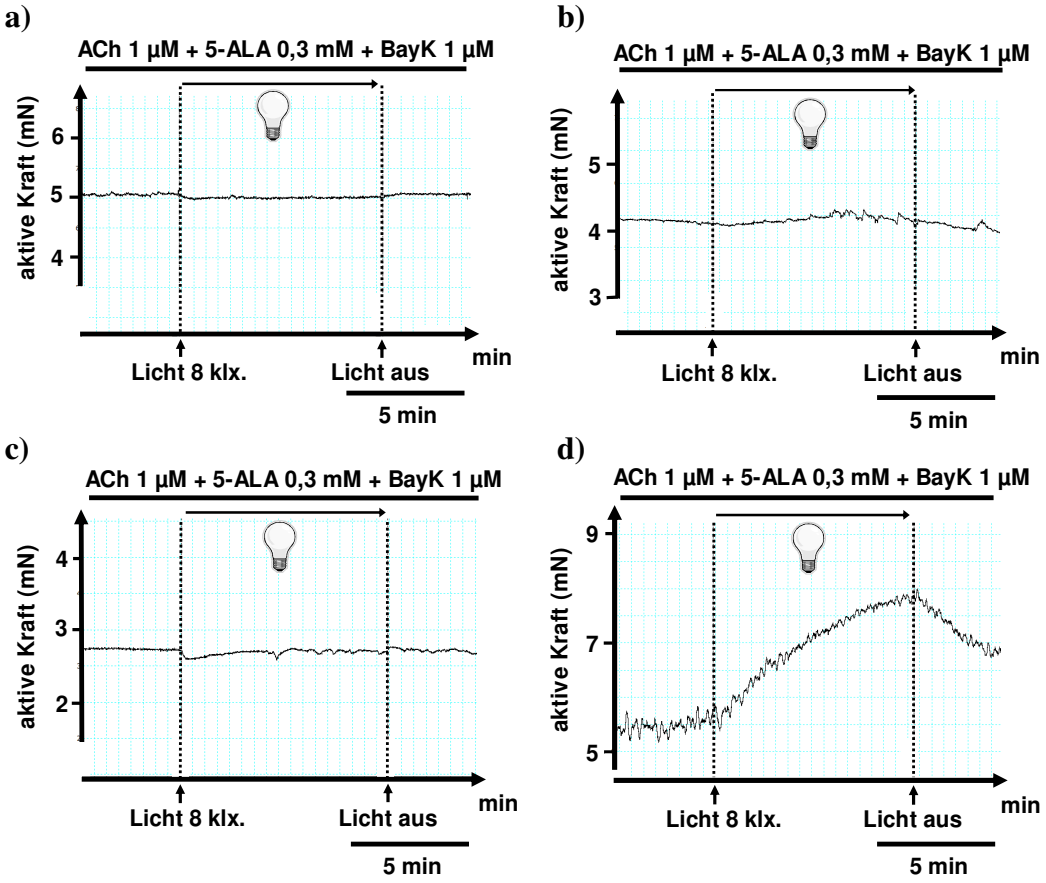


Abb. 13 Wirkung von Licht auf mit 5-ALA 0,3 mM, (-) Bay K 8644 1µM und ACh 1 µM vorbehandelte glattmuskuläre Organe der Ratte

Es handelt sich um die Fortsetzung der Experimente, die in Abb. 12 dargestellt sind mit einem zeitlichen Versatz von 90 Minuten.

a) Magenfundus b) Magenantrum c) Portalvene d) Harnblase

Lediglich das Harnblasenpräparat zeigt eine starke Reaktion auf Licht in Form einer Kontraktionszunahme. Alle Präparate weisen einen Zuwachs der aktiven Kraft im zeitlichen Versuchsverlauf auf. Dieser Zuwachs wird im Vergleich von Abb. 13 mit Abb. 12 deutlich. Phasische Aktivitätskomponenten sind fast vollständig erloschen.

3.3 Alleinige und kombinierte Wirkung von 5-ALA, (-) Bay K 8644 und Licht an zwei charakteristischen glattmuskulären Organen

Glatte Muskulatur verfügt über zwei unterschiedliche Ca^{2+} Aktivierungsprozesse (s. Abschn. 3.1). Die folgenden zwei ausgewählten Präparatetypen weisen unterschiedliche Ausprägungen der zwei Ca^{2+} Aktivierungsprozesse auf. Der Magenfundus verfügt über ein stark ausgeprägtes T-System mit fast rein tonischer Aktivierung. Bei der Harnblase hingegen dominiert das P-System mit überwiegend phasischer Ca^{2+} Aktivierung. Diese auch in der mechanischen Aktivität zu beobachten Eigenschaften weisen auf das Zusammenspiel von interstitiellen Cajal-Zellen (s. Abschn. 4.2.1) und intrazellulären Prozessen bei der Muskelkontraktion hin.

3.3.1 Magenfundus

Durch unterschiedliche Konzentrationen in der Kombination 5-ALA + Bay K am Magenfundus lassen sich verschiedene Reaktionstypen und -intensitäten beobachten. Insgesamt wurden 3 Versuchsreihen gebildet:
eine ACh 1 µM Negativkontrolle, eine 5-ALA 0,1 mM Versuchsreihe sowie eine 5-ALA 0,3 mM Versuchsreihe, die alle dem Versuchsschema aus 2.2.3 folgten. Der Stichprobenumfang für die jeweilige Versuchsreihe bezifferte sich auf n = 3. In Abb. 14 ist eine Originalregistrierungskurve einer Versuchsreihe dargestellt, die mit 5-ALA 0,1 mM und ACh 1 µM vorinkubiert wurde. Auf der y-Achse ist die aktive Kraft in mN angegeben. Die Größe wird gebildet durch Subtraktion der passiven Vordehnung der Präparate von den abgebildeten jeweiligen Messwerten. Zu erkennen sind 2 Beleuchtungen mit 5-ALA 0,1 mM und ACh 1 µM Applikation und 6 Beleuchtungen mit kombinierter Gabe von 5-ALA 0,1 mM, ACh 1 µM und Bay K in zwei unterschiedlichen Konzentrationen. Beleuchtet wurde jeweils mit 8 klx. über einen Zeitraum von 8 min.
Zu Versuchsbeginn, als sich lediglich 5-ALA und ACh im Organbad befanden, dauerten die Dunkelphasen länger (s. Abschn. 2.2.3) und wurden zur besseren

Darstellung aus der Registrierungskurve herausgeschnitten. Nach Applikation von Bay K waren die Dunkelphasen stets gleich lang mit einer Dauer von 10 min.

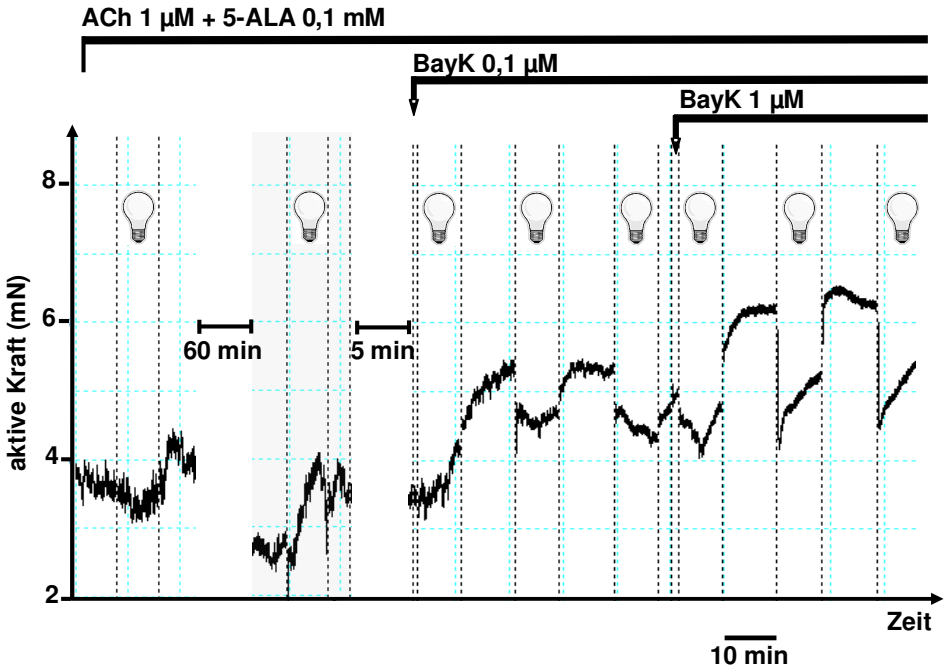


Abb. 14 Wirkung von Licht auf unterschiedliche (-) Bay K 8644 Konzentrationen am mit 5-ALA 0,1 mM und ACh 1 mM vorbehandelten Magenfundus

Beleuchtet wurde mit 8 klx. jeweils 8 min lang. Zu erkennen ist eine Tonuszunahme des Präparates über die Versuchsdauer. Nach Applikation von Bay K führt die Beleuchtung zu einer initialen Hemmung des Tonus. Diese initiale Tonusabnahme fällt am stärksten bei der höheren Bay K Konzentration aus. Nach Abschalten des Lichtes steigt der Tonus umgehend wieder an.

Bei genauer Betrachtung der Abbildung fällt auf, dass die aktive Kraft des Magenfundus durch die Beleuchtungen über den Zeitraum der Versuchsdauer zunimmt. Die Reaktionen des Präparates auf Beleuchtung fallen unterschiedlich aus. Die Lichtwirkung auf das mit 5-ALA vorinkubierte Präparat ist anfänglich eine Hemmung, 60 min später hingegen lässt sich eine Aktivierung des Tonus durch Licht feststellen. Sieht man sich demgegenüber die Lichtwirkung nach Applikation von

Bay K an, so lässt sich bis auf die erste Beleuchtung bei Bay K 0,1 mM eine Hemmung der aktiven Kraft erkennen. Diese Minderung des Tonus durch Licht ist bei Bay K 0,1 µM gleich bleibend, hingegen bei Bay K 1 µM nur initial während der ersten Sekunden der Beleuchtung zu registrieren. Nach der initialen Lichthemmung bei Bay K 1 µM setzt ein gleichförmiger Tonusanstieg über die verbleibende Beleuchtungszeit ein. Nach Abschalten des Lichtes kehrt die aktive Kraft bei beiden Bay K Konzentrationen umgehend zu dem Kraftniveau zurück, welches vor der Beleuchtung herrschte, bzw. geht darüber hinaus.
Abb. 15 zeigt eine Originalregistrierungskurve einer Versuchsreihe, zu der 5-ALA 0,3 mM verabreicht wurde. Der Aufbau der Abbildung ist dem in Abb. 14 analog.

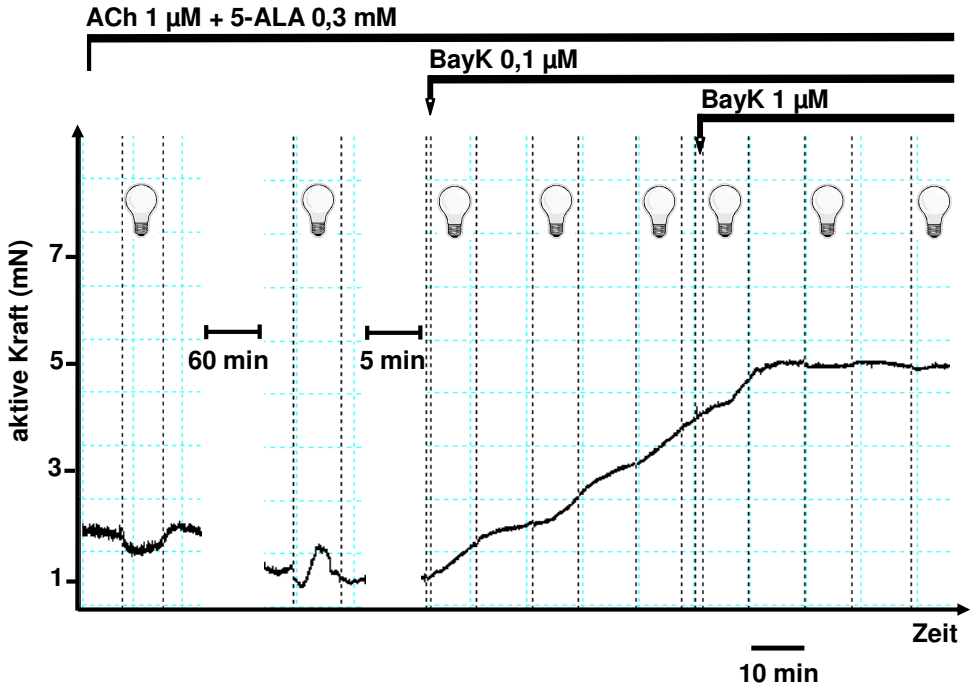


Abb. 15 Wirkung von Licht am mit 5-ALA 0,3 mM und ACh 1 µM vorbehandelten Magenfundspräparat auf unterschiedliche (-) Bay K 8644 Konzentrationen

Die Beleuchtungsphasen dauerten jeweils 8 min bei einer Stärke von 8 klx. Der durch Beleuchtung ausgelöste Tonusanstieg über die Versuchsdauer fällt am größten aus nach Applikation von Bay K 0,1 µM. Unter dieser Rahmenbedingung steigt der Tonus auch in den Dunkelphasen weiter an.

Ebenso wie beim Präparat, welches mit 5-ALA 0,1 mM vorinkubiert wurde, ist beim Magenfundus mit 5-ALA 0,3 mM Applikation eine Tonuszunahme durch Beleuchtung über die Dauer der Versuchszeit zu erkennen. Der stärkste Anstieg des Tonus findet unter Beleuchtung nach Applikation von Bay K 0,1 µM statt. In dieser Substanzkonstellation ist auch in den Dunkelphasen ein Tonusanstieg zu erkennen. Nach Applikation von Bay K 1 µM ist eine Zunahme des Tonus nur in der direkt folgenden Beleuchtung zu registrieren. In den beiden sich anschließenden Beleuchtungen ist eine minimale Abnahme des Tonus auszumachen. Wie beim mit 5-ALA 0,1 mM vorinkubierten Magenfundus lassen sich auch beim mit 5-ALA 0,3 mM vorbehandelten Magenfundus vor Applikation von Bay K unterschiedliche Reaktionen des Tonus auf Lichtzufuhr bemerken. Anfangs führt die Beleuchtung zu einer Hemmung der aktiven Kraft, wobei 60 min später eine Aktivierung des Tonus durch Licht zu beobachten ist.

Betrachtet man die unterschiedlichen Versuchsreihen über die gesamte Versuchsdauer mit 9 Beleuchtungszyklen à 8 Minuten, so erhält man einen Kraft-Zeit-Verlauf (s. Abb. 16). Der Versuchsablauf mit Substanzapplikationen und Beleuchtungsphasen zu unterschiedlichen Zeitpunkten folgte dabei immer dem gleichen Schema (s. Abschn. 2.2.3).

Die Punkte in den Kraft-Zeit-Verläufen repräsentieren Mittelwerte mit den entsprechenden SEMs, die durch Integration der Kraft während der letzten Minute des jeweiligen Beleuchtungszyklus bzw. der Reaktionsphase erfasst wurden. Nachdem durch die Zeit dividiert und die passive Vordehnung subtrahiert wurde, konnten die Mittelwerte in Bezug zu ACh max. gesetzt werden. Der endprozeduale Tonus charakterisiert den Kraftwert, der nach Ausspülen der Substanzen gemessen wurde. Als Reaktionsfähigkeit der Präparate am Versuchsende auf ACh 10 µM wird der ACh Endwert definiert. Obgleich der Stichprobenumfang bei den Versuchsreihen des Magenfundus mit einem n = 3 sehr gering war und ein Test auf Signifikanz nicht durchgeführt wurde, lassen sich dennoch deutliche Unterschiede feststellen. Eine Signifikanz wäre bei einem größeren Stichprobenumfang sicher feststellbar.

Die Wirkung von Licht auf Versuchsreihen mit 5-ALA 0,1 mM Applikation, entweder in Kombination mit Bay K oder als 5-ALA Zeitkontrolle, ist im oberen Diagramm der Abb. 16 dargestellt. Es fällt auf, dass in der Versuchsreihe mit Bay K Applikation ein höheres Kraftniveau durch Beleuchtung erreicht wird. Der Tonus in der 5-ALA Zeitkontrolle verbleibt durch die Beleuchtung hingegen auf einem konstanten Niveau. Der endprozeduale Tonus in der 5-ALA Zeitkontrolle liegt bei -20,90 ± 16,36 %. Da zu Beginn der passive Tonus als Nulllinie definiert wurde, kann man einen Tonusverlust der Präparate über die Zeit feststellen. In der Versuchsreihe mit Bay K Applikation beträgt der endprozeduale Tonus 64,63 ± 24,17 %. Der ACh-Endwert liegt in der Versuchsreihe mit Bay K Applikation höher als in der 5-ALA Zeitkontrolle (114,46 ± 21,44 % mit Bay K; 93,00 ± 3,88 % ohne Bay K).

Der Kraft-Zeit-Verlauf im unteren Diagramm der Abb. 16 repräsentiert die Versuchsreihen mit 5-ALA 0,3 mM Applikation. Die obere Versuchsreihe erhielt zusätzlich Bay K, die untere Kurve fungierte als 5-ALA Zeitkontrolle. Bei der Versuchsreihe mit Bay K Applikation nimmt nach Bay K Applikation unter Beleuchtung der Tonus sehr stark zu und liegt am Ende der letzten Beleuchtungsphase über dem ACh max. Wert (121,95 ± 18,81 %). Der endprozeduale Tonus beträgt 123,24 ± 20,41 %. Der ACh-Endwert beträgt 131,61 ± 25,47 %. Ein kontinuierlicher Abfall des Tonus über die Versuchsdauer ist in der 5-ALA Zeitkontrolle festzustellen. Ab dem 5. Beleuchtungszyklus nimmt der Tonus negative Werte an. Der endprozeduale Tonus beträgt -38,09 ± 10,41 %. Der ACh-Endwert beträgt 25,31 ± 3,70 %.

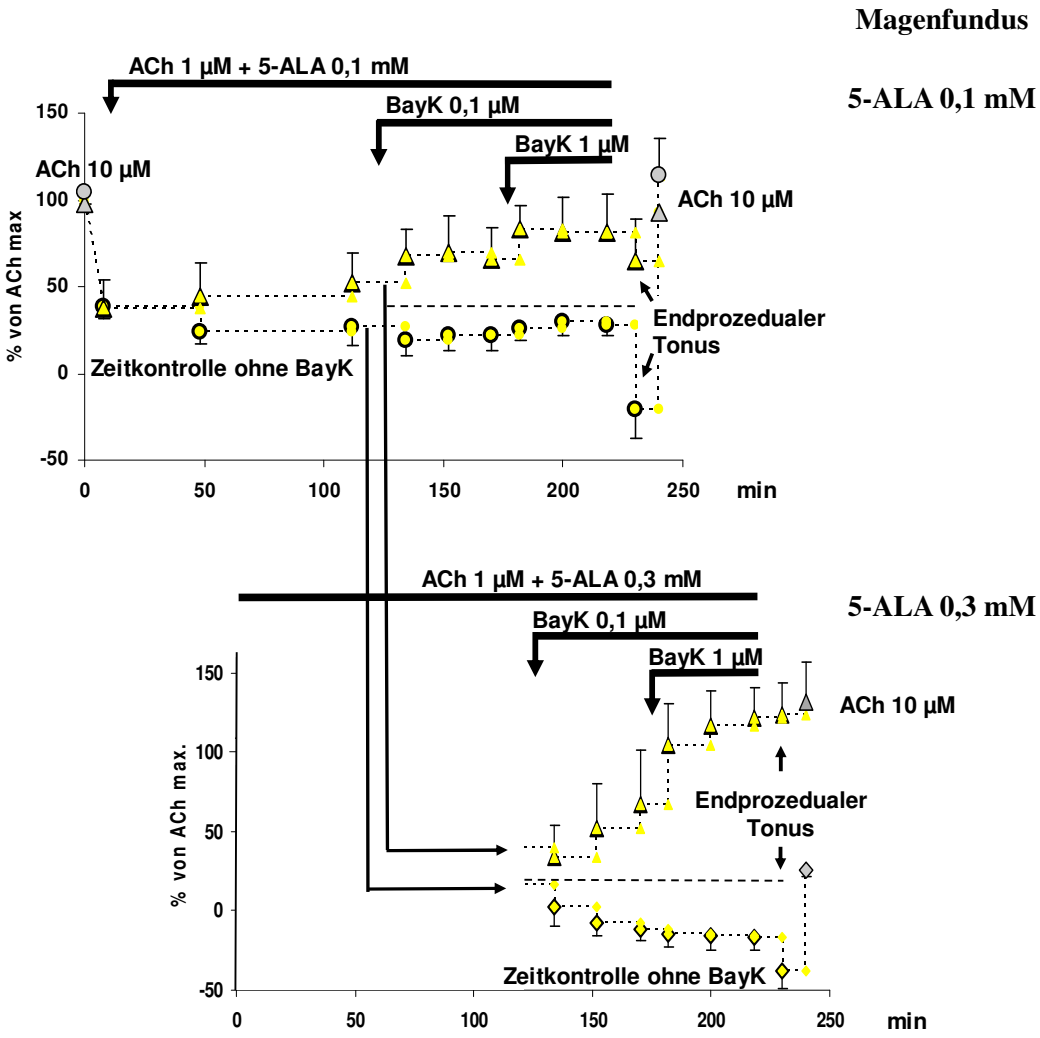


Abb. 16 Wirkung von Licht im Kraft-Zeit-Verlauf auf die glatte Muskulatur der mit Ach 1 µM voraktivierten unterschiedlichen Versuchsreihen des Magenfundus

Dargestellt sind Mittelwerte und SEMs, die während der letzten Minute der Beleuchtungs- oder Reaktionsphase gemessen wurden. Der Stichprobenumfang der jeweiligen Versuchsreihe bezifferte sich auf n=3. Im oberen Diagramm ist der Kraft-Zeit-Verlauf von 5-ALA 0,1 mM Versuchsreihen und im unteren Diagramm der Kraft-Zeit-Verlauf von 5-ALA 0,3 mM Versuchsreihen abgebildet. Die Versuchsreihen, die jeweils in den oberen Kurven zu sehen sind, erhielten als Substanzapplikation 5-ALA und Bay K (▲= mit Bay K). Die unteren Versuchsreihen repräsentieren 5-ALA Zeitkontrollen, bei denen keine Bay K Applikation erfolgte (● / ◊ = ohne Bay K). Da die ersten 3 Beleuchtungswerte der 4 Versuchreihen nicht stark voneinander abweichen, wurden sie im unteren Diagramm nicht berücksichtigt. *(Fortsetzung s. S. 49 unten)*

3.3.2 Harnblase

Unterschiedliche durch Licht ausgelöste Reaktionen der Muskelkontraktion lassen sich auch bei dem überwiegend phasisch aktivierten glatten Muskel der Harnblase nach Vorinkubation mit 5-ALA und ACh sowie folgender Applikation von Bay K feststellen.

Bei der Harnblase wurden ebenfalls 3 Versuchsreihen mit jeweils einem n = 3 gebildet, bestehend aus ACh 1 µM Negativkontrolle, 5-ALA 0,1 mM und 5-ALA 0,3 mM Versuchsreihe. Das Versuchsschema aus 2.2.3 wurde in allen 3 Reihen berücksichtigt.

Die folgenden Abbildungen 17 und 18 zeigen Originalregistrierungskurven der Harnblase und sind gleichermaßen aufgebaut wie die Abbildungen 14 und 15 beim Magenfundus.

Über den Zeitraum der Versuchsdauer ist eine Zunahme der aktiven Kraft durch Beleuchtung an der mit 5-ALA 0,1 mM und ACh 1 µM vorbehandelten Harnblase zu erkennen (s. Abb. 17). Eine Änderung der phasischen Aktivität durch Licht lässt sich nicht bemerken. Die Reaktionen des Tonus auf Licht zeigen vor Applikation von Bay K unter der ersten Beleuchtung keine und unter der zweiten Beleuchtung eine minimale Zunahme.

Fortsetzung Abb. 16

Der endprozeduale Tonus charakterisiert den Kraftwert, der nach Ausspülen der Substanzen gemessen wurde. Der ACh Endwert ist definiert als die Reaktionsfähigkeit der Präparate am Versuchsende auf ACh 10 µM Applikation.

Zu erkennen ist eine deutliche Zunahme der Kraft infolge der Beleuchtung bei den Versuchsreihen mit der kombinierten Gabe von 5-ALA und Bay K. Bei der Versuchsreihe mit 5-ALA 0,3 mM in Kombination mit Bay K fällt die Kraftzunahme am stärksten aus. Die ACh Endwerte übersteigen bei beiden Versuchsreihen mit der kombinierten Gabe den Ausgangswert von 100%, welcher zu Versuchsbeginn ermittelt wurde.

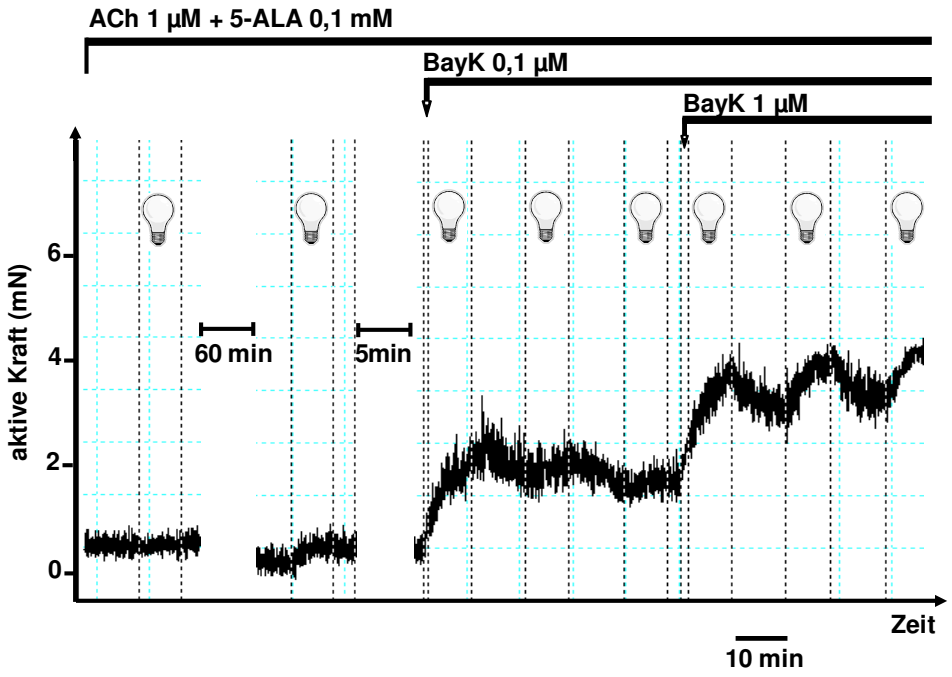


Abb. 17 Wirkung von Licht auf unterschiedliche (-) Bay K 8644 Konzentrationen an der mit 5-ALA 0,1 mM und ACh 1 µM vorbehandelten Harnblase

Die Lichtzufuhr dauerte jeweils 8 min bei einer Stärke von 8 klx.

Zu erkennen ist eine Tonuszunahme durch Beleuchtung nach Applikation von Bay K. Ein einmaliger deutlicher Tonusanstieg durch Licht ist nach Zugabe von Bay K 0,1 µM festzustellen. Nach Applikation von Bay K 1 µM ist bei jeder Beleuchtung ein Tonusanstieg zu sehen. In den dazwischen gelegenen Dunkelphasen nimmt der Tonus gleichmäßig wieder ab.

Nach Applikation von Bay K 0,1 µM nimmt der Tonus in der nachfolgenden Beleuchtung deutlich zu. In den weiteren beiden Beleuchtungen ist die Tonuszunahme geringer ausgeprägt. Die dazwischen liegenden 10 minütigen Dunkelphasen zeigen eine Abnahme des Tonus. Nach Applikation von Bay K 1 µM bewirkt jede Beleuchtung einen Tonusanstieg. Diese Tonusanstiege weisen in etwa die gleiche Anstiegssteilheit auf. In den dazwischen gelegenen Dunkelphasen nimmt der Tonus gleichförmig wieder ab. Die in Abb. 18 dargestellte Originalregistrierungskurve einer mit 5-ALA 0,3 mM und ACh 1 µM vorbehandelten Harnblase zeigt einen deutlichen Anstieg der aktiven Kraft durch Beleuchtung über die Dauer des

Versuchzeitraumes. Bei sorgfältiger Betrachtung fällt auf, dass die phasische Aktivität der Harnblase nach Bay K 1 µM Applikation und anschließender Beleuchtung fast vollständig erlischt. Die durch Licht ausgelösten Kontraktionsänderungen sind nicht gleichartig. Vor Applikation von Bay K lässt sich unter der ersten Beleuchtung keine und unter der zweiten Beleuchtung eine minimale initiale Tonuszunahme feststellen.

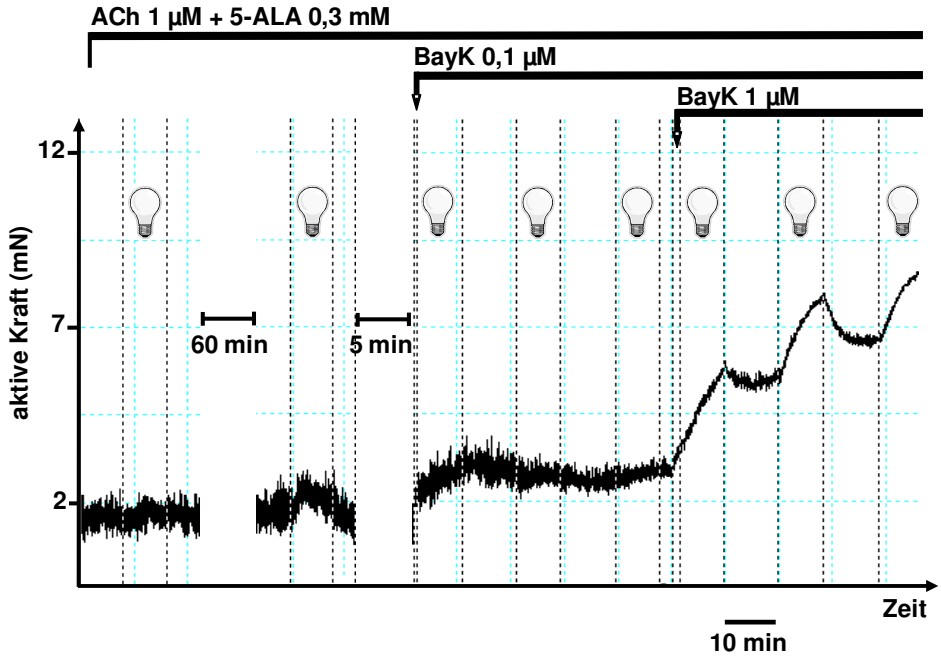


Abb. 18 Wirkung von Licht an der mit 5-ALA 0,3 mM und ACh 1 µM vorbehandelten Harnblase, auf unterschiedliche (-) Bay K 8644 Konzentrationen

Beleuchtet wurde jeweils 8 min mit 8 klx. Bei genauer Betrachtung fällt auf, dass die phasische Aktivität der Harnblase nach Bay K 1 µM Applikation und anschließender Beleuchtung fast vollständig erlischt. Ferner nimmt, nach Applikation von Bay K 1 µM, der Tonus durch die Beleuchtung deutlich zu.

Nach Applikation von Bay K 0,1 µM rufen nur die erste und die dritte Beleuchtung einen leichten Tonusanstieg hervor. Wesentlich stärkere Änderungen des Tonus in Form einer Zunahme sind durch Beleuchtung nach Applikation von Bay K 1 µM erkennbar. In den dazwischen liegenden Dunkelphasen nimmt der

Tonus wieder ab und ein Tonusplateau stellt sich ein, welches über dem Tonusniveau liegt, das vor Beleuchtung herrschte.

Der Verlauf der Kraftentwicklung über die Versuchsdauer ist in Abb. 19 dargestellt. Die Diagramme folgen der gleichen Anordnung wie beim Magenfundus unter 3.3.1 beschrieben wurde. Abgebildet sind Mittelwerte mit den entsprechenden SEMs, die durch Integration der Kraft während der letzten Minute des jeweiligen Beleuchtungszyklus bzw. der Reaktionsphase erfasst wurden. Eine Testung auf Signifikanz wurde bei der Harnblase aufgrund des geringen Stichprobenumfanges von n = 3 ebenfalls nicht durchgeführt. Ein größerer Stichprobenumfang würde bei der Harnblase, ebenso wie beim Magenfundus, die deutlich erkennbaren Unterschiede zwischen den Versuchsreihen mit Bay K Applikation und den 5-ALA Zeitkontrollen signifikant zeigen.

Der Kraft-Zeit-Verlauf der Versuchsreihen 5-ALA 0,1 mM mit Bay K Applikation sowie die 5-ALA 0,1 mM Zeitkontrolle sind im oberen Diagramm der Abb. 19 zu sehen. Die Versuchsreihe mit kombinierter 5-ALA und Bay K Applikation zeigt ab einer Bay K Konzentration von 1 µM und Beleuchtung (7.-9. Beleuchtungszyklus) ein höheres Tonusniveau als die 5-ALA Zeitkontrolle. Die Werte des endprozedualen Tonus (108,45 ± 17,80 %) und des ACh Endwertes (185,23 ± 25,32 %) liegen bei der kombinierten Applikation von 5-ALA und Bay K über denen der 5-ALA Zeitkontrolle (endprozedualer Tonus 20,24 ± 5,05 %; ACh Endwert 125,85 ± 5,35 %) und deutlich über dem Wert der maximalen ACh Reaktion (Referenz = 100%).

Im unteren Diagramm der Abb. 19 ist der Kraft-Zeit-Verlauf der Versuchsreihen 5-ALA 0,3 mM mit Bay K Applikation und die 5-ALA 0,3 mM Zeitkontrolle dargestellt. Auch hier zeigt die Versuchsreihe mit kombinierter 5-ALA und Bay K Applikation ein erhöhtes Tonusniveau im Vergleich zur 5-ALA Zeitkontrolle, welches sich bei einer Konzentration von 0,1 µM Bay K unter Beleuchtung (4.-6. Beleuchtungszyklus) ausbildet.

Ein zweiter stärkerer Anstieg im Tonus ist durch Erhöhung der Bay K Konzentration um 1 µM und Beleuchtung (7.-9. Beleuchtungszyklus) in der Versuchsreihe

mit kombinierter Applikation festzustellen. Der endprozeduale Tonus in dieser Versuchsreihe beträgt 161,84 ± 24,52 % und der ACh Endwert beträgt 180,78 ± 28,60 %.

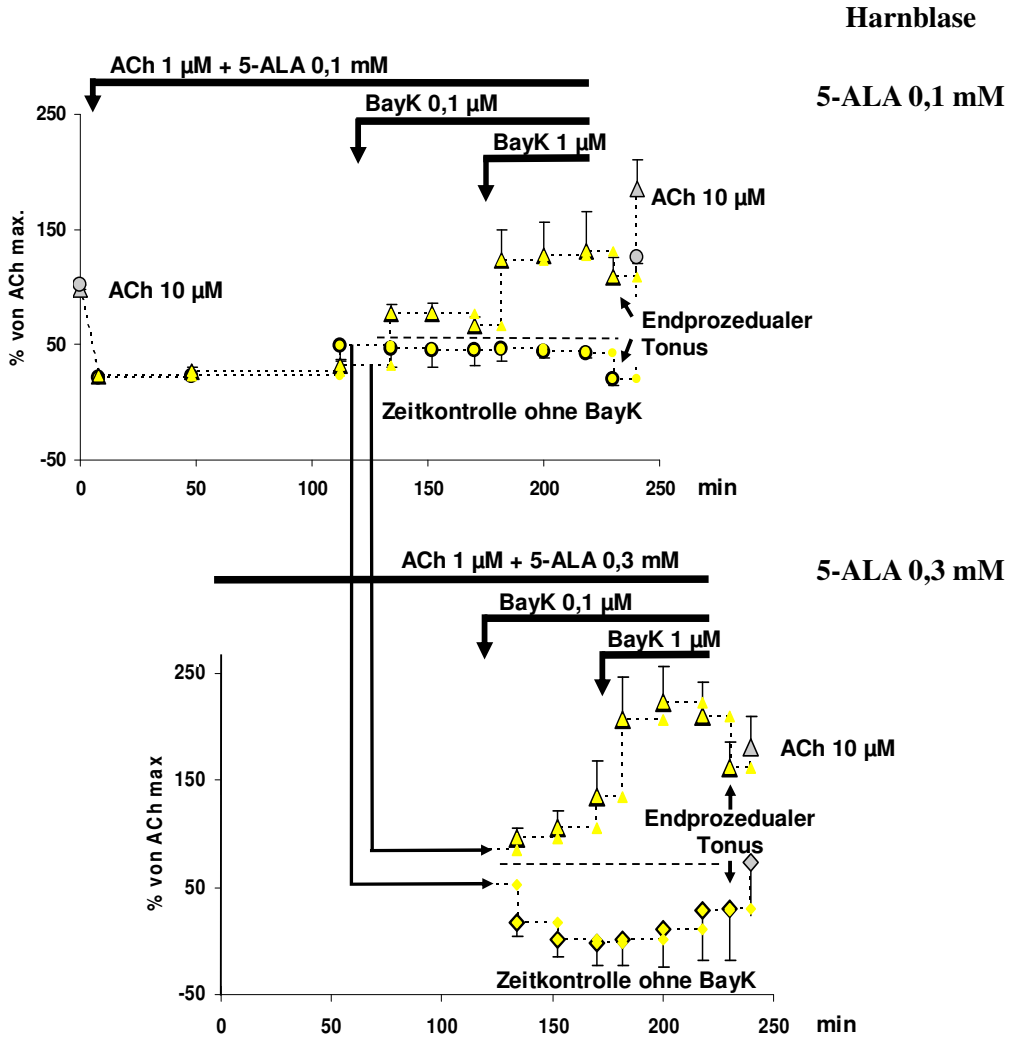


Abb. 19 Wirkung von Licht im Kraft-Zeit-Verlauf auf den glatten Muskel der mit ACh 1 µM voraktivierten Versuchsreihen der Harnblase

Dargestellt sind Mittelwerte und SEMs. Der Diagrammaufbau ist analog dem der Abb. 16, wo Versuchsreihen des Magenfundus gezeigt wurden. Der Stichprobenumfang der abgebildeten Versuchsreihen betrug jeweils n=3. *(Fortsetzung s. S. 54 unten)*

In der 5-ALA 0,3 mM Zeitkontrolle findet keine bedeutsame Beeinflussung des Tonus durch Beleuchtung statt. Der Tonus bewegt sich im Bereich zwischen -10 und 30 % von ACh max. Die große Streuungsbreite lässt keine exakteren Angaben zum Tonus der 5-ALA Zeitkontrolle zu. Bei 30,32 ± 47,80 % befindet sich der Wert des endprozedualen Tonus der Zeitkontrolle und der ACh Endwert liegt bei 74,06 ± 49,71 %.

Fortsetzung Abb. 19

Die oberen Kurven erhielten als Substanzapplikation 5-ALA und Bay K (▲= mit Bay K). Die unteren Versuchsreihen stellen 5-ALA Zeitkontrollen dar (● / ◊ = ohne Bay K). Auch bei der Harnblase weichen die ersten 3 Beleuchtungswerte der 4 Versuchreihen nicht stark voneinander ab und wurden somit im unteren Diagramm vernachlässigt.

Bei den Versuchsreihen mit der kombinierten Gabe von 5-ALA und Bay K ist eine deutliche Zunahme der Kraft infolge der Beleuchtung zu bemerken, vergleichbar mit den Befunden bei den Versuchsreihen mit der kombinierten Gabe aus 5-ALA und Bay K des Magenfundus in Abb. 16. Die Kraftzunahme ist am größten in der Versuchsreihe 5-ALA 0,3 mM und Bay K 1 µM Applikation. Bis auf den ACh Endwert der 5-ALA 0,3 mM Zeitkontrolle liegen alle ACh Endwerte über dem Wert des ACh 10 µM Ausgangsniveaus.

3.4 Zusammenfassende Tonusveränderungen unterschiedlicher glattmusklulärer Organe durch alleinige und kombinierte Wirkung von 5-ALA, (-) Bay K 8644 und Licht

Da 5-ALA sowohl bei der PDT, als auch bei der PDD an unterschiedlichen Organen eingesetzt wird (s. Abschn. 1.1.1), wurde in den folgenden Ausführungen die 5-ALA Wirkung zusammenfassend an verschiedener glatter Muskulatur betrachtet. Die getesteten glattmuskulären Organe wurden hinsichtlich ihrer Tonusveränderung durch unterschiedliche Kombinationen der lichtsensitiven Substanzen und Beleuchtung untersucht. In den Ergebnissen wurden die verschiedenen Präparatetypen zu gleichen Teilen berücksichtigt. Lediglich drei Antrum- und ein Portalvenenpräparat erfüllten die unter 2.4 beschriebenen Anforderungskriterien nicht und konnten deshalb in der Auswertung nicht mit berücksichtigt werden.
Das Auswertungsverfahren gestaltete sich komplizierter als bei einer einfachen pharmakologischen Studie. Dies ist zum einen zurückzuführen auf die unterschiedlichen Präparatetypen und zum anderen auf die Metabolisierung von 5-ALA in wirksame Metabolite. Sichtbare Veränderungen im Tonus der Präparate können demzufolge nicht nur unmittelbar nach Substanzapplikation registriert werden, sondern auch nach einer definierten Inkubationszeit von 5-ALA.
Eine Testung auf Signifikanz wurde je nach Fragestellung mit dem t-Test für verbundene oder unabhängige Stichproben durchgeführt.

3.4.1 Abgestufte motorische Antworten durch Konzentrations- und Kombinationsunterschiede im Kraft-Zeit-Verlauf

In Abb. 20 sind Kraft-Zeit-Verläufe dargestellt, die analog dem Verfahren aus 3.3.1 konzipiert wurden. Die Versuchsreihen bestanden aus glattmuskulären Präparaten des Magenfundus, des Magenantrums, der Portalvene und der Harnblase. Abgebildet sind Mittelwerte, SEMs und signifikante Unterschiede auf dem 5% (*) oder 1% Niveau (**).

Abb. 20a zeigt den Vergleich der beiden unterschiedlichen 5-ALA Zeitkontrollen (0,1 mM und 0,3 mM). Es fällt auf, dass die Kraft-Zeit-Verläufe die ersten 120 min parallel verlaufen und keine signifikanten Unterschiede bestehen. Ab der 150. min (5. Beleuchtungsphase) nimmt die Kraft in der 5-ALA 0,3 mM Zeitkontrolle signifikant bis zur 7. Beleuchtungsphase ab (-0,41 ± 11,87%). Da zu Beginn der passive Tonus als Nulllinie definiert wurde, kann ein Tonusverlust über die Zeit festgestellt werden. Der endprozeduale Tonus, definiert als Tonus nach Ausspülen der Substanzen, ist im Vergleich der beiden 5-ALA Zeitkontrollen nicht signifikant unterschiedlich (-0,41 ± 9,01% 5-ALA 0,1 mM und 7,99 ± 25,51% 5-ALA 0,3 mM). Auch die ACh Endwerte (max. Tonus nach ACh 10 µM Applikation am Versuchsende) zeigen keine signifikanten Unterschiede bei einem P = 0,064 (104,41 ± 7,82% 5-ALA 0,1 mM und 54,80 ± 21,59% 5-ALA 0,3 mM).

Die Gegenüberstellung der 5-ALA 0,1 mM Zeitkontrolle mit der Versuchsreihe 5-ALA 0,1 mM + Bay K Applikation ist in Abb. 20b zu erkennen. Es lässt sich feststellen, dass die beiden Kurven bis zur erstmaligen Bay K Applikation identisch verlaufen. Ab der 134. min steigt die Kraft in der Versuchsreihe mit Bay K unter Beleuchtung an. Signifikante Unterschiede zwischen der 4. und 6. Beleuchtungsphase bestehen allerdings nicht. Durch Erhöhung der Bay K Konzentration um 1 µM nach der 6. Beleuchtungsphase lässt sich nochmals ein Kraftanstieg in der Versuchsreihe mit Bay K Applikation erkennen. Die Unterschiede zwischen den beiden Versuchsreihen sind signifikant unterschiedlich zwischen der 7. und 9. Beleuchtungsphase. Die endprozedualen Toni weisen ebenfalls einen signifikanten Unterschied auf (-0,41 ± 9,01% ohne Bay K und 70,21 ± 21,78% mit Bay K). Für den ACh Endwert lässt sich kein signifikanter Unterschied erkennen (104,41 ± 7,82% ohne Bay K und 103,66 ± 21,74% mit Bay K).

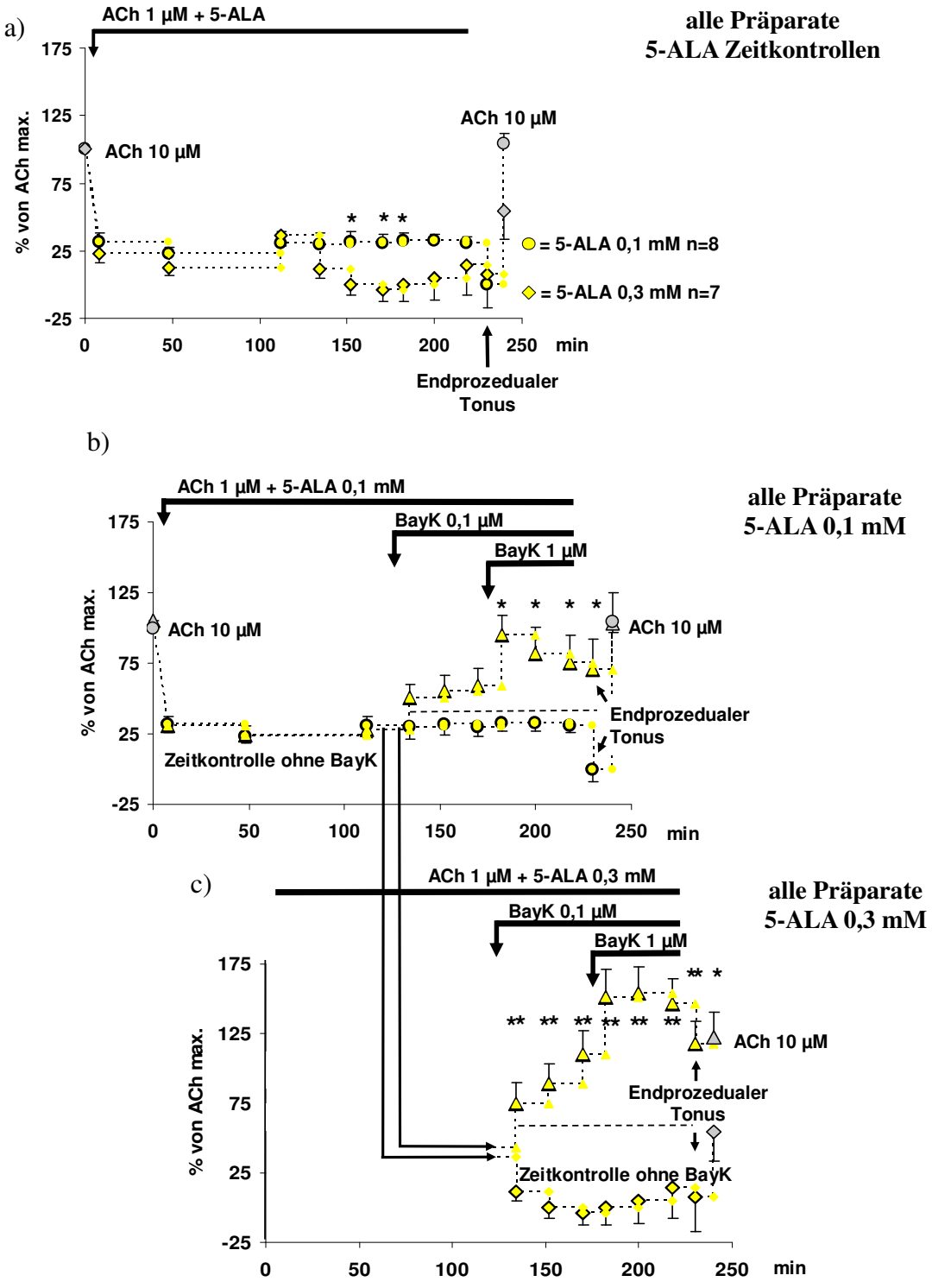


Abb. 20 Gegenüberstellung von Versuchsreihen bestehend aus glatter Muskulatur von Magenfundus, Magenantrum, Portalvene und Harnblase (Fortsetzung s. S. 58 unten)

Die 5-ALA 0,3 mM Zeitkontrolle und die Versuchsreihe mit der kombinierten Gabe aus 5-ALA 0,3 mM und Bay K sind in Abb. 20c dargestellt. Die ersten 3 Beleuchtungswerte wurden im unteren Diagramm nicht berücksichtigt, da sie nicht von denen aus Abb. 20b abweichen. Es besteht eine signifikante Unterscheidbarkeit der beiden Versuchsreihen auf dem 1% Niveau von der 4. bis zur 9. Beleuchtungsphase. Nach erstmaliger Bay K Applikation nimmt die Kraft in der Versuchsreihe mit Bay K deutlich unter der Lichtzufuhr zu. Im Anschluss an die Konzentrationserhöhung von Bay K um 1 µM übersteigt die Kraft die ACh 10 µM Referenz und demzufolge den maximalen ACh Wert. Die endprozedualen Toni (7,99 ± 25,51% ohne Bay K und 118,01 ± 15,39% mit Bay K) sind ebenfalls signifikant unterschiedlich auf dem 1% Niveau. Die ACh Endwerte (54,80 ± 21,59% ohne Bay K und 122,41 ± 18,04% mit Bay K) erfüllen die Signifikanzkriterien des 5% Niveaus.

Fortsetzung Abb. 20

Die Versuchsreihen bestanden aus 5-ALA Zeitkontrollen (0,1 mM und 0,3 mM), sowie 5-ALA (0,1 mM und 0,3 mM) in Kombination mit Bay K. Dargestellt sind Mittelwerte, SEMs und signifikante Unterschiede auf dem 5% (*) oder 1% Niveau (**).
a) Vergleich der 5-ALA Zeitkontrollen (0,1 mM und 0,3 mM)
b) Vergleich der 5-ALA 0,1 mM + Bay K Versuchsreihe (▲ n=15) mit der 5-ALA 0,1 mM Zeitkontrolle (● n=8)
c) Vergleich der 5-ALA 0,3 mM + Bay K Versuchsreihe (▲ n=11) mit der 5-ALA 0,3 mM Zeitkontrolle (◊ n=7)

3.4.2 Signifikanztestung aller Präparate hinsichtlich der Größen: Endprozedualer Tonus, Reagibilität, Kontraktilität und Bay K Effekt

Verglichen und auf Signifikanz getestet wurden folgende Versuchsreihen:

- ACh 1 µM Zeitkontrolle
- 5-ALA 0,1 mM und 0,3 mM Zeitkontrollen (ohne Bay K)
- kombinierte Applikation 5-ALA (0,1 mM und 0,3 mM) und Bay K

Eine Zusammenfassung aller Präparate ist in der Auswertung vorgenommen worden, da Ähnlichkeiten in der Reaktionsweise zu beobachten waren.

3.4.2.1 Endprozedualer Tonus

Eine Veränderung der Grundaktivität der Präparate nach Beendigung der Beleuchtungsphasen und Ausspülen der Substanzen wird durch den endprozedualen Tonus charakterisiert (s. Abschn. 3.3.1). Er zeigt an, ob sich die Präparate durch die Behandlung mit den lichtsensitiven Substanzen und der Beleuchtung in ihrer Grundaktivität verändert haben. Er kann als Indikator für intrazelluläre Veränderungsvorgänge angesehen werden, die eine Tonuserhöhung bewirken.
Signifikante Unterschiede lassen sich zwischen den Versuchsreihen aller Präparate mit und ohne Bay K Applikation feststellen, die qualitativ den Ergebnissen beim Magenfundus und bei der Harnblase entsprechen. Diese Unterschiede bestehen einerseits in einem erhöhten endprozedualen Tonus bei den Versuchsreihen mit kombinierter 5-ALA und Bay K Applikation gegenüber den 5-ALA Zeitkontrollen mit identischer alleiniger 5-ALA Applikation. Andererseits unterscheiden sich die Versuchsreihen mit Bay K signifikant von der ACh 1 µM Kontrolle durch einen erhöhten endprozedualen Tonus. Die 5-ALA Zeitkontrollen weisen keine signifikante Unterscheidbarkeit gegenüber der ACh Kontrolle auf.

3.4.2.2 Reagibilität

Zur Beschreibung der noch vorhandenen Funktionalität der Präparate am Ende des Versuchs wurde als Darstellungsform die Reagibilität auf ACh gewählt. Die Reagibilität ist charakterisiert als Differenz des ACh 10 µM Endwertes und des endprozedualen Tonus. Nachfolgend wird das Ergebnis ins Verhältnis zur ACh 10 µM Referenz vom Versuchsbeginn gesetzt. Der Wert Reagibilität repräsentiert demzufolge die maximale Tonuszunahme der Muskelstreifen durch ACh 10 µM Applikation. Abb. 21 zeigt Mittelwerte, SEMs und auf dem 5% (*) oder 1% Niveau (**) signifikante Unterschiede der Reagibilität der Versuchsreihen aller Präparate sowie vergleichend die Ergebnisse der Reagibilität von Magenfundus- und Harnblasenversuchsreihen. Die Magenfundus- und Harnblasenversuchsreihen sind in den Versuchsreihen aller Präparate mit inbegriffen.

Durch kombinierte Applikation von 5-ALA und Bay K nimmt die Reagibilität ab. Diese Abnahme fällt umso größer aus, je höher die 5-ALA Konzentration in der Kombination ist. Auch bei alleiniger Applikation von 5-ALA ist eine Abnahme der Reagibilität gegenüber der ACh Kontrolle zu erkennen, die ebenfalls umso größer ausfällt, je höher die 5-ALA Konzentration ist. Außerdem ist festzustellen, dass die Versuchsreihen mit der Kombination 5-ALA und Bay K gegenüber den Versuchsreihen mit alleiniger 5-ALA Applikation in identischer Konzentration eine niedrigere Reagibilität aufweisen.

Zu bemerken ist, dass obwohl eine Diversität der Präparatetypen gegeben ist, gemeinsame Effekte festzustellen sind. Unterschiede bestehen lediglich in der Quantität der einzelnen Reagibilitätswerte beim Vergleich der Versuchsreihen aller Präparate mit denen von Magenfundus und Harnblase. Die Versuchsreihen des Magenfundus mit der kombinierten Gabe von 5-ALA und Bay K zeigen eine große Abnahme der Reagibilitätswerte, wohingegen bei der Harnblase nur kleine Veränderungen wahrnehmbar sind.

Die Reagibilität einiger Präparate wurde ein zweites Mal getestet nach einer 24 stündigen Organbadzeit, die sich an das 240 min dauernde Versuchsprogramm anschloss. Während dieser 24 Stunden wurden die Präparate weiterhin begast und

konstant auf 37 °C erwärmt. Bis auf die Präparate der ACh Kontrollreihe reagierte keines der Präparate mehr adäquat auf eine ACh Applikation.

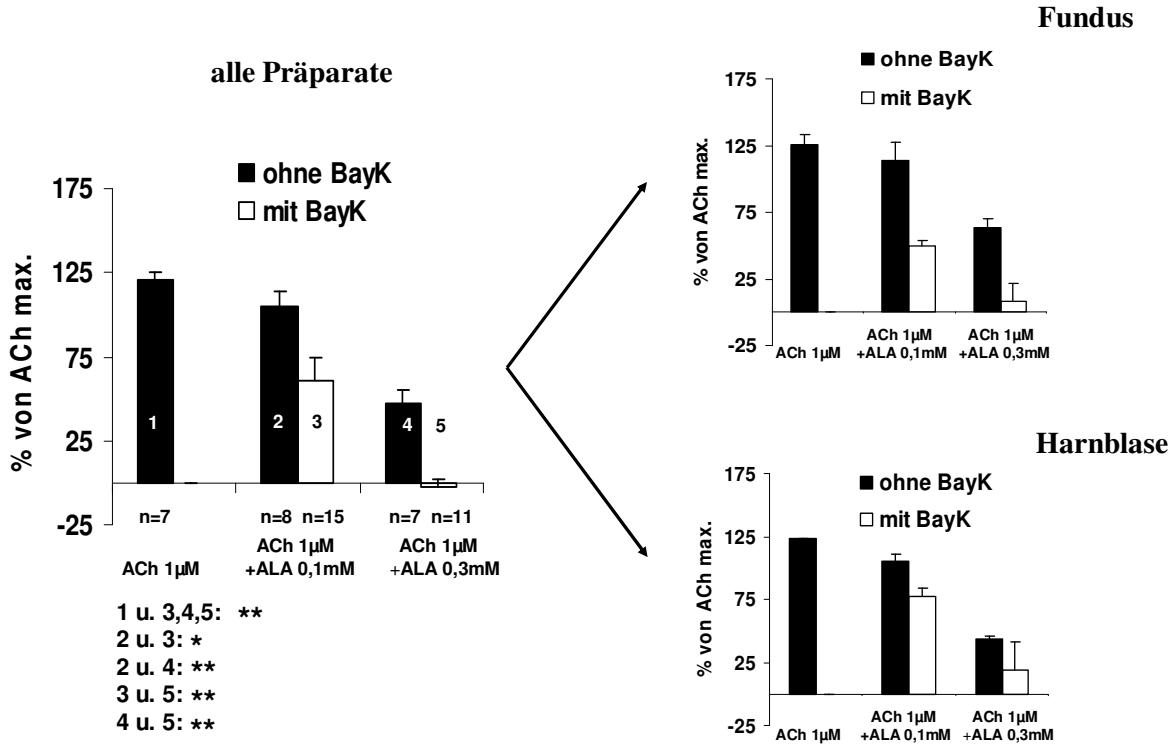


Abb. 21 Reagibilität aller Präparate und vergleichend dargestellt die Reagibilität von Magenfundus und Harnblase

Bei den Versuchsreihen aller Präparate handelt es sich um Muskelstreifen von Magenfundus, Magenantrum, Portalvene und Harnblase. Ein Auszug der Werte für Magenfundus und Harnblase, jede Versuchsreihe mit einem n=3, sind in der Abbildung rechts dargestellt. Abgebildet sind Mittelwerte, SEMs und auf dem 5% (*) oder 1% Niveau (**) signifikante Unterschiede. Die Zahlen am linken Bildrand der Abbildung aller Präparate repräsentieren die Signifikanztestungen zwischen unterschiedlichen Versuchsreihen.

Auffällig ist die starke Abnahme der Reagibilität bei den Versuchsreihen mit der kombinierten Gabe von 5-ALA und Bay K am Magenfundus.

3.4.2.3 Kontraktilität

Die Größe Kontraktilität beschreibt die Tonusveränderung durch Applikation von ACh 10 µM am Versuchsende, analog dem ACh Endwert. Von diesem Wert wurde die passive Vordehnung, die am Versuchbeginn gemessen wurde, subtrahiert und das Ergebnis in Bezug zur ACh 10 µM Referenz gesetzt. Die Kontraktilität definiert folglich den maximal erzielten Tonus nach ACh Applikation am Versuchsende.

In Abb. 22 fällt auf, dass in den Versuchsreihen aller Präparate sich von der ACh 1 µM Kontrolle nur die 5-ALA 0,3 mM Zeitkontrolle signifikant unterscheidet (109,11 ± 7,19% ACh Kontrolle und 54,80 ± 21,59% 5-ALA 0,3 mM Zeitkontrolle). Ein weiterer signifikanter Unterschied in den Versuchsreihen aller Präparate besteht zwischen 5-ALA 0,3 mM ohne und mit Bay K. Die Versuchsreihe ohne Bay K erreicht deutlich niedrigere Kontraktilitätswerte im Vergleich zur Versuchsreihe mit Bay K Applikation. Des Weiteren ist zu erkennen, dass in den Versuchsreihen ohne Bay K die Kontraktilität umso niedriger ist, je höher die 5-ALA Konzentration war.

Betrachtet man die Werte der Kontraktilität des Magenfundus und der Harnblase, welche in den Kontraktilitätswerten aller Präparate mit eingeschlossen sind, so fällt auf, dass ähnliche Effekte im Vergleich mit den Versuchsreihen aller Präparate auftreten. Trotz der funktionell verschiedenartigen Muskelpräparate sind qualitative Gemeinsamkeiten in der Reaktionsweise auf die 5-ALA, Bay K und Licht Applikation zu erfassen. Die Harnblase erreicht im Vergleich zu den Versuchsreihen aller Präparate und zu den Magenfundusversuchsreihen die höchsten Kontraktilitätswerte in der Kombination 5-ALA und Bay K.

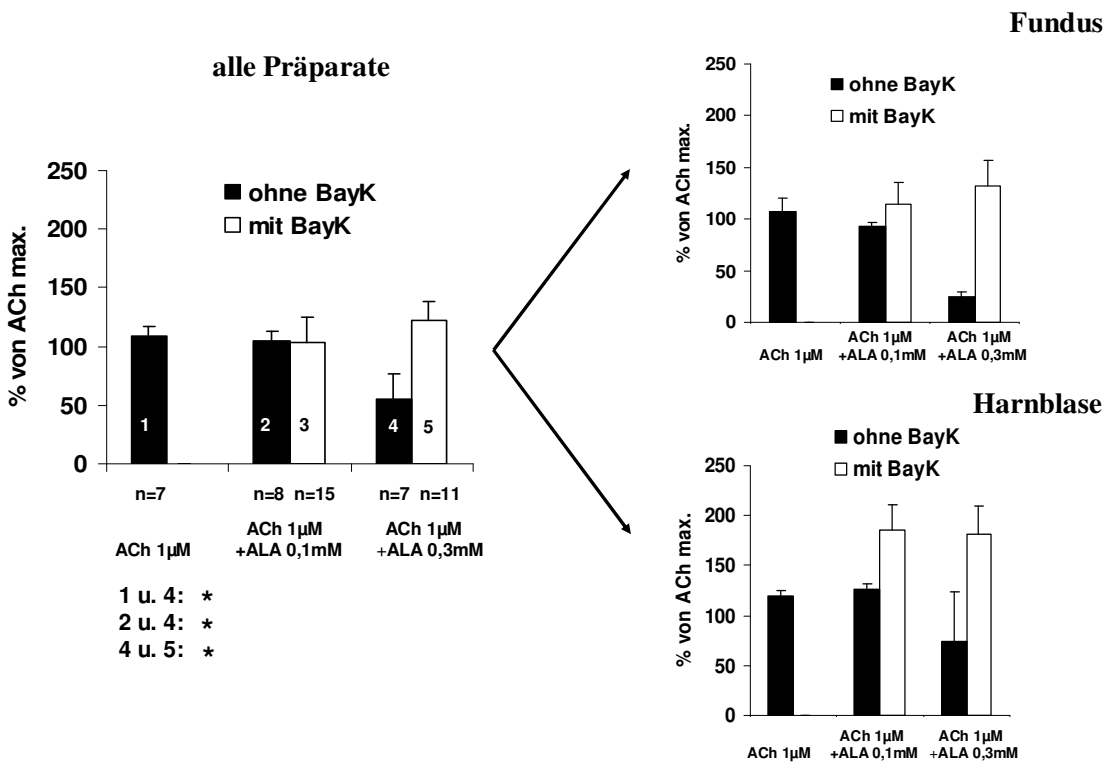


Abb. 22 Kontraktilität aller Präparate und vergleichend dargestellt die Kontraktilität von Magenfundus und Harnblase

Die Versuchsreihen aller Präparate beinhalteten Muskelstreifen des Magenfundus, des Magenantrums, der Portalvene und der Harnblase. In der Abbildung rechts sind Auszüge des Magenfundus und der Harnblase gesondert hervorgehoben mit jeweils einem n=3. Zu sehen sind Mittelwerte, SEMs und auf dem 5% (*) oder 1% Niveau (**) signifikante Unterschiede. Die Zahlen am linken Bildrand der Abbildung aller Präparate repräsentieren die Signifikanztestungen zwischen unterschiedlichen Versuchsreihen. Die höchsten Kontraktilitätswerte sind bei den Versuchsreihen der Harnblase mit der Kombination aus 5-ALA und Bay K zu finden.

3.4.2.4 Bay K Effekt

Um die Auswirkungen unterschiedlicher Bay K Konzentrationen in der Kombination mit 5-ALA auf den Tonus der Versuchsreihen aller Präparate bestimmen zu können, wurden Mittelwertbildung der 3 Beleuchtungszyklenwerte einer Bay K Konzentrationsstufe ermittelt (s. Abschn. 2.2.3). Die Ergebnisse sind in % von ACh max. angegeben.

Es war festzustellen, dass eine höhere Bay K Konzentration innerhalb einer Versuchsreihe mit festgelegter 5-ALA Konzentration zu einer erhöhten Kontraktilität führt. Signifikante Unterschiede im t-Test für verbundene Stichproben auf dem 1% Niveau bestehen sowohl bei der Versuchsreihe mit 5-ALA 0,1 mM (54,69 ± 10,90% Bay K 0,1 µM und 83,54 ± 17,70% Bay K 1 µM), wie auch bei der Versuchsreihe mit 5-ALA 0,3 mM (91,33 ± 15,00% Bay K 0,1 µM und 150,50 ± 18,54% Bay K 1 µM). Darüber hinaus fiel auf, dass im Vergleich der Versuchsreihen 5-ALA 0,1 mM und 5-ALA 0,3 mM signifikante Unterschiede auf dem 5% Niveau im t-Test für unabhängige Stichproben bei identischen Bay K Konzentrationen zu sehen waren (s. Abb. 26).

Es lässt sich ableiten, dass je höher die 5-ALA und Bay K Konzentration in der Kombination in einer Versuchsreihe ist, desto größer wird der erzielte Tonus in % von ACh max., ausgelöst durch die Beleuchtung mit 8 klx.

3.5 Einfluss von 5-ALA und (-) Bay K 8644 auf die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration und den Tonus

Um der Arbeitshypothese nachzugehen, ob die abgestuften motorischen Antworten im Organbad Ausdruck der intrazellulären Ca^{2+} Homöostase sind, wurden Ca^{2+} Fluoreszenzmessungen mit Fura-2 durchgeführt. Die Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration und die gleichzeitige Registrierung des Muskeltonus erwiesen sich als eine sehr aufwendige Datenerhebung. Wie schon unter 2.3 erläutert wurde, stellte die Beleuchtung der Präparate auf der einen Seite und die Registrierung der einzelnen Photonen im Photomultiplier auf der anderen Seite die größte Herausforderung dar. Durch die Entwicklung der automatisch

geschalteten Shutteranlage konnten beide Anforderungen erfüllt werden. Zudem wurden die Versuche im abgedunkelten Labor durchgeführt und der gesamte Mikroskopkomplex in einen optisch dichten Käfig eingebettet. Dieser Käfig bestand aus einem Drahtgeflecht mit schwarzer, strahlenabsorbierender Folie. Durch die abgedunkelte Messkammer konnte eine Verfälschung der Photonenmessung durch Hintergrundrauschen minimal gehalten werden. Zur Beleuchtung der Präparate wurde die Glasfaser von extern durch den optischen Käfig eingeführt und die Eintrittsstelle versiegelt.
Eine weitere Erschwernis stellte das Auffinden der optimalen Versuchsbedingungen dar. Zu diesen zählten:

- Fura-2-AM Konzentration und Inkubationszeit
- Beleuchtungszyklendauer und – anzahl
- Beleuchtungsabstand zum Präparat
- Präzises und scharfes Einstellen der Präparate mit dem Mikroskop
- Begasungsstärke (Blasenbildung)
- optimales Einspannen der Präparate im Myographen, um Reibungswerte so gering wie möglich zu halten
- sorgsame Substanzapplikation bei der das exakt justierte Präparat nicht berührt werden durfte

Die ermittelten Ca^{2+} Werte repräsentieren Relativwerte. Die zugehörige Messgröße heißt Ratio. Wie schon unter 2.3.1 beschrieben, wurde die Ratio gewählt, da Relativwerte eine bessere Vergleichbarkeit der Präparate zulassen und Absolutwerte anfälliger gegenüber Störfaktoren sind.
Die Messungen wurden an Präparaten des Magenfundus und der Harnblase durchgeführt, den 2 charakteristischen Präparaten für unterschiedliche Ca^{2+} Aktivierungsprozesse (Golenhofen 1976).

3.5.1 Ergebnisse einzelner Fluoreszenzmessungen am Magenfundus und an der Harnblase

Das Fluoreszenzsignal wurde alle 20 sec über einen Zeitraum von 2 sec gemessen (s. Abschn. 2.3.3). Während der Messzeit wurde die Lichtquelle automatisch abgeblendet und die Messkammer auf diesem Wege dunkel gehalten. Die Messrate betrug 100 Punkte/sec Demzufolge repräsentieren die Mittelwerte im Diagramm jeweils einer Mittelung aus 200 Datenpunkten. Ein Beleuchtungszyklus dauerte ca. 7,3 Minuten und beinhaltete 20 Messintervalle. Ein Messintervall setzte sich zusammen aus 20 sec Beleuchtung mit 8 klx. Leuchtstärke und 2 sec Messphase. Begonnen wurde bei jedem Beleuchtungszyklus mit der Fluoreszenzregistrierung. Insgesamt durchlief jedes Präparate 3 Beleuchtungszyklen. Zwischen den einzelnen Zyklen herrschten Dunkelphasen mit identischer Zeitdauer zu den Beleuchtungszyklen.

Die simultane Messung des Ca^{2+} Signals und des Muskeltonus während des 1. Beleuchtungszyklus an einem einzelnen Magenfunduspräparat ist in Abb. 23 zu sehen. Die Messung eines Harnblasenpräparates ist in Abb. 24 portraitiert. Bei dem mit 5-ALA 0,1 mM und Fura-2-AM vorinkubierten Präparat des Magenfundus (s. Abschn. 2.3.2) wurde zunächst die Reaktion auf ACh getestet, um die Vitalität des glatten Muskels zu überprüfen und das Präparat vorzuaktivieren. Anschließend wurde Bay K 1µM appliziert und das Beleuchtungsprogramm gestartet. Im Unterschied zum Magenfundus wurden die Harnblasenpräparate mit 5-ALA 0,3 mM vorinkubiert. Die Vorinkubation mit Fura-2-AM und die Applikation von Bay K erfolgten in dergleichen Weise und Konzentration wie beim Magenfundus.

Die Tonus- und Ratioveränderungen zu unterschiedlichen Messintervallen sind durch manuell eingeführte Trendlinien A und B charakterisiert.

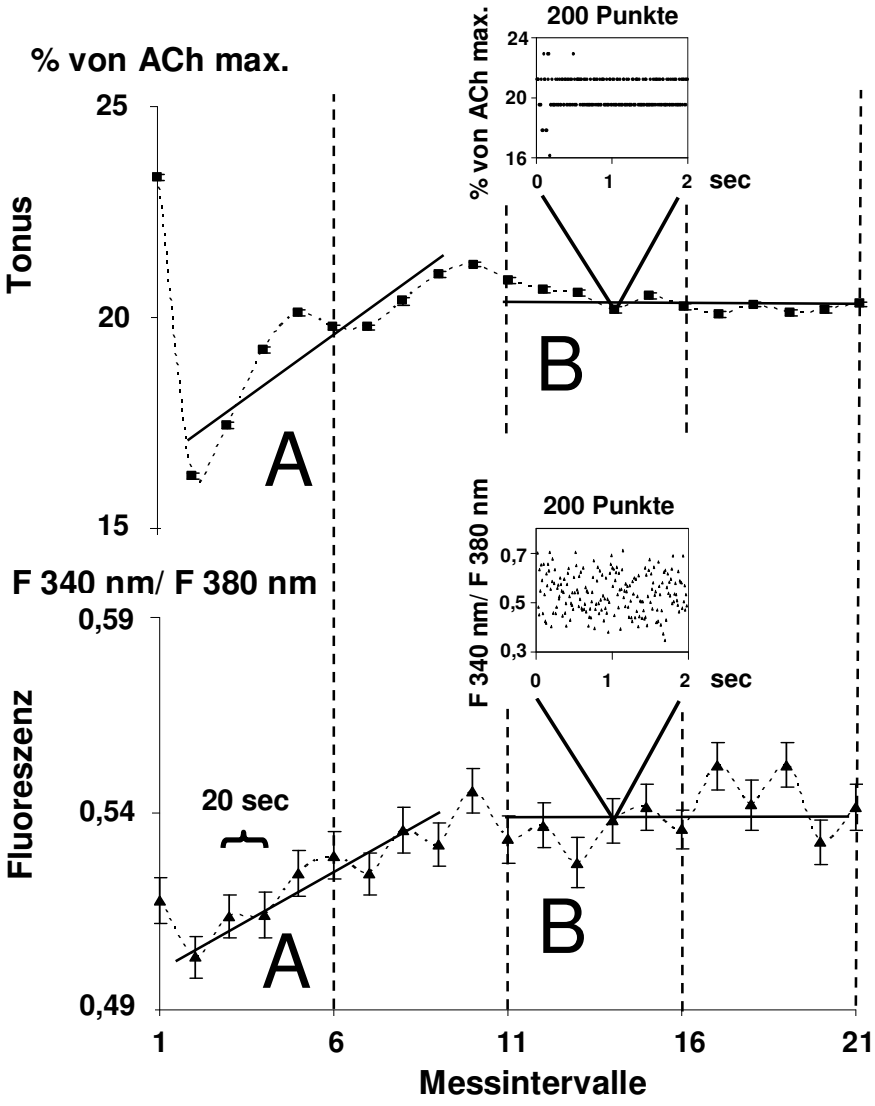


Abb. 23 Simultane Registrierung von Tonus (% von ACh max.) und Fluoreszenzemission (Ratio) an einem Magenfundspräparat während des 1. Beleuchtungszyklus *Das Präparat wurde mit 5-ALA 0,1 mM vorinkubiert und mit ACh 1 µM aktiviert. Vor Beleuchtungsbeginn wurde Bay K 1 µM appliziert. Dargestellt sind Mittelwerte und SEMs der einzelnen Messintervalle. Ein Messintervall setzt sich zusammen aus 2 sec Registrierungsphase in Dunkelheit mit 100 Messpunkten pro sec und 20 sec Beleuchtungsphase mit 8 klx. Die manuell eingezeichneten Geraden A und B stellen Trendlinien dar. Trendlinie A charakterisiert eine Anstiegsphase, Trendlinie B eine Plateauphase. Anstiegssteilheit und A-B Übergang sind im Vergleich der Tonus- und Ratiokurve des Magenfundus annähernd identisch.*

Am Magenfundus (s. Abb. 23) nimmt der Tonus nach initialem Abfall im 1. Messintervall zu (Anstiegsphase A) und erreicht ab dem 11. Beleuchtungsintervall ein Plateau (Plateauphase B). Das Niveau des Tonusplateaus liegt unterhalb des Ausgangstonus, welcher vor der 1. Beleuchtung herrschte. Die Kurve des Ca^{2+} Signals zeigt eine wechselnde Eigenrhythmizität mit Periodenzeiten zwischen 2 und 4 Messintervallen (44 sec bis 88 sec). Des Weiteren ist eine Anstiegsphase A und eine Plateauphase B der Ratio zu erkennen, die ebenfalls manuell eingezeichnet wurden und sich zeitlich parallel zu den Trendlinien des Tonus verhalten. Zugleich ist die Anstiegsphase A der Ratio annähernd gleichstark ansteigend wie die der Tonuskurve. Die Ratio steigt von 0,52 ± 0,0056 auf 0,54 ± 0,0056 über die Zeitdauer des Beleuchtungszyklus an.

Bei Betrachtung der Tonuskurve der Harnblase (s. Abb. 24) ist ebenfalls eine Anstiegsphase A bis zum 11. Messintervall zu vermerken mit darauf folgendem Tonusplateau B. Die Tonuskurve der Harnblase zeigt darüber hinaus eine Eigenrhythmizität mit Periodendauern zwischen 2 und 3 Messintervallen (44 sec bis 66 sec). Eine Eigenrhythmizität lässt sich auch bei der Ratiokurve der Harnblase erkennen. Diese zeigt bis zum 7. Messintervall eine Periodendauer von 2 Messintervallen (44 sec). Nachfolgend nimmt die Periodendauer zu und weist Zeiten zwischen 3 und 6 Messintervallen auf (66 sec bis 132 sec). Die Anstiegsphase A zeigt einen Ratioanstieg bis zum 7. Messintervall, an dem sich ein Plateau B anknüpft. Anstiegs- und Plateauphase von Tonus und Ratio treten zeitlich nicht simultan auf. Die Ratiokurve erreicht das Plateau zeitlich vorausgehend. Demgegenüber weisen die Anstiegsphasen A von Tonus- und Ratiokurve nahezu identische Anstiegssteilheiten auf. Insgesamt nimmt die Ratio über die 21 Messintervalle der Harnblase von 0,57 ± 0,005 auf 0,59 ± 0,006 zu.

Beim Vergleich der Diagramme von Magenfundus und Harnblase lassen sich Gemeinsamkeiten feststellen. Beide Präparate weisen Anstiegs- und Plateauphasen während des Beleuchtungszyklus sowohl in der Tonus-, wie auch in der Ratiokurve auf. Variabilitäten bestehen zwischen Magenfundus und Harnblase hinsichtlich

der quantitativen Ausprägung der Anstiegssteilheit und der Plateauphase.

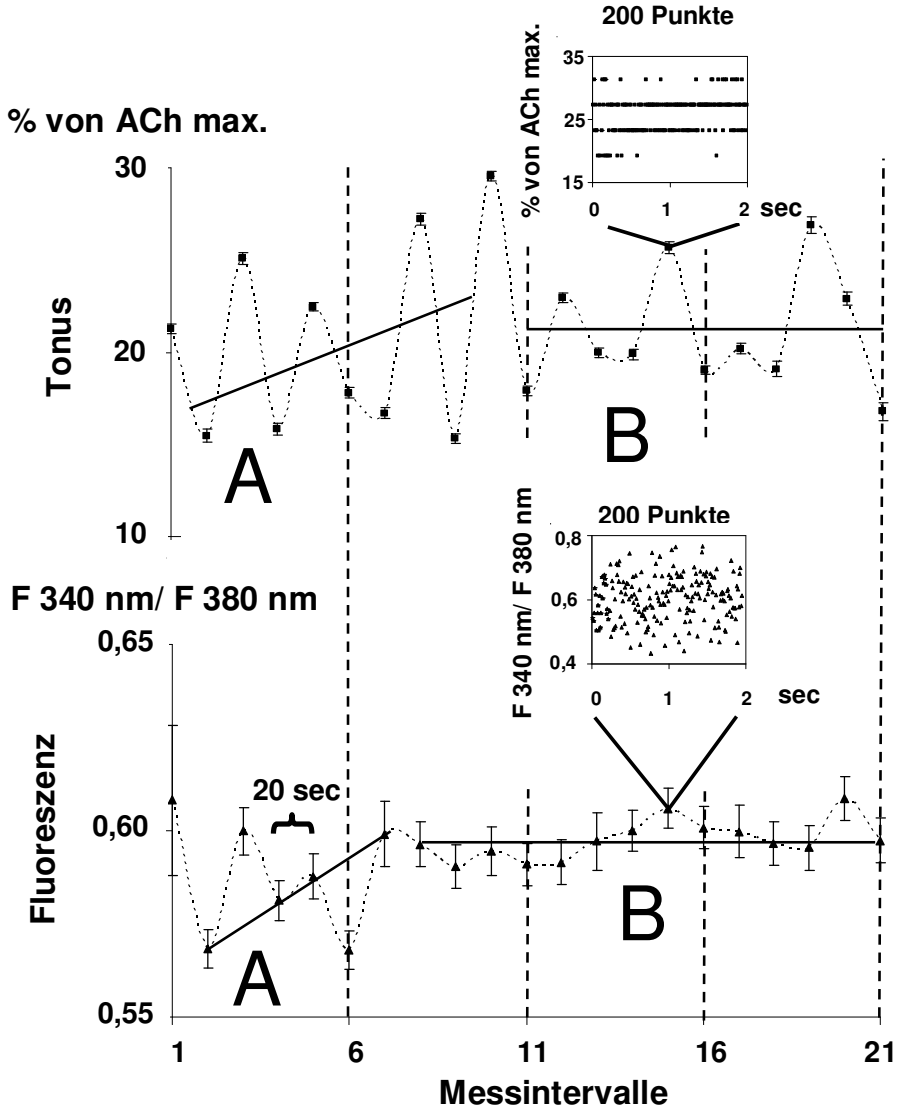


Abb. 24 Simultane Registrierung von Tonus (% von ACh max.) und Fluoreszenzemission (Ratio) während des 1. Beleuchtungszyklus an einem Präparat der Harnblase *Mit 5-ALA 0,3 mM wurde das Präparat vorinkubiert und Bay K 1 µM vor Beleuchtungsbeginn appliziert. Illustriert sind Mittelwerte und SEMs der einzelnen Messintervalle, analog der Abb. 23. Bei der Betrachtung der manuell eingezeichneten Trendlinien A und B ist zu erkennen, dass Tonus und Fluoreszenzemission je eine Anstiegs- und eine Plateauphase besitzen. Die Fluoreszenzemission erreicht das Plateau zeitlich früher, als der Tonus. Die Anstiegsteilheiten von Tonus- und Ratiokurve sind nahezu übereinstimmend.*

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den Tonus- und intrazellulären Ca^{2+} Veränderungen beim Magenfundus und bei der Harnblase herauszuarbeiten, wurden Kreuzkorrelationen zwischen den Tonus- und Ratiowerten der jeweiligen Messintervalle eines Beleuchtungszyklus gerechnet. Kreuzkorrelationen beschreiben die Korrelation zweier Signale bei unterschiedlichen Zeitverschiebungen (lags). Gerechnet wurde mit einem lag von 7, welches 7 Zeitverschiebungen à 22 sec beschreibt. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Korrelationsmaxima des Kraft- und Ca^{2+} Signals beim Magenfundus und bei der Harnblase Werte zwischen -0,5 und 0,5 einnehmen. Folglich ist weder eine gleich- noch eine gegensinnige Wechselbeziehung zwischen dem Kraft- und Ca^{2+} Signal zu vermuten. Ursächlich für die vorhandenen Oszillationen des Ca^{2+}- und Kraftsignals mit Periodizitätszeiten im Bereich von 22-154 sec könnten Cajal-Zellen sein, die durch die Applikation von 5-ALA und Bay K mit anschließender Beleuchtung aktiviert wurden. Eine Interferenz bzw. Störung der endogenen Organrhythmizität des Magenfundus und der Harnblase wäre demnach vorstellbar.

3.5.2 Veränderung des intrazellulären Ca^{2+} und der Kraft über 3 Beleuchtungszyklen an Präparaten des Magenfundus und der Harnblase

Mit dem Ziel einen möglichen Effekt der Mehrfachbeleuchtung herauszuarbeiten, wurden Analysen der Plateauphasen B der Tonus- und Ratiokurve über die Dauer der 3 Beleuchtungszyklen (B_{1-3}) am Magenfundus und an der Harnblase durchgeführt. Die Plateauphase ist von Bedeutung, da sich hier ein Steady State der Tonus- und Ca^{2+} Werte eingestellt hat und dieser sich präzise vergleichen lässt. Die Muskelstreifen wurden mit 5-ALA (0,1 mM am Magenfundus und 0,3 mM an der Harnblase) und Fura-2-AM vorinkubiert und mit Bay K 1 µM nach ACh 1 µM Aktivierung kombiniert (s. Abschn. 3.5.1).

Da das Messverfahren sehr aufwendig und störanfällig war, konnten von den insgesamt 8 getesteten Präparaten der Versuchsreihe des Magenfundus nur 5 in die erste, 4 in die zweite und 3 in die dritte Beleuchtungszyklusgruppe mit einfließen. Bei der Harnblase wurden 8 Muskelstreifen getestet, von denen im 1. Beleuchtungszyklus 6, im 2. Zyklus 4 und im 3. Zyklus 3 die unter 2.4 beschriebenen Einschlusskriterien erfüllten.

Alle Präparate wiesen eine Anstiegsphase A und eine Plateauphase B unter den 3 Beleuchtungszyklen auf. Der Beginn der Plateauphase setzte sowohl bei der Tonus- wie auch bei der Ratiokurve beim Magenfundus und bei der Harnblase zu unterschiedlichen Messintervallzeitpunkten im Verlauf der Beleuchtungszyklen 1-3 ein. Diese Gegebenheit wurde in der Auswertung berücksichtigt. Die Veränderung der Ratiowerte wurde in % der Ratioreferenz beschrieben. Dabei ist die Ratioreferenz der gemessene Ratiowert bei Voraktivierung der Präparate mit ACh 1 µM am Versuchsbeginn.

In Abb. 25 ist die Entwicklung der Plateauphasen B_{1-3} der Tonus- und Ratiokurve zu sehen. Nicht signifikante Änderungen des Tonus, Ab- und Zunahmen, lassen sich beim Magenfundus über die 3 Beleuchtungszyklen erkennen, bei lediglich marginaler Ca^{2+} Zunahme. Im Unterschied dazu lässt sich bei der Harnblase eine Zunahme des Tonus der Plateauphasen B_{1-3} erkennen, die zwischen dem 1. und 2. Beleuchtungszyklus auf dem 5 % Niveau signifikant unterschiedlich ist. Die Plateauphasen der Ratiokurven der Harnblase zeigen analog den Ergebnissen beim Magenfundus keine, bzw. kaum merkliche Zunahmen über die Dauer der 3 Beleuchtungszyklen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Mehrfachbeleuchtungen in erster Linie einen Einfluss auf den Muskeltonus von Magenfundus- und Harnblasenpräparaten ausüben. Ausgelöst durch die Beleuchtung steigt das intrazelluläre Ca^{2+}, als Signalstoff der Kontraktion, in den Muskelzellen der 5-ALA und Bay K behandelten Magenfundus- und Harnblasenpräparate im Vergleich der Plateauphasen B_{1-3} lediglich marginal an. Beim Magenfundus und bei der Harnblase liegen die Plateauwerte der Ratio bereits ab dem 1. Beleuchtungszyklus oberhalb der

Ratioreferenz von 100%. Dies könnte auf einen durch die Bay K Applikation hervorgerufenen Ca^{2+} Anstieg zurück zu führen sein.

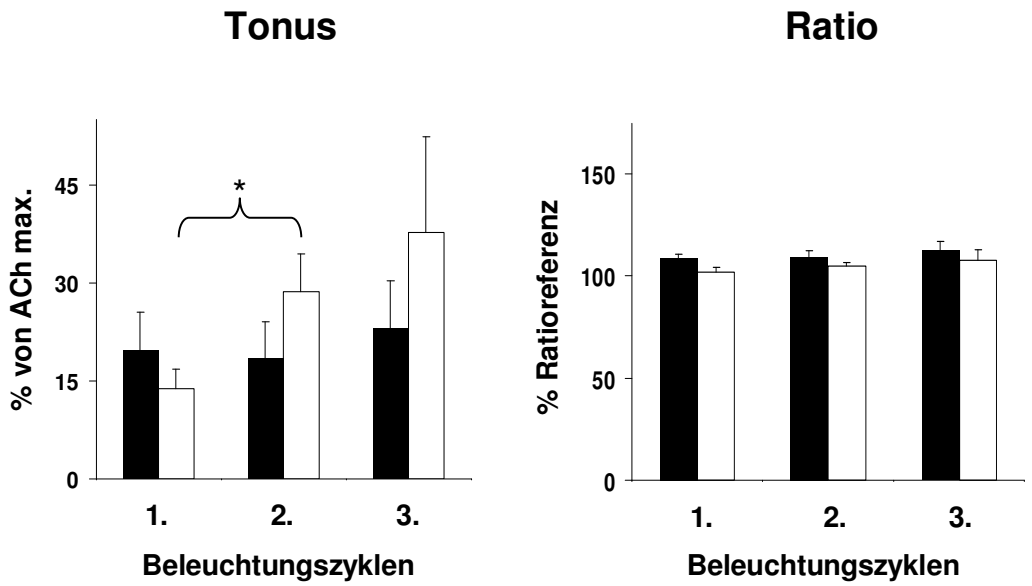


Abb. 25 Entwicklung der Plateauphasen B der Tonus- und Ratiokurven während der 3 Beleuchtungszyklen an Präparaten des Magenfundus und der Harnblase

Alle Präparate wurden mit 5-ALA (0,1 mM beim Magenfundus und 0,3 mM bei der Harnblase) vorinkubiert, mit ACh 1 µM aktiviert und erhielten vor Beleuchtungsbeginn Bay K 1 µM. Die Ratioreferenz ist der gemessene Ratiowert bei Voraktivierung der Präparate mit ACh 1 µM. Dargestellt sind Mittelwerte, SEMs und signifikante Unterschiede auf dem 5% Niveau (*).

■ = Magenfundus, n = 5 (1. Zyklus), 4 (2. Zyklus) und 3 (3. Zyklus)

▒ = Harnblase, n = 6 (1. Zyklus), 4 (2. Zyklus) und 3 (3. Zyklus)

Am Magenfundus lassen sich nicht signifikante Tonusabnahmen und –zunahmen über die 3 Beleuchtungszyklen ausmachen, bei keinem bzw. lediglich marginalem Anstieg des Ca^{2+} Plateauwertes. Im Gegensatz zum Magenfundus ist bei der Harnblase eine Tonuszunahme über die 3 Beleuchtungszyklen zu erkennen. Die Plateauphasen der Ratiokurve weisen hingegen bei der Harnblase ebenfalls keine, bzw. geringfügige nicht signifikante Anstiege über die Dauer der 3 Beleuchtungszyklen auf.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die kombinierte Wirkung von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), ein in der photodynamischen Therapie und Diagnostik (PDT / PDD) eingesetzter Photosensitiser, und Bay K 8644, ein L-Typ Ca^{2+} Kanalöffner an glattmuskulären Organen untersucht. Der Fokus der Untersuchungen lag auf der Lichtabhängigkeit der Reaktionen. Die Versuche wurden daher mit und ohne Beleuchtung (8 klx.) durchgeführt. Es wurde den Fragen nachgegangen, welche motorischen Effekte sich durch eine systematische Kombination dieser lichtsensitiven Substanzen erzielen lassen und ob durch das Applikations-Beleuchtungs-Schema der Ca^{2+} Haushalt der glatten Muskulatur beeinflusst wird. Dazu wurden Kraftmessungen im konventionellen Organbad sowie mikroskopische Fluoreszenzmessungen durchgeführt.

Die Lichtapplikation erfolgte in repetitiven Beleuchtungen. Dieses geschah zum einen um die Lichtreaktionen genauer charakterisieren zu können und zum anderen um den Effekt der Wirkungssteigerung der PDT durch fraktionierte Beleuchtung auszunutzen (van der Veen et al., 1994; Messmann et al., 1995). Die fraktionierte Beleuchtung führt zu einer Reoxygenierung der behandelten Areale in den Dunkelphasen (Curnow et al., 2000). In der darauf folgenden Beleuchtungsphase steht demzufolge mehr O_2 für die Bildung zytotoxischer O_2 Metabolite zur Verfügung (Gomer und Razum, 1984).

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Organbadversuche

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. Vor jeder Versuchsdurchführung wurde eine Eichung der Beleuchtungsanlage mittels eines Photometers (Werkstätten Uni Marburg) direkt im Organbad durchgeführt. Ferner wurden vor

jedem Versuch die zur Kraftmessung genutzten mechanischen Transducer mit einem Messinggewicht geeicht.

4.1.2 Messungen mit dem Fluoreszenzmikroskop

Die Versuche mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden in einem abgedunkelten Labor durchgeführt. Zusätzlich befand sich der gesamte Mikroskopkomplex in einem optisch dichten Käfig, bestehend aus einem Drahtgeflecht mit schwarzer, strahlenabsorbierender Folie. Diese Vorkehrungen waren erforderlich, um den Effekt des Photobleachings so gering wie möglich zu halten. Als Photobleaching wird die Abnahme der Porphyrinfluoreszenz von Geweben durch Lichteinstrahlung bezeichnet (Moan, 1986; Bezdetnaya et al., 1996). Durch das Photobleaching entstehen phototoxisch wirkende Photoprodukte (König et al., 1993).
Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Versuchsdurchführung war die Konstanthaltung der Temperatur auf 37°C, da die Aufnahme von 5-ALA in die Zelle temperaturabhängig ist (Fuchs et al., 1994). Folglich wurde eine Temperaturüberwachung der zur 5-ALA und Fura-2 Beladung benutzten Reagenzgefäße sowie der Messzelle im Fluoreszenzmikroskop durchgeführt.

4.2 Diskussion der Messergebnisse

4.2.1 Motorische Effekte durch Licht an mit 5-ALA und Bay K behandelter überwiegend tonisch aktivierter Muskulatur am Beispiel des Magenfundus

Unter Beleuchtung der alleinig mit 5-ALA inkubierten Muskelstreifen des Magenfundus zeigten sich vielfältig ausgeprägte motorische Antworten. Hemmungen und Aktivierungen des Tonus konnten zu unterschiedlichen Beleuchtungszeitpunkten wahrgenommen werden. Der endprozeduale Tonus am Versuchsende wies sowohl in der Zeitkontrolle 5-ALA 0,1 mM (ohne Bay K) wie auch in der Zeitkontrolle 5-ALA 0,3 mM (ohne Bay K) negative Werte auf. Demzufolge kann von einem Elastizitätsverlust der Muskelstreifen ausgegangen werden. Ursächlich

für diesen Elastizitätsverlust können Schäden an biologischen Membranen und am Zytoskelett sein. Hervorgerufen sind diese Veränderungen durch reaktiven Singulett-Sauerstoff ($^1O_2$) und weitere reaktive Sauerstoffspezies, welche während der PDT entstehen (Moan und Berg, 1992).

Cutler et al. konnten 1990 an Muskelstreifen des Magenfundus vom Kaninchen zeigen, dass 5-ALA Applikation in Konzentrationen von 0,1 mM bis 0,3 mM zu einer dosisabhängigen Kontraktionszunahme innerhalb von Minuten führt. Eine Beleuchtung der Präparate fand nicht statt. Die Effekte wurden durch Vorbehandlung der Muskelstreifen mit Prazosin, einem α-Adrenozeptorantagonist, abgeschwächt. Unsere Versuche konnten keine unmittelbare Kontraktionszunahme der Magenfunduspräparate auf 5-ALA Applikation zeigen. Lediglich unter Beleuchtung war eine Zu- oder Abnahme des Tonus zu beobachten.

Durch Kombination von 5-ALA mit (-) Bay K 8644 konnte in unseren Experimenten sowohl in der Versuchsreihe 5-ALA 0,1 mM wie auch in der Versuchsreihe 5-ALA 0,3 mM eine stetige Tonuszunahme im Anschluss an die Bay K Applikation festgestellt werden. Bereits ab der 1. Beleuchtung nach Bay K Applikation ist eine deutliche Tonuserhöhung im Vergleich zur 5-ALA Zeitkontrolle zu erkennen (vgl. Abb. 16). Nach 200 min ist der Tonus in der 5-ALA 0,3 mM + Bay K Versuchsreihe mit einem Wert von 116,2 % von ACh max. um ca. 100 % höher als in der 5-ALA 0,3 mM Zeitkontrolle, welche einen ACh max. Wert von -16,7 % nach 200 min besitzt. Nach Ausspülen der Substanzen am Versuchsende wies der endprozeduale Tonus für beide Versuchsreihen deutlich erhöhte Werte auf, im Vergleich mit dem Grundtonus der Präparate, welcher am Versuchsbeginn gemessen wurde. Die Grundaktivität der Muskelstreifen des Magenfundus hat sich demnach durch das Versuchsschema verändert, was auf intrazelluläre Modifikationsvorgänge schließen lässt. Derartige intrazelluläre Modifikationen könnten Folge einer Aktivierung der löslichen und der membrangebundenen Guanylat Cyclase (GC) durch das bei der Beleuchtung aus 5-ALA entstehende PPIX und seiner Derivate sein (Ignarro et al. 1982; Lacombe und Eberentz-Lhomme, 1983; Waldman et al., 1984). Eine nachfolgende Beeinflussung der am Kontraktionsvorgang

beteiligten intrazellulären Signalkaskaden ist anzunehmen. Denkbar wäre eine Hemmungsverstärkung durch NO (lösliche GC) wie auch eine IP3 vermittelte Aktivitätszunahme (gebundene GC). Inwieweit diese Signalkaskaden mehr oder weniger stark beeinflusst sind, gilt es zukünftig in weiteren Experimenten zu klären.

Ebenfalls denkbar ist eine Beeinflussung des Membranpotentials und somit des Aktivierungszustandes der Muskelzelle, ausgelöst durch eine 5-ALA oder PPIX vermittelte Hemmung der Na^+/K^+-ATPase (Avner et al., 1983; Russell et al., 1983).

Sehr wahrscheinlich weisen die oben beschriebenen intrazellulären Modifikationen auf eine eingeleitete Apoptose der Muskelzellen hin. Die durch eine 5-ALA PDT eingeleitete Apoptose besitzt unterschiedliche intrazelluläre Angriffspunkte und besteht aus komplexen Signalkaskaden. Direkte mitochondriale Photoschäden können eine Apoptose induzieren (Kessel und Luo, 1998) bzw. führen zu einer Freisetzung proapoptotischer Substanzen, wie Cytochrom C mit nachfolgender Aktivierung von Caspasen (Liu et al., 1996; Kroemer et al., 1998, Kriska et al., 2005; Shahzidi et al., 2006). Des Weiteren ist reaktiver bei der PDT entstehender Singulett-Sauerstoff ursächlich für die Peroxidation von mitochondrialen Membranlipiden. Diese peroxidierten Lipide sind frühe Initiatoren der Apoptosekaskade (Kriska et al., 2002). Eine weitere Apoptosesignalkaskade wird durch das aus 5-ALA endogen metabolisierte PPIX aktiviert. PPIX bindet mit hoher Affinität an den peripheren mitochondrialen Benzodiazepin Rezeptor (PBR) (Verma et al., 1987; Verma und Snyder, 1988; Verma et al., 1998). Der PBR stellt eine Zielstruktur der porphyrinvermittelten Phototoxizität dar (Ratcliffe und Matthews, 1995) und ist physiologisch an der Zellproliferation (Stepien et al., 1991) sowie der mitochondrialen Atmungskette (Hirsch et al., 1989) beteiligt. Eine Aktivierung von Endonucleasen und ein Verlust von Zellfunktionen (Nicotera et al., 1990) wird durch erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} Konzentrationen verursacht. Die Imbalance kann entstehen durch einen verminderten Ca^{2+} Influx ins SR.

Ein Hinweis hierfür ist die hohe Photolabilität der sarkoplasmatischen Ca^{2+} Pumpe (Ricchelli et al., 1999). Durch Wechselwirkungen von Zellmembran Ca^{2+} ATPasen mit Reaktionsprodukten der PDT, wie auch durch Membranpotentialänderungen (s.o.) kann ein verminderter nach extrazellulär gerichteter Ca^{2+} Efflux Auslöser einer gestörten Ca^{2+} Homöostase sein. Es ist anzunehmen, dass beide Prozesse (verminderter Ca^{2+} Influx ins SR und verminderter Ca^{2+} Efflux nach extrazellulär) an der Imbalance der Ca^{2+} Homöostase beteiligt sind, die zu antiproliferativen und apoptoseinduzierenden intrazellulären Signalkaskaden führen (Meissner und Noack, 2008).

Für eine induzierte Apoptose, die 5-ALA und Bay K konzentrationsabhängig ist, spricht neben dem Elastizitätsverlust und der veränderten Grundaktivität der Muskelstreifen des Magenfundus, dass die Reagibilität am Versuchsende für die Versuchsreihe 5-ALA 0,3 mM + Bay K niedriger ist im Vergleich zur 5-ALA 0,1 mM + Bay K Versuchsreihe. Die 5-ALA 0,1 mM + Bay K Versuchsreihe reagiert vergleichsweise physiologisch adäquater auf eine ACh Applikation, ist jedoch im Vergleich mit der 5-ALA 0,1 mM Zeitkontrolle ohne Bay K und der ACh 1 µM Kontrollreihe in ihrer Reagibilität eingeschränkt (vgl. Abb. 21). Die Kombination mit Bay K forciert demzufolge den lichtinduzierten irreversiblen Funktionsverlust der mit 5-ALA inkubierten Magenfunduspräparate.

Bei der Betrachtung der einzelnen Lichtreaktion der Präparate mit der kombinierten Applikation von 5-ALA und Bay K lässt sich feststellen, dass 2 Reaktionsmuster zu beobachten sind. Zum einen eine Tonushemmung unter Beleuchtung, die am stärksten bei 5-ALA 0,1 mM und Bay K 1 µM behandelten Präparaten ausgeprägt ist und zum anderen eine kontinuierliche Tonuszunahme unter Beleuchtung, die am deutlichsten bei einer 5-ALA Konzentration von 0,3 mM und Bay K Konzentration von 0,1 µM zu sehen ist (Noack et al., 2009; Jaborg und Noack 2010). Diese Befunde sprechen dafür, dass der photorelaxierende Effekt von (-) Bay K 8644 (Mikkelsen et al., 1985) in den Versuchsreihen mit kombinierter Gabe nur in hoher Bay K Konzentration und bei niedriger 5-ALA Konzentration erkennbar ist. Als Grund für dieses Phänomen ist eine 5-ALA dosisabhängige Beeinträchtigung

der spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} Kanäle in ihrer Funktion oder Morphologie durch die bei der Beleuchtung entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies bzw. Photoprodukte denkbar.

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen an 5-ALA 0,1 mM und Bay K 1 µM behandelten Präparaten des Magenfundus zeigten über 3 Beleuchtungszyklen keine Veränderung der intrazellulären freien Ca^{2+} - Konzentration in der Plateauphase (vgl. Abb. 25). Der Muskeltonus während der Plateauphase sank zwischen dem 1. und 2. Zyklus ab und stieg zwischen dem 2. und 3. Zyklus an. Dieser Befund gleicht den oben beschriebenen Ergebnissen der Organbadversuche, die ebenfalls zweierlei Reaktionsmuster der Kraftentwicklung unter Beleuchtung zeigten. Eine Änderung der Kraft ohne gleichzeitige Änderung des intrazellulären Ca^{2+} ist höchstwahrscheinlich durch eine vermehrte Bildung von Diacylglycerol (DAG) begründet. DAG entsteht neben IP3 durch Spaltung von Phospholipiden der Zellmembran durch das Enzym Phospholipase C und aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Die PKC ist Bestandteil eines Signalweges, der zu einer Ca^{2+} unabhängigen, lang anhaltenden Kontraktion führt (Khalil et al., 1992; Khalil und Morgan, 1993; Makhlouf und Murthy, 1997). Da das gleichzeitig entstehende IP3 zu einer intrazellulären Ca^{2+} Zunahme über Ca^{2+} Freisetzung aus dem SR führt, ist anzunehmen, dass die IP3-Signalkaskade durch die Licht- und Substanzbehandlung mit 5-ALA und Bay K gestört ist. Denkbar sind Beeinträchtigungen der Signalkaskade durch 5-ALA Photoprodukte, als auch Schäden am SR, wie die oben erläuterte Photolabilität der sarkoplasmatischen Ca^{2+} Pumpe.

Das Ca^{2+}- wie auch das Kraftsignal zeigten in den Fluoreszenzmessung am Magenfundus Oszillationen mit Periodenzeiten zwischen 22-154 sec (vgl. Abb. 23). Die berechneten Kreuzkorrelationen zwischen beiden Messsignalen führten bei 7 Zeitverschiebungen à 22 sec weder zu gleich- noch zu gegensinnigen Wechselbeziehungen. Eine mögliche Erklärung für die gemessenen Oszillationen könnten stimulierte Cajal-Zellen sein, die durch Beleuchtung der mit 5-ALA + Bay K behandelten Muskelstreifen aktiviert wurden. Interstitielle Zellen von Cajal (ICC) umfassen mehrere Subtypen und lassen sich im gesamten Gastrointestinaltrakt

finden (Torihashi et al., 1999). Ihre Funktion besteht in der Schrittmachergenerierung (Sanders, 1996; Sanders et al., 2006; Kito et al., 2009) sowie in der Verknüpfung des enterischen Nervensystems mit der glatten Muskulatur (Beckett et al., 2005). Die endogene Organrhythmizität des Magenfundus, welche sich zusammensetzt aus Sekunden-, Minuten- und Stundenrhythmus (Golenhofen et al., 1970), könnte durch die oben beschriebene Beeinflussung der ICC, infolge der Licht- und Substanzbehandlung, gestört sein. Möglicherweise ergibt sich aus der Kombination von 5-ALA PDT mit Bay K ein Ansatzpunkt in der Behandlung der idiopathischen / diabetischen Gastroparese, bei der ICC in ihrer Funktion und Anzahl herabgesetzt sind (Ördög, 2008; Faussone-Pellegrini et al., 2011). Weitere Untersuchungen sind erforderlich um diese Hypothese zu verifizieren.

4.2.2 Motorische Effekte durch Licht an mit 5-ALA und Bay K behandelter überwiegend phasisch aktivierter Muskulatur am Beispiel der Harnblase

1980 zeigten Cutler et al., dass 5-ALA zu einer dosisabhängigen Abnahme der Spontanaktivität an Muskelstreifen des Kaninchenduodenums führt, die nach Auswaschen von 5-ALA aus dem Organbad reversibel war. Beobachtet wurden eine Abnahme der phasischen Aktivität in Frequenz- und Amplitudenhöhe, sowie eine Abnahme des Muskeltonus. Eine Beleuchtung der Präparate wurde nicht durchgeführt. Unsere Versuche an ebenfalls überwiegend phasisch aktiven Harnblasenpräparaten der Ratte zeigten in der 5-ALA 0,1 mM Zeitkontrolle ohne Bay K Applikation keine Abnahme (Dunkel- und Beleuchtungsphasen) und in der 5-ALA 0,3 mM Zeitkontrolle lediglich eine minimale Abnahme der phasischen Spontanaktivität unter Lichtzufuhr. Eine starke Abnahme der Amplitudenhöhe der phasischen Spontanaktivität konnte an 5-ALA behandelter überwiegend phasisch aktiver Muskulatur des Magenantrums und der Portalvene beobachtet werden (vgl. Abb. 11 u. 12). Am stärksten war die irreversible Abnahme der Amplitude unter Beleuchtung ausgeprägt. An der Harnblase konnten wir eine irreversible Amplitudenabnahme nur in den Versuchsreihen mit der kombinierten Applikation

von 5-ALA und Bay K unter Beleuchtung feststellen. Der größte Amplitudenverlust ließ sich in der Versuchsreihe 5-ALA 0,3 mM + Bay K 1 µM erkennen (vgl. Abb. 18).

Ein Zusammenhang zwischen applizierter 5-ALA + Bay K Konzentration und der Abnahme der Spontanaktivität ist demzufolge bei der Harnblase anzunehmen. Die phasische Rhythmusgenerierung glattmuskulärer Organe wird mittels ICC (s. Abschn. 4.2.1) ausgeübt. Über langsame Potentialänderungen (slow waves) und daraus folgenden Depolarisationen der glatten Muskelzelle erhöhen die ICC die Öffnungswahrscheinlichkeit spannungsabhängiger Ca^{2+} Kanäle in der Muskelzellmembran (Sanders et al., 2006). Der anschließende Ca^{2+} Einstrom löst die Kontraktion aus (Ozaki et al., 1991). Obwohl bisher vorwiegend über ICC im Gastrointestinaltrakt geforscht und publiziert wurde, konnten Wissenschaftler zeigen, dass ICC auch in der Harnblase existieren (Smet et al. 1996, McCloskey 2010). ICC sind an 3 verschiedenen Lokalisationen der Harnblasenwand zu finden: Suburothelial, zwischen und entlang der glatten Muskelfasern. Durch diese Architektur und enge Kontakte der ICC zu Nerven kann sich eine Kommunikationsleitung zwischen Urothelium und Detrusormuskulatur ausbilden (Sui et al., 2002; Davidson und McCloskey 2005). Ob ICC in der Harnblase auch die Funktion der Schrittmachergenerierung innehaben wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Hashitani et al. sprechen den ICC der Harnblase eher eine rhythmusmodulierende als eine rhythmusgenerierende Funktion zu. Die Rhythmusgenerierung findet Hashitani zufolge durch die glatte Detrusormuskulatur selbst statt, wohingegen die ICC lediglich an der Modulierung der Signaltransmission beteiligt sind (Hashitani et al., 2004b).

Neben der Änderung der phasischen Spontanaktivität konnte in den Versuchsreihen der Harnblase mit der Kombination von 5-ALA und Bay K unter Beleuchtung eine Kraftzunahme über die Versuchsdauer sowohl bei 5-ALA 0,1 mM wie auch bei 5-ALA 0,3 mM festgestellt werden. Die stärkste Kraftzunahme unter Beleuchtung ließ sich in der Versuchsreihe 5-ALA 0,3 mM + Bay K 1 µM erkennen, bei der der endprozeduale Tonus mit 161,84% deutlich über dem ACh max.

Wert von 100 % liegt (vgl. Abb. 19).

Da unsere Messergebnisse demnach zeigen, dass die phasische Aktivität der Harnblasenmuskulatur erlischt, jedoch der Tonus der mit 5-ALA und Bay K behandelten Muskelstreifen durch Beleuchtung zunimmt, stellt sich die Frage, inwiefern die ICC in ihrer Funktion (rhytmusmodulierend/-generierend) bzw. die Detrusormuskelzellen als Rhytmusgenerator durch Beleuchtung und Substanzapplikation beeinträchtigt werden. Denkbar ist eine Hemmung der Schrittmacherzellen in ihrer Aktivität durch die lichtinduzierte Freisetzung von NO aus dem Bay K Molekül. Diese Hemmung wird über eine Aktivierung von BK Kanälen, Ca^{2+} aktivierte K^+ Kanäle, durch NO verübt (Zhu und Huizinga, 2008). BK Kanäle sind in der Harnblasenmuskulatur essentiell, um das Aktionspotential in Dauer und Amplitude zu regulieren und um das Membranpotential aufrecht zu erhalten (Heppner et al., 1997). .

Mehrfachbeleuchtungen der Harnblasenpräparate wirken sich in erster Linie auf den Muskeltonus aus. Der Muskeltonus steigt während der Plateauphasen B_{1-3} an, wohingegen das intrazelluläre Ca^{2+} nur geringfügig zunimmt (vgl. Abb. 25). Die Resultate sprechen für eine Ca^{2+} unabhängige Kontraktionszunahme der Harnblasenpräparate durch das Substanzapplikations-Beleuchtungs-Schema. Ursächlich hierfür könnte eine Aktiverung der Rho-Kinase durch aus 5-ALA unter Beleuchtung entstandene reaktive Sauerstoffspezies sein (Jin et al., 2004). Die Rho-Kinase hemmt die Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) und erhöht auf diesem Wege die Ca^{2+} Sensitivität der kontraktilen Proteine (Fu et al., 1998; Somlyo und Somlyo, 2000; Wibberly et al., 2003). Ob die Rho-Kinase durch 5-ALA, Bay K oder deren Photoprodukte ebenfalls aktiviert werden kann, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt. Zu der Ca^{2+} unabhängigen Kontraktionszunahme der Harnblase könnte ferner eine Aktivierung der PKC (s. Abschn. 4.2.1) geführt haben. Da die Plateauwerte der Ratio bei den Harnblasenpräparaten bereits ab dem 1. Beleuchtungszyklus oberhalb der Ratioreferenz von 100% liegen (vgl. Abb. 25), könnte dies auf einen durch die Bay K Applikation hervorgerufenen Ca^{2+} Anstieg zurück zu führen sein. Ähnliche Befunde zeigten sich auch bei Präparaten des

Magenfundus. Eine gezielte Auswirkung durch Beleuchtung von mit 5-ALA und Bay K behandelter glatter Muskulatur auf ein charakteristisches Ca^{2+} Aktivierungssystem ist demzufolge unwahrscheinlich.

Die Fluoreszenzmessungen der Harnblasenpräparate zeigten Oszillationen des Ca^{2+} - und des Kraftsignals mit Periodenzeiten im Bereich von 22-154 sec. Diese Oszillationen waren unabhängig von der Beleuchtungsrhythmik, welche aus 20 sec Beleuchtungsphase und 2 sec Dunkelphase bestand (Jaborg et al., 2010; Jaborg und Noack, 2011). Dieser Befund lässt indirekt auf elektrische Potentialschwankungen der Detrusormuskulatur schließen, da elektrische Aktionspotentiale im Detrusormuskel Ca^{2+} abhängig sind und mit mechanischen Kontraktionen einhergehen (Mostwin, 1986; Hashitani et al., 2004a). Da weder eine positive noch eine negative Korrelation zwischen dem Ca^{2+} - und Kraftsignal erkennbar war, ist davon auszugehen, dass eine Entkoppelung der physiologischen Kontraktionsprozesse stattgefunden hat. Es ist sehr wahrscheinlich, dass auch an der Harnblase Apoptoseprozesse (s. Abschn. 4.2.1) infolge des Substanzapplikations-Beleuchtungs-Schemas initiiert wurden, welche die Entkoppelung der physiologischen Kontraktionsprozesse nach sich ziehen und mit einem Verlust der Spontanaktivität einhergehen.

Aus dem Verlust der Spontanaktivität, hervorgerufen durch Beleuchtung von mit 5-ALA und Bay K behandelten Muskelstreifen, lässt sich ein Verlust der Harnblase in ihrer Speicher- und Entleerungsfunktion folgern. Würde hingegen zu einer 5-ALA PDT eines Harnblasenkarzinoms Bay K lokal in den malignen Befund der Harnblasenwand injiziert, so wäre eine Effektivitätssteigerung der PDT ohne Funktionsverlust des restlichen Blasengewebes zu erwarten. Eine Kombination der 5-ALA gestützten PDT mit Bay K könnte folglich zu Einsparungen der eingesetzten Menge an 5-ALA und / oder der Lichtmenge führen, welche in zu hohen Dosen zu einer funktionellen Beeinträchtigung der Harnblase führt (Grönlund-Pakkanen et al., 2001). Neben superfizialen Blasentumoren (Grönlund-Pakkanen et al., 2000; Waidelich et al., 2001) könnten auf diesem Wege auch solche Tumore therapiert werden, die in tieferen Wandschichten gelegen bzw. hineingewachsen

sind. Inwieweit Funktionseinschränkungen der Harnblase durch eine 5-ALA + Bay K PDT zu erwarten sind und in welchem Maße eine elektrophysiologische Beeinflussung der Detrusormuskulatur durch die Behandlung stattfindet, gilt es in weiteren experimentellen Untersuchungsansätzen zukünftig zu klären. Diesbezüglich sind insbesondere elektrische Potentialmessungen erforderlich.

4.2.3 Gemeinsamkeiten in der Tonusveränderung aller getesteten glattmuskulären Organe

Die Auswahl der getesteten Präparate erfolgte nach klinischen und nach physiologischen Kriterien. Zu den klinischen Aspekten zählt die heutige Verwendung von 5-ALA zur PDT und PDD von Tumoren der Harnblase (Kriegmair et al., 1996; Waidelich et al., 2001), des Gastrointestinaltraktes (Barr et al., 1996; Gossner et al., 1998; Ackroyd et al., 2000) sowie den experimentellem Einsatz an Gefäßen zur Verhinderung postinterventioneller Gefäßrestenosen in Koronarien (Nyamekye et al., 1995; Gabeler et al., 2002; Pai et al., 2005). Unterschiedliche Ca^{2+} Aktivierungsprozesse der glatten Muskulatur zählten zu den physiologischen Aspekten. Zu nennen sind die Ca^{2+} Freisetzung aus dem SR und daraus folgender tonischer Aktivierung und das schnelle Öffnen membranständiger Ca^{2+} Kanäle, woraus phasische Kontraktionsmuster hervorgehen (Golenhofen 1976). Obwohl es sich bei den Präparaten um unterschiedliche glattmuskuläre Organe handelte (Magenfundus, Magenantrum, Portalvene und Harnblase), konnten gleichartige Reaktionsmuster während und im Anschluss an die Beleuchtungen der mit 5-ALA und Bay K behandelten Muskelstreifen beobachtet werden. Die Auswertung der Kraft-Zeit-Verläufe (vgl. Abb. 20) aller Präparate unter Lichtzufuhr in den Versuchsreihen mit der kombinierten Gabe von 5-ALA und Bay K weist eine signifikante Kraftzunahme auf. Die größte Tonuszunahme unter den multiplen Beleuchtungen ist in der Versuchsreihe mit 5-ALA 0,3 mM + Bay K zu erkennen. Keine Änderungen bzw. Abnahmen des Tonus durch die Beleuchtungen zeigen die 5-ALA Zeitkontrollen.

Wie schon beim Magenfundus und bei der Harnblase erläutert wurde, lässt die Beleuchtung der mit 5-ALA und Bay K behandelten unterschiedlichen Muskelpräparate eine Beeinflussung intrazellulärer Muskelkontraktionskaskaden mutmaßen.

Die Signifikanztestung aller Präparate hinsichtlich der Größen endprozedualer Tonus, Reagibilität, Kontraktilität und Bay K Effekt zeigten trotz Vielfältigkeit der Präparatetypen qualitativ gleichartige Ergebnisse.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Grundaktivität (endprozedualer Tonus) durch das Substanzapplikations-Beleuchtungs-Schema bei den Versuchsreihen mit kombinierter 5-ALA und Bay K Applikation gegenüber denen mit identischer alleiniger 5-ALA Applikation und der ACh 1 µM Kontrolle stattgefunden hat.

Die Funktionalität (Reagibilität), als Reaktionsvermögen auf ACh 10 µM Applikation, nimmt durch die kombinierte Applikation von 5-ALA und Bay K in den Versuchsreihen aller Präparate am stärksten ab, im Vergleich mit den 5-ALA Zeitkontrollen und der ACh 1 µM Kontrolle. Dieser Effekt lässt sich am eindrucksvollsten in den Versuchsreihen mit der Applikation von 5-ALA 0,3 mM + Bay K erkennen (vgl. Abb. 21). Demnach kann allgemein von einer Verstärkung der apoptotischen Wirkung einer 5-ALA PDT durch Bay K am glatten Muskel ausgegangen werden. Es bleibt zu klären, ob Einsparungen der Substanz 5-ALA oder der zugeführten Lichtmenge durch die Kombination mit Bay K bei gleich bleibenden bzw. besseren Therapieerfolgen möglich sind.

Die Analyse des maximal erzielten Tonus im Anschluss an die ACh 10 µM Applikation am Versuchsende (Kontraktilität) zeigt niedrigere Werte in den Versuchsreihen ohne Bay K im Vergleich zu den Versuchsreihen mit Bay K Applikation. Je höher die 5-ALA Konzentration in den Versuchsreihen ohne Bay K gewählt wurde, desto niedriger wurde der maximal erzielte Tonus (vgl. Abb. 22). Dieser Befund weist auf eine durch 5-ALA und Licht vermittelte Beeinflussung der ACh Rezeptoren, der nachfolgenden intrazellulären Signalkaskaden oder der intrazellulären Ca^{2+} Speicher hin. Diese Beeinflussung ist in den Versuchsreihen mit der

Kombination aus 5-ALA und Bay K nicht zu sehen bzw. durch andere Prozesse überlagert und folglich nicht sichtbar.
Der Einfluss unterschiedlicher Bay K Konzentrationen, in der Kombination mit 5-ALA und Licht, auf die Muskelkraft wird durch die Größe Bay K Effekt charakterisiert (vgl. Abb. 26).

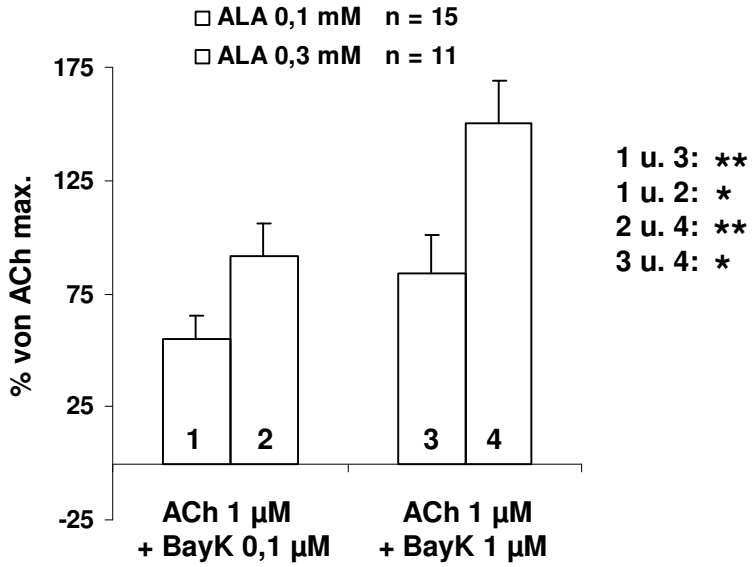


Abb. 26 Wirkung unterschiedlicher Bay K Konzentrationen (Bay K Effekt)
Die Versuchsreihen bestanden aus Präparaten von Magenfundus, Magenantrum, Portalvene und Harnblase. Die Werte wurden gebildet durch Mittelwertbildung der 3 Beleuchtungszyklenwerte einer Bay K Konzentrationsstufe. Zu sehen sind Mittelwerte, SEMs und auf dem 5% (*) oder 1% Niveau (**) signifikante Unterschiede. Die Zahlen am rechten Bildrand der Diagramme repräsentieren die Signifikanztestungen zwischen unterschiedlichen Versuchsreihen. Es lässt sich feststellen, dass je höher die 5-ALA u./o. die Bay K Konzentration in der Kombination einer Versuchsreihe ist, desto größer wird der erzielte Tonus in % von ACh max., ausgelöst durch die Beleuchtung mit 8 klx.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass je höher die 5-ALA und / oder die Bay K Konzentration einer Versuchsreihe gewählt wurde, desto größer wurde der erzielte Tonus in % von ACh max., ausgelöst durch die Beleuchtung mit 8 klx. Bei der im

Rahmen dieser Arbeit entwickelten Hypothese, dass die Muskelkraftzunahme ein Zeichen der Apoptoseinitiierung ist, lässt der obige Befund auf eine Wirkverstärkung der 5-ALA PDT durch Bay K schließen. Die Annahme, dass die Beleuchtung von 5-ALA und Bay K behandelter glatter Muskulatur zu einer Ca^{2+} unabhängigen Tonuszunahme führt, lässt unter Berücksichtigung der Ergebnisse bei der Fluoreszenzmikroskopie eine dosisabhängige Kraftzunahme durch Bay K erkennen.

5 Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Anhaltspunkte für einen Benefit der PDT von Tumoren durch Kombination des Photosensibilisators 5-ALA mit Bay K bestehen. Um die Frage zu klären, ob 5-ALA oder die applizierte Lichtmenge in der Tumortherapie durch die Kombination mit Bay K eingespart werden kann, bedarf es weiterer pharmakologischer und klinischer Untersuchungen. Die motorischen Effekte des Substanz-Applikations-Beleuchtungsschemas zeigten vielfältige Einzelreaktionen. Trotz der Vielfältigkeit der Präparatetypen in Morphologie und Funktion wurden qualitativ gleichartige Befunde erhoben. Eine gezielte Auswirkung auf ein charakteristisches Ca^{2+} Aktivierungssystem durch Beleuchtung von 5-ALA und Bay K behandelter glatter Muskulatur ist demnach unwahrscheinlich. Vielmehr sprechen die Ergebnisse für unterschiedliche Angriffsorte der Behandlung. Als Beispiele für jene Angriffsorte wurden die intrazellulären Apoptose- und Kontraktionskaskaden erläutert.

Eine Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} Homöostase durch Beleuchtung der 5-ALA und Bay K behandelten glatten Muskulatur konnte nicht gezeigt werden. Lediglich marginale Änderungen des freien intrazellulären Ca^{2+} waren zu sehen. Zukünftig bleibt zu klären, ob ein Zusammenhang zwischen der individuellen gewebsspezifischen Größe der intrazellulären Ca^{2+} Speicher und den motorischen Reaktionsmustern besteht. Ebenso ist zu überprüfen, inwieweit eine Beeinflussung des Membranpotentials durch eine 5-ALA und Bay K vermittelte PDT stattfindet und ob die Interstitiellen Zellen von Cajal in ihrer Funktion beeinflusst

werden. Hierzu sind elektrische Potentialmessungen durchzuführen.
Letztendlich sind strukturelle Untersuchungen mit dem Elektronenmikroskop erforderlich, um eine durch die 5-ALA und Bay K Behandlung eingeleitete Apoptose verifizieren zu können.

6 Thesen

1. Die Photodynamische Therapie benutzt Photosensitiser um Tumorgewebe zu identifizieren und Apoptose einzuleiten. Hierzu wird häufig 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) als Photosensitiser eingesetzt. 5-ALA reichert sich selektiv im Tumorgewebe an und besitzt eine geringere Phototoxizität, aufgrund einer kürzeren Halbwertszeit, im Gegensatz zu anderen Photosensitisern.

2. Glattmuskuläre Präparate von Magenfundus, Magenantrum, Portalvene und Harnblase der Ratte zeigen im Organbad phasisches und tonisches Spontanverhalten. Nach Behandlung mit dem L-Typ Calciumkanal Öffner Bay K 8644 (Bay K) nimmt die phasische Spontanaktivität zu. Eine reversible Photorelaxation manifestiert sich nach Behandlung mit Bay K und anschließender Beleuchtung der Präparate.

3. Nach Behandlung der glattmuskulären Präparate mit 5-ALA nehmen die aktive Kraft und das phasische Spontanverhalten, initiiert durch Beleuchtung der Präparate, ab. Die Beleuchtung der Präparate nach kombinierter Applikation von 5-ALA und Bay K führt zu einem Anstieg der aktiven Kraft.

4. Die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration steigt nach Applikation von Bay K in den Präparaten der Harnblase an. Die Beleuchtung von mit 5-ALA und Bay K vorbehandelten Präparaten von Magenfundus und Harnblase führt zu einem marginalen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration. Beleuchtungsrepetitionen führen zu keinem weiteren Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration.

5. Eine Apoptoseeinleitung durch das Substanzapplikations-Beleuchtungs-Schema der glattmuskulären Präparate von Magenfundus, Magenantrum, Portalvene und Harnblase ist sehr wahrscheinlich.

6. Trotz Vielfältigkeit in Morphologie und Funktion der Präparatetypen sind in dieser Arbeit qualitativ gleichartige Befunde erhoben worden.

7. Ein Benefit in der Therapie von Tumoren mittels photodynamischer Therapie (PDT) durch Kombination von 5-ALA mit Bay K ist allem Anschein nach gegeben. Eine Einsparung der eingesetzten Menge an 5-ALA in der PDT eines Harnblasenkarzinoms könnte durch die Kombination einer lokalen, in den malignen Befund der Harnblasenwand injizierten Bay K Dosis erzielt werden.

7 Zusammenfassung

Die vermehrte Anreicherung von fluoreszierenden Stoffen in malignen Geweben machen sich zwei klinisch relativ neuartige Verfahren, die photodynamische Therapie (PDT) und die photodynamische Diagnostik (PDD), zunutze. Mittels anschließender Lichtzufuhr und daraus resultierender chemischer Wechselwirkungen der photosensiblen Substanzen können Tumore annähernd selektiv behandelt bzw. detektiert werden. Heutzutage wird vergleichsweise häufig 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) als Photosensitiser zur PDT und PDD von Tumoren der Harnblase, des Gastrointestinaltraktes sowie im experimentellen Ansatz zur Verhinderung postinterventioneller Gefäßrestenosen in Koronarien eingesetzt.

In dieser Arbeit wurde die kombinierte Wirkung von 5-ALA und Bay K 8644 unter basalen Bedingungen und Licht an glattmuskulären Organen untersucht. Bay K ist ein Dihydropyridinderivat und besitzt die Eigenschaft, an sonst lichtunempfindlicher glatter Muskulatur eine Photorelaxation zu induzieren. Es wurde den Fragen nachgegangen, welche motorischen Effekte sich durch eine systematische Kombination dieser lichtsensitiven Substanzen erzielen lassen und ob durch das Applikations-Beleuchtungsschema der Ca^{2+} Haushalt der glatten Muskulatur beeinflusst wird. Dazu wurden Kraftmessungen im konventionellen Organbad sowie mikroskopische Fluoreszenzmessungen durchgeführt.

Die erhobenen Daten zeigen, dass sich die Grundaktivität der mit 5-ALA und Bay K behandelten glattmuskulären Präparate durch das Substanzapplikations-Beleuchtungs-Schema zu höheren Tonuswerten verändert hat. Das intrazelluläre freie Ca^{2+} ist, ausgelöst durch die Beleuchtung, lediglich marginal angestiegen. Vermutlich findet eine Aktivierung von Ca^{2+} unabhängigen Kontraktionsprozessen durch Beleuchtung der 5-ALA und Bay K behandelten Muskelstreifen statt.

Anhand der Untersuchungsergebnisse ist eine Apoptoseinitiierung als sehr wahrscheinlich anzusehen, da die Präparate physiologisch nicht mehr adäquat auf eine ACh Applikation reagieren und die Spontanaktivität über die Versuchsdauer erlischt.

Obwohl eine Vielfältigkeit in Morphologie und Funktion der Präparatetypen gegeben war, wurden qualitativ gleichartige Befunde erhoben.
Die genannten Resultate lassen darauf schließen, dass ein Benefit in der Therapie von Tumoren mittels einer 5-ALA PDT durch Kombination mit Bay K gegeben sein könnte.

8 Literaturverzeichnis

1) Ackroyd, R., Brown, N.J., Davis, M.F., Stephenson, T.J., Marcus, S.L., Stoddard, C.J., Johnson, A.G. und Reed, M.W.R. (2000): Photodynamic therapy of dysplastic Barrett's oesophagus: a prospective double-blind randomised placebo-controlled trial. Gut 2000, 47: 612-615

2) Agarwal, M.L., Clay, M.E., Harvey, E.J., Evans, H.H., Antunez, A.R. und Oleinick, N.L. (1991): Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. Cancer Res., 51: 5993-5996

3) Auler, H. und Banzer, G. (1942): Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. Z. Krebsforsch. 53: 65-68

4) Avner, D.L., Larsen, R. und Berenson, M.M. (1983): Inhibition of liver surface membrane Na^+,K^+-adenosine triphosphatase, Mg^{2+}-adenosine triphosphatase and 5'-nucleotidase activities by protoporphyrin. Obeservations in vitro and in perfused rat liver. Gastroenterology, 85: 700-706

5) Barr, H., Shepherd, N.A., Dix, A., Roberts, D.J., Tan, W.C. und Krasner, N. (1996): Eradication of high grade-dysplasia in columnar-lined (Barrett's) oesophagus by photodynamic therapy with endogenously generated Protoporphyrin IX. Lancet 1996, 348: 584-585

6) Baumgartner, R., Huber, R.M., Schulz, H., Stepp, H., Rick, K., Gamarra, F., Leberig, A. und Roth, C. (1996): Inhalation of 5-aminolevulinic acid: a new technique for fluorescence detection of early stage lung cancer. J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 36: 169-174

7) Beckett, E.A., Takeda, Y., Yanase, H., Sanders, K.M. und Ward, S.M. (2005): Synaptic specializations exist between enteric motor nerves and interstitial cells of Cajal in the murine stomach.
J. Comp. Neurol., 493: 193-206

8) Bezdetnaya, L., Zeghari, N., Belitchenko, I. Barberi-Heyob, M., Merlin, J.L., Potapenko, A. und Guillemin, F. (1996): Spectroscopic and biological testing of photobleaching of porphyrins in solutions.
Photochem. Photobiol., 64(2): 382-386

9) Burger, M., Zaak, D., Stief, C.G., Filbeck, T., Wieland, W.-F., Roessler, W. und Denzinger, S. (2007): Photodynamic diagnostics and noninvasive bladder cancer: is it cost-effective in long term application? A Germany-based cost analysis. Eur. Urol., 52: 142-147

10) Cairnduff, F., Stringer, M.R., Hudson, E.J., Ash, D.V. und Brown, S.B. (1994): Superficial photodynamic therapy with topical 5-aminolaevulinic acid for superficial primary and secondary skin cancer.
Br. J. Cancer, 69: 605-608

11) Curnow, A., Haller, J.C. und Bown, S.G. (2000): Oxygen monitoring during 5-aminolaevulinic acid induced photodynamic therapy in normal rat colon. Comparison of continuous and fractionated light regimes.
J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 58: 149-155

12) Cutler, M.G., Mair, J. und Moore, M.R. (1990): Pharmacological activities of delta-aminolaevulinic acid, Protoporphyrin IX and haemin in isolated preparations of rabbit gastric fundus and jejunum.
J. Auton. Pharmac., 10: 119-126

13) Cutler, M.G., Moore, M.R. und Dick, J.M. (1980): Effects of delta-aminolaevulinic acid on contractile activity of rabbit duodenum.
European Journal of Pharmacology, 64: 221-230

14) Dailey, H.A. und Smith, A. (1984): Differential interaction of porphyrins used in photoradiation therapy with ferrochelatase.
Biochem. J., 223: 441-445

15) Davidson, R.A. und McCloskey, K. (2005): Morphology and localization of interstitial cells in the guinea pig bladder: structural relationships with smooth muscle and neurons. J. Urol., 173: 1385-1390

16) Dougherty, T.J., Grinday, G.B., Fiel, R., Weishaupt, K.R. und Boyle, D.G. (1975): Photoradiation therapy II: Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. J. Natl. Cancer Inst., 55: 115-121

17) El-Sharabasy, M.M.H., El-Waseef, A.M., Hafez, M.M. und Salim, S.A. (1992): Porphyrin metabolism in some malignant diseases.
Br. J. Cancer, 65: 409-412

18) Faussone-Pellegrini, M.S., Grover, M., Pasricha, P., Bernard, C., Lurken, M., Smyrk, T., Parkman, H., Abell, T., Snape, W., Hasler, W., Unalp-Arida, A., Nguyen, L., Koch, K., Calles, J., Lee, L., Tonascia, J., Hamilton, F. und Farrugia, G. (2011): Ultrastructural differences between diabetic and idiopathic gastroparesis: The NIDDK gastroparesis clinical research consortium (GpCRC)(#†). J. Cell. Mol. Med., doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01451.x [Epub ahead of print]

19) Figge, F.H.J., Weiland, G.S. und Manganiello, L.O.J. (1948): Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 68: 640-641
in: Kick, G., Messer, G. und Plewig, G. (1996): Historische Entwicklung der Photodynamischen Therapie. Hautarzt 47: 644-649

20) Fink-Puches, R., Hofer, A., Smolle, J., Kerl, H. und Wolf, P. (1997): Primary clinical response and long-term follow-up of solar keratoses treated with topically applied 5-aminolevulinic acid and irradiation by different wave bands of light. J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 41: 145-151

21) Franckowiak, G., Bechem, M., Schramm, M. und Thomas, G. (1985): The optical isomers of the 1,4-dihydropyridine Bay K 8644 show opposite effects on Ca channels. Europ. J. of Pharmacol., 114: 223-226

22) Fu, X., Gong, M.C., Jia, T., Somlyo, A.V. und Somlyo, A.P. (1998): The effects of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 on arachidonic acid-, GTPgammaS-, and phorbol ester-induced Ca^{2+}-sensitization of smooth muscle. FEBS Lett., 440: 183-187

23) Fuchs, C., Siegert, J. und Wessels, J.M. (1994): In vitro Untersuchungen zur Aufnahme von 5-ALA und Retention von Protoporphyrin IX. Lasermedizin, 10: 103

24) Furchgott, R.F., Ehrreich, S.J. und Greenblatt, E. (1961): The photoactivated relaxation of smooth muscle of rabbit aorta.
J. Gen. Physiol., 44: 499-519

25) Gabeler, E.E.E., van Hillegersberg R., Statius van Eps, R.G., Sluiter, W., Mulder, P. und van Urk H. (2002): Endovascular photodynamic therapy with aminolaevulinic acid prevents balloon induced intimal hyperplasia and constrictive remodelling. Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg., 24: 322-331

26) Gibbs, S.L., Chen, B., O`Hara, J.A., Hoopes, P.J., Hasan, T. und Pogue, B.W. (2006): Protoporphyrin IX level correlates with number of mitochondria, but increase in production correlates with tumor cell size.
J. Photochem. Photobiol., 82: 1334-1341

27) Gibson, S.L., Cupriks, D.J., Havens, J.J., Nguyen, M.L. und Hilf, R. (1998): A regulatory role for porphobilinogen deaminase in delta-aminlaevulinic acid-induced photosensitization?
Br. J. Cancer, 77: 235-242

28) Golenhofen, K., von Loh, D. und Milenov, K. (1970): Elektrophysiologische Untersuchungen zur Spontanaktivität isolierter Muskelpräparate aus verschiedenen Abschnitten des Meerschweinchen-Magens.
Pflügers Arch., 315: 336-356

29) Golenhofen, K. (1976): Theory of P and T Systems for Calcium Activation in Smooth Muscle. In: E.Bülbring u. M.F. Shuba (Ed.), Physiology of Smooth Muscle, Raven Press, New York 1976: 197–202

30) Golenhofen, K. (1983): Untersuchungen am isolierten glatten Muskel. In: M. Wienbeck und G. Lux (Eds.), Gastrointestinale Motilität – Klinische Untersuchungsmethoden Edition Medizin, Weinheim 1983: 138-149

31) Golenhofen, K., Finger, K., Förster, B., Mandrek, K. und Noack, T. (1990): Light-induced relaxation of smooth muscle after treatment with BAY K 8644 is related to release nitric oxide.
Prog. Clin. Biol. Res., 327: 595-604

32) Gomer, C.J. und Razum, N.J. (1984): Acute skin response in albino mice following porphyrin photosensitization under oxic and anoxic conditions.
Photochem. Photobiol., 40(4): 435-439

33) Gossner, L., Stolte, M., Sroka, R., Rick, K., May, A., Hahn, E.G. und Ell, C. (1998): Photodynamic ablation of high-grade dysplasia and earl cancer in Barrett's esophagus by means of 5-aminolevulinic acid.
Gastroenterology, 114: 448-455

34) Grönlund-Pakkanen, S., Pakkanen, T.M., Talja, M., Kosma, V.M., Ala-Opas, M. und Alhava E. (2000): The morphological changes in rat bladder after photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX. BJU Int., 86: 126-132

35) Grönlund-Pakkanen, S., Pakkanen, T.M., Koski, E., Talja, M., Ala-Opas, M. und Alhava E. (2001): Effect of photodynamic therapy on urinary bladder function: an experimental study with rats.
Urol. Res., 29: 205-209

36) Grynkiewicz, G., Poenie, M. und Tsien, R.Y. (1985): A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. Journal of Biological Chemistry, 260(6): 3440–3450.
in: Kick, G., Messer, G. und Plewig, G. (1996): Historische Entwicklung der Photodynamischen Therapie. Hautarzt 47: 644-649

37) Hashitani, H., Brading, A.F. und Suzuki, H. (2004a): Correlation between spontaneous electrical, calcium and mechanical activity in detrusor smooth muscle of the guinea-pig bladder. Br. J. Pharmacol., 114: 183-193

38) Hashitani, H., Yanai, Y. und Suzuki, H. (2004b): Role of interstitial cells and gap junctions in the transmission of spontaneous Ca^{2+} signals in detrusor smooth muscles of the guinea-pig urinary bladder.
J. Physiol., 559: 567-581

39) Haugland, R.P. (1996): Handbook of fluorescent and research chemicals. Eugene, Leiden; The Netherlands.

40) Heppner, T.J., Bonev, A.D. und Nelson, M. T. (1997): Ca(2+)-activated K+ channels regulate action potential repolarization in urinary bladder smooth muscle. Am. J. Physiol., 273: C110-C117

41) Hirsch, J.D., Beyer, C.F., Malkowitz, L., Beer, B. und Blume, A.J. (1989): Mitochondrial benzodiazepine receptors mediate inhibition of mitochondrial respiratory control. Mol. Pharmcol., 35: 157-163

42) Hungerhuber, E., Stepp, H., Kriegmair, M., Stief, C., Hofstetter, A., Hartmann, A., Knuechel, R., Karl, A., Tritschler, S. und Zaak, D. (2007): Seven years' experience with 5-aminolevulinic acid in detection of transitional cell carcinoma of the bladder. Urology, 69: 260-264

43) Ignarro, L.J., Wood, K.S. und Wolin, M.S. (1982): Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 79: 2870-2873

44) Jin, L., Ying, Z. und Webb, R.C. (2004): Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta.
Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 287: H1495-H1500

45) Kelly, J.F. und Snell, M.E. (1976): Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder.
J. Urol., 115: 150–151

46) Kennedy, J.C., Pottier, R.H. und Pross, D.C. (1990): Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience, J. Photochem. Photobiol., 6: 143–148

47) Kennedy, J.C. und Pottier, R.H. (1992): Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy.
J. Photochem. Photobiol., 14: 275–292

48) Kessel, D. und Luo, Y (1998): Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 42: 89-95

49) Khalil, R.A., LaJoie, C., Resnick, M.S. und Morgan, K.G. (1992): Ca^{2+}-independent isoforms of protein kinase C differentially translocate in smooth muscle. Am. J. Physiol., 263: C714-C719

50) Khalil, R.A. und Morgan, K.G. (1993): PKC-mediated redistribution of mitogen-activated protein kinase during smooth muscle cell activation. Am. J. Physiol., 265: C406-C411

51) Kito, Y., Sanders, K.M., Ward, S.M. und Suzuki, H. (2009): Interstitial cells of Cajal generate spontaneous transient depolarizations in the rat gastric fundus.
Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 297: G814-G824

52) Koenig, F., McGovern, F.J., Larne, R., Enquist, H., Schomacker, K.T. und Deutsch, T.F. (1999): Diagnosis of bladder carcinoma using protoporphyrion IX fluorescence induced by 5-aminolaevulinic acid.
Br. J. Urol., 83: 129-135

53) König, K., Schneckenburger, H., Rück, A. und Steiner, R. (1993): In vivo photoproduct formation during PDT with ALA-induced endogenous porphyrins. J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 18: 287-290

54) Kokubun, S. und Reuter, H. (1984): Dihydropyridine derivatives prolong the open state of Ca channels in cultured cardiac cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 4824-4827

55) Kriegmair, M., Baumgartner, R., Knuechel, R., Steinbach, P., Ehsan, A., Lumper, W., Hofstadter, F. und Hofstetter, A. (1994): Fluorescence photodetection of neoplastic urothelial lesions following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid. Urology, 44: 836-841

56) Kriegmair, M., Baumgartner, R., Lumper, W., Waidelich, R. und Hofstetter, A. (1996): Early clinical experience with 5-aminulevulinic acid fort he photodynamic therapy of superficial bladder cancer.
Br. J. Urol., 77: 667-671

57) Kriska, T., Korytowski, W. und Girotti, A.W. (2002): Hyperresistance to photosensitized lipid peroxidation and apoptotic killing in 5-aminolevulinate-treated tumor cells overexpressing mitochondrial GPX4.
Free Radic. Biol. Med., 33: 1389-1402

58) Kriska, T., Korytowski, W. und Girotti, A.W. (2005): Role of mitochondrial cardiolipin peroxidation in apoptotic photokilling of 5-aminolevulinate-treated tumor cells.
Arch. Biochem. Biophys., 433: 435-446

59) Kroemer, G., Dallaporta, B. und Resche-Rigon, M. (1998): The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis.
Annu. Rev. Physiol., 60: 619-642

60) Lacombe, M.I. und Eberentz-Lhomme, C. (1983): Protoporphyrin IX activates the Mg dependent guanylate cyclase from rat liver plasma membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 116: 47-53

61) Laustriat, G. (1986): Molecular mechanisms of photosensitization.
Biochimie, 68: 771-778

62) Leveckis, J., Brown, N.J. und Reed, M.W.R. (1995): The effect of aminolaevulinic acid-induced, protoporphyrin IX mediated photodynamic therapy on the cremaster muscle microcirculation in vivo.
Br. J. Cancer, 72: 1113-1119

63) Lipson, R.L und Baldes, E.J (1960): The Photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. Arch. Dermatol., 82: 508-516

64) Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R. und Wang, X. (1996): Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. Cell 86: 147-157

65) Löffler, G., Petrides, P.E. und Heinrich, P.C. (2007): Biosynthese des Häms S. 608-611
In: Biochemie und Pathobiochemie 8. Auflage, Springer Verlag

66) Loh, C.S., Vernon, D., MacRobert, A.J., Bedwell, J., Brown, S.G. und Brown, S.B. (1993): Endogenous porphyrin distribution induced by 5-aminolaevulinic acid in the tissue layers of the gastrointestinal tract.
J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 20: 47-54

67) Makhlouf, G. und Murthy, K.S. (1997): Signal transduction in gastrointestinal smooth muscle. Cell. Signal., 9: 269-276

68) Malgaroli, A., Milani, D., Meldolesi, J. und Pozzan, T. (1987): Fura-2 Measurement of Cytosolic Free Ca^{2+} in Monolayers and Suspensions of Various Types of Animal Cells. Journal of Cell Biology, 105: 2145-2155.

69) McCloskey, K.D. (2010): Interstitial cells in the urinary bladder-localization and function. Neurourology and Urodynamics, 29: 82-87

70) Meissner, A. und Noack, Th. (2008): Proliferation of human lens epithelial cells (HLE-B3) is inhibited by blocking of voltage-gated calcium channels. Pflügers Archiv – Eur. J. Physiol., 457: 47-59

71) Messmann, H., Mlkvy, P., Buonaccorsi, G., Davies, C.L., MacRobert, A.J. und Bown, S.G. (1995): Enhancement of photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin photosensitisation in normal rat colon by threshold and light fractionation studies.
Br. J. Cancer, 72: 589-594

72) Messmann, H. (2000): 5-aminolevulinic acid-induced Protoporphyrin IX for the detection of gastrointestinal dysplasia.
Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am., 10: 497-512

73) Mikkelsen, E., Kazda, S. und Nyborg, N.C.B. (1985): Effects of light and Bay K 8644, a new 1,4-dihydropyridine, on mechanical responses of rat thoracic aorta. Acta pharmacol. et toxicol., 56: 126-132

74) Moan, J. (1986): Effect of bleaching of porphyrin sensitizers during photodynamic therapy. Cancer Letters, 33: 45-53

75) Moan, J. und Berg, K. (1992): Photochemotherapy of cancer: experimental research. Photochem. Photobiol., 55: 931-948

76) Mostwin, J.L. (1986): The action potential of guinea pig bladder smooth muscle. J. Urol., 135: 1299-1303

77) Nicotera, P., Bellomo, G. und Orrenius, S. (1990): The role of Ca^{2+} in cell killing. Chem. Res. Toxicol., 3: 484-494

78) Nyamekye, I., Anglin, S., McEwan, J., MacRobert, A., Bown, S. und Bishop, C. (1995): Photodynamic therapy of normal and balloon-injured rat carotid arteries using 5-amino-levulinic acid.
Circulation., 91: 417-425

79) Ördög, T. (2008): Interstitial cells of Cajal in diabetic gastroenteropathy. Neurogastroenterol. Motil., 20: 8-18

80) Oleinick, N.L., Morris, R.L. und Belichenko, I. (2002): The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how.
J. Photochem. Photobiol. Sci., 1: 1-21

81) Ozaki, H., Stevens, R.J., Blondfield, D.P., Publicover, N.G. und Sanders, K.M. (1991): Simultaneous measurement of membranopotential, cytosolic Ca^{2+} and tension in intact smooth muscles.
Am. J. Physiol., 260: C917-C925

82) Pai, M., Jamal, W., Mosse, A., Bishop, C., Bown, S. und McEwan, J. (2005): Inhibition of In-stent Restenosis in Rabbit Iliac Arteries with Photodynamic Therapy. Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg., 30: 573-581

83) Peng, Q., Moan, J. und Nesland, J.M. (1996): Correlation of subcellular and intramural photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. Ultrastruct. Pathol., 20: 109-129

84) Raab, O. (1900): Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. Zeitschrift für Biol., 39: 524–546

85) Ratcliffe, S.L. und Matthews, E.K. (1995): Modification of the photodynamic action of δ-aminolaevulinic acid (ALA) on rat pancreotoma cells by mitochndrial benzodiazepine receptor ligands.
Br. J. Cancer, 71: 300-305

86) Reed, M.W., Wieman, T.J., Schuschke, D.A., Tseng, M.T. und Miller, F.N. (1989): A comparison of the effects of photodynamic therapy on normal and tumor blood vessels in the rat microcirculation.
Radiat. Res., 119: 542-552

87) Ricchelli, F., Barbato,P., Milani, M., Gobbo, S., Salet, C. und Moreno, G. (1999): Photodynamic action of porphyrin on Ca^{2+} influx in endoplasmatic reticulum: a comparison with mitochondria.
Biochem. J., 338: 221-227

88) Rittenhouse-Diakun, K., Van Leengoed, H., Morgan, J., Hryhorenko, E., Paszkiewicz, G., Whitaker, J.E. und Oseroff, A.R. (1995): The role of transferrin receptor (CD71) in photodynamic therapy of activated and malignant lymphocytes using the heme precursor delta-aminolevulinic acid. J. Photochem. Photobiol., 61: 523-528

89) Russell, V.A., Lamm, M.C. und Taljaard, J.J. (1983): Inhibition of Na^+, K^+-ATPase activity by delta-aminolevulinic acid. Neurochem. Res., 8: 1407-1415

90) Sanders, K.M. (1996): A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. Gastroenterology, 111: 492-515

91) Sanders, K.M., Koh, S.D. und Ward, S.M. (2006): Interstitial cells of Cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. Annu. Rev. Physiol., 68: 307-343

92) Schramm, M., Thomas, G., Towart, R. und Fanckowiak, G. (1983): Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca^{2+} channels. Nature, 303: 535-537

93) Shahzidi, S., Stokke, T., Soltani, H., Nesland, J.M. und Peng, Q (2006): Induction of apoptosis by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy in human colon carcinoma cell line 320DM. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol., 25: 159-171

94) Smet, P.J., Jonavicius, J., Marshall, V.R. und De Vente J. (1996): Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves and identification of the cellular targets of nitric oxide in guinea-pig and human urinary bladder by cGMP immunohistochemistry. Neuroscience, 71: 337-348

95) Somlyo, A.P. und Somlyo, A.V. (2000): Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. J. Physiol., 522: 177-185

96) Star, W.M., Marijnissen, H.P., van den Berg-Blok, A.E., Versteeg, J.A., Franken, K.A. und Reinhold, H.S. (1986): Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers. Cancer Res., 46: 2532-2540

97) Stender, I.M., Lock-Anderson, J. und Wulf, H.C. (1999): Recalcitrant hand and foot warts successfully treated with photodynamic therapy with topical 5-aminolaevulinic acid: a pilot study. Clin. Exp. Dermatol., 24: 154-159

98) Stepien, H., Kunert-Radek, J., Stanisz, A., Zerek-Melen, G. und Pawlikowski, M. (1991): Inhibitory effect of porphyrins on the proliferation of mouse spleen lympohcytes in vitro. Biochem. Biophys. Res. Comm., 174: 313-322

99) Stummer, W., Novotny, A., Stepp, H., Goetz, C., Bise, K. und Reulen H.J. (2000): Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients. J. Neurosurg., 93(6): 1003-13

100) Sui, G.P., Rothery, S., Dupont, E., Fry, C.H. und Severs, N.J. (2002): Gap junctions and connexin expression in human suburothelial interstitial cells. BJU Int., 90: 118-129

101) Thomas, G., Chung, M. und Cohen C. J. (1985): A dihydropyridine (BayK 8644) that enhances calcium currents in guinea pig and calf myocardial cells. A new type of positive inotropic agent. Circ. Res., 56: 87-96

102) Torihashi, S., Horisawa, M. und Watanabe, Y. (1999): c-Kit immunoreactive interstitial cells in the human gastrointestinal tract.
J. Auton. Nerv. Syst., 75: 38-50

103) Tsien, R.Y. (1989): Fluorescent probes of cell signalling.
Ann. Rev. Neurosci., 12: 227-253

104) van der Veen, N., van Leengoed, H.L. und Star, W.M. (1994): In vivo fluorescence kinetics and photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin: increased damage after multiple irradiations.
Br. J. Cancer, 70: 867-872

105) van Hillegersberg, R., van den Berg, J.W., Kort, W.J., Terpstra, O.T. und Wilson, J.H. (1992): Selective accumulation of endogenously produced porphyrins in a liver metastasis model in rats.
Gastroenterology 103: 647-651

106) Verma, A., Nye, J. S. und Snyder, S.H. (1987): Porphyrins are endogenous ligands for the mitochondrial (peripheral-type) benzodiazepine receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 2256-2260

107) Verma, A. und Snyder, S.H. (1988): Characterization of porphyrin interactions with peripheral type benzodiazepine receptors.
Mol. Pharmacol., 34: 800-805

108) Verma, A., Facchina, S.L., Hirsch, D.J., Song, S.Y., Dillahey, L.F., Williams, J.R. und Snyder, S.H. (1998): Photodynamic tumor therapy: mitochondrial benzodiazepine receptors as a therapeutic target.
Mol. Med., 4: 40-45

109) von Tappeiner, H. (1900): Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab.
Münch. Med. Wochenschr., 47: 5

110) Waidelich, R., Stepp, H., Baumgartner, R., Weninger, E., Hofstetter, A. und Kriegmair M. (2001): Clinical experience with 5-aminolevulinic acid and photodynamic therapy for refractory superficial bladder cancer. J. Urol., 165: 1904-1907

111) Waldman, S.A., Sinacore, M.S., Lewicki, J.A., Chang, L.Y. und Murad, F. (1984): Selective activation of particulate guanylate cyclase by a specific class of porphyrins. J. Biol. Chem., 259: 4038-4042

112) Weishaupt, K.R., Gomer, C.J. und Dougherty, T.J. (1976): Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in cancer photoinactivation of murine tumor. Cancer Research, 36: 2326-2329

113) Wibberly, A., Chen, Z., Hu, E., Hieble, J.P. und Westfall, T.D. (2003): Expression and functional role of Rho-kinase in rat urinary bladder smooth muscle. Br. J. Pharmacol., 138: 757-766

114) Wuest, M., Hiller, N., Braeter, M., Hakenberg, O.W., Wirth, M.P. und Ravens, U. (2007): Contribution of Ca^{2+} influx to carbachol-induced detrusor contraction is different in human urinary bladder compared to pig and mouse. Eur. J. Pharmacol., 565: 180-189

115) Zaak, D., Sroka, R., Stocker, S., Bise, K., Lein, M., Höppner, M., Frimberger, D., Schneede, P., Reich, O., Kriegmair, M., Knüchel, R., Baumgartner, R. und Hofstetter, A. (2004): Photodynamic therapy of prostate cancer by means of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX- in vivo experiments on the dunning rat tumor model. Urol. Int., 72: 196-202

116) Zhou, CN. (1989): Mechanisms of tumor necrosis induced by photodynamic therapy. J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 3: 299-318

117) Zhu, Y und Huizinga, J.D. (2008): Nitric oxide decreases the excitability of interstitial cells of Cajal through activation of the BK channel.
J Cell. Mol. Med., 12: 1718-1727

Teile dieser Dissertation wurden bereits als Kongressvorträge, Poster und Abstracts veröffentlicht:

1) Noack, T., Hopp, H.-H., Knappe, U., Tiepolt, M., Kieckhaefer, C. und Jaborg, I. (2009): Effects of smooth muscle sensitized for light radiation with 5-aminolaevulinic acid and Bay K 8644.
Acta Physiologica, Vol. 195, Suppl. 669: 109

2) unveröffentlichter Vortrag XIV. Treffen der Ostseephysiologen 05/2009 in Greifswald: Untersuchung zur Lichtsensibilisierung der glatten Muskulatur.

3) Jaborg, I., Hopp, H.-H. und Noack, T. (2010): Intracellular calcium accumulation in smooth muscle during treatment with 5-aminolaevulinic acid and repetitive light radiation.
Acta Physiologica, Vol. 198, Suppl. 677: 73

4) Jaborg, I. und Noack, T. (2010): Light radiation induced photoactivation in smooth muscle by 5-ALA and Bay K 8644.
Trace Elements and Electrolytes, Vol. 27 - No.2: 98-99

5) Jaborg, I. und Noack, T. (2011): Functional changes of contractility by photoactivation of smooth muscle during treatment with 5-Aminolaevulinic acid and Bay K 8644.
Trace Elements and Electrolytes, Vol. 28 - No.2: 134-135

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Noack für die Überlassung des Themas sowie die Bereitstellung sämtlicher technischer und finanzieller Mittel.
Bedanken möchte ich mich weiterhin für seine ständige Diskussionsbereitschaft und die motivierende, persönliche Betreuung. Er brachte mir sehr viel Geduld entgegen und sorgte mit wertvollen Ratschlägen für das Gelingen der Arbeit.

Ferner gilt meine Dankbarkeit auch allen Mitarbeitern des Physiologischen Institutes der Universität Rostock. Hervorheben möchte ich Frau U. Mikkat, Frau K. Porath, Frau T. Sellmann und Herrn Dr. H.-H. Hopp.

Ein sehr herzlicher Dank gilt meinem Freund und meinen Eltern, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.
Ich habe keine Promotionsversuche an anderen Universitäten unternommen.
Es laufen keine Strafverfahren gegen mich.

.

Rostock, 10. Mai 2012 Imke Jaborg