

AUS DEM OSCAR-LANGENDORFF-INSTITUT DER PHYSIOLOGIE ROSTOCK

DIREKTOR: PROF. DR. KÖHLING

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG UND ZUM WIRKMECHANISMUS VON CAMPHER AUF DEN GLATTEN MUSKEL

- Magen und Portalvene der Ratte als Modellsysteme -

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER MEDIZIN

DER

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON

BIANCA BIELFELDT | GEB. AM 25.03.1993 IN EUTIN

AUS ROSTOCK

ERSTGUTACHTER: PROF.DR. THOMAS NOACK (UNIVERSITÄT ROSTOCK)

ZWEITGUTACHTER: PROF. DR. BURKHARD HINZ (UNIVERSITÄT ROSTOCK)

DRITTGUTACHTERIN: PROF DR. FRIEDERIKE STUMPF (HEALTH AND MEDICAL UNIVERSITY)

ROSTOCK | 08.03.2022

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004199

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	GLATTE MUSKULATUR	2
1.1.1	DIE AKTIVITÄT DES GLATTEN MUSKELS	2
1.1.2	MODULATION DER KONTRAKTILITÄT DES GLATTEN MUSKELS	3
1.1.3	PHASISCHE UND TONISCHE KONTRAKTIONEN GLATTER MUSKEL	5
1.1.4	SPANNUNGSABHÄNGIGE KALZIUMKANÄLE	6
1.1.5	EIGENSCHAFTEN VON KALIUMKANÄLEN DES GLATTEN MUSKELS	7
1.1.6	TRP-KANÄLE	8
1.1.7	EINFLUSS DES MEMBRANPOTENTIALS AUF DIE KONTRAKTION UND DIE OFFENWAHRSCHEINLICHKEIT VON SPANNUNGSABHÄNGIGEN KANÄLEN DES GLATTEN MUSKELS	9
1.2	CAMPHER ALS MEDIZINISCHER WIRKSTOFF	10
1.3	FRAGESTELLUNG UND METHODISCHER ANSATZ	11
2	MATERIAL UND METHODIK	12
2.1	LÖSUNGEN	12
2.1.1	PRÄPARIERLÖSUNG	12
2.1.2	KREBSLÖSUNG	12
2.1.3	ACETYLCHOLIN	13
2.1.4	DIE KALIUMREICHE LÖSUNG	13
2.1.5	CAMPHER	15
2.1.6	LEVCRUMAKALIM (BRL 38227): K_{ATP} -KANAL-ÖFFNER AN GLATTEN MUSKELN	16
2.1.7	GLIBENCLAMID (SULPHONYLHARNSTOFF)	16
2.2	ORGANBAD	17
2.2.1	PRÄPARATION	17
2.2.2	AUFBAU	18
2.2.3	MESSABLAUF	19
2.2.3.1	WIRKUNG VON CAMPHER AUF DEN GLATTEN MUSKEL	22
2.2.3.2	VERGLEICH DER WIRKUNG VON CAMPHER AUF VERSCHIEDENE ORGANE	22

2.2.3.3	WIRKMECHANISMUS VON CAMPHER AUF DEN GLATTEN MUSKEL	23
2.2.4	AUSWERTUNG	25
2.3	FLUORESZENZMIKROSKOPIE	27
2.3.1	FLUO-3: INDIKATOR FÜR KALZIUM.....	27
2.3.2	PRÄPARATION	27
2.3.3	FLUORESZENZBELADUNG.....	28
2.3.4	AUFBAU	29
2.3.4.1	ORGANBAD	29
2.3.4.2	KONFOKALES MIKROSKOP	30
2.3.5	BILDAUFNAHME DES FLUORESZENZSIGNALS	32
2.3.6	MESSABLAUF	32
2.3.7	AUSWERTUNG	33
2.4	STATISTIK	34
3	ERGEBNISSE	35
3.1	WIRKUNG VON CAMPHER AUF DEN GLATTEN MUSKEL	35
3.1.1	VERGLEICH DER ENANTIOMERE VON CAMPHER UND DEREN EINFLUSS AUF DEN GLATTEN MUSKEL DES MAGENANTRUM.....	35
3.1.2	UNTERSCHIEDLICHE WIRKSTÄRKEN VON RECHTSDREHENDEM CAMPHER AM GLATTEN MUSKEL.....	37
3.2	WIRKMECHANISMUS VON CAMPHER.....	47
3.2.1	VERGLEICH VON CAMPHER UND KALIUMKANALMODULATOREN	47
3.2.2	WIRKUNG VON CAMPHER BEI MEMBRANPOTENTIALVERSCHIEBUNG	51
3.2.3	WIRKUNG VON CAMPHER AUF DIE PORTALVENE BEI MODULATION VON EXTRAZELLULÄREM KALZIUM.....	55
3.2.4	WIRKUNG VON CAMPHER AUF DIE PORTALVENE BEI RÄUMLICH-ZEITLICHER DARSTELLUNG EINES INTRAZELLULÄREN KALZIUMSIGNALS MITTELS FLUORESZENZMIKROSKOPIE	57
4	DISKUSSION.....	60
4.1	DISKUSSION DER METHODIK	60
4.1.1	ORGANBADMETHODE.....	60
4.1.2	FLUORESZENZMIKROSKOPIE	62

4.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	64
4.2.1	WIRKUNG VON CAMPHER AUF DEN GLATTEN MUSKEL VERSCHIEDENER ORGANE	64
4.2.2	EINFLUSS VON CAMPHER AUF DEN GLATTEN MUSKEL DES GASTROINTESTINALTRAKTES	65
4.2.3	EINFLUSS VON CAMPHER AUF DEN GLATTEN MUSKEL DES KARDIOVASKULÄREN SYSTEMS	65
4.2.4	WIRKWEISE DER VERSCHIEDENEN ENANTIOMERE AUF DIE GLATTE MUSKULATUR	66
4.2.5	UNTERSCHIEDE DER HEMMUNG DES GLATTEN MUSKELS DURCH CAMPHER UND DURCH DIE HEMMUNG VON SCHRITTMACHERZELLEN	67
4.2.6	VERGLEICH ZWISCHEN DER WIRKUNG VON CAMPHER UND KALIUMKANALÖFFNERN SOWIE L-TYP KALZIUMKANALBLOCKERN	67
4.2.7	REVERSIBILITÄT DES WIRKEFFEKTES VON CAMPHER DURCH DIE TITRATION VON KALZIUM	69
4.2.8	MESSUNG VON INTRAZELLULÄREN KALZIUMKONZENTRATIONEN MITHILFE DER FLUORESZENZMIKROSKOPIE	70
4.2.9	DIE ROLLE VON TRP-KANÄLEN BEI DER AKTIVITÄT DES GLATTEN MUSKELS	71
4.3	KLINISCHE RELEVANZ	72
4.4	THESEN	74
5	ZUSAMMENFASSUNG	75
6	LITERATURVERZEICHNIS	76
7	LEBENS LAUF FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.	
8	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	84

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: (+)-Campher (links) und (-)-Campher (rechts) in Fischer-Projektion.....	15
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Präparation der Portalvene (links) und des Antrumpräparates (rechts).....	17
Abbildung 3: Schematischer Versuchsaufbau des Organbades (modifiziert nach Golenhofen, 1983).....	19
Abbildung 4: Schematische Darstellung zur allgemeinen Versuchsdurchführung der Organbadmethode.....	21
Abbildung 5: Darstellung zur Auswertung der phasischen Kontraktion eines glatten Muskels.	26
Abbildung 6: Schematische Darstellung zur Fixation der Portalvene zur Fluoreszenzmikroskopie.	28
Abbildung 7: Schematischer Versuchsaufbau des Organbadteils der Fluoreszenzmikroskopie.	29
Abbildung 8: Schematischer Versuchsaufbau der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie.	31
Abbildung 9: Originalaufzeichnung zur Versuchsdurchführung der Wirkung von Campher auf den Fundus des Magens.	38
Abbildung 10: Originalaufzeichnung zur Versuchsdurchführung der Wirkung von Campher auf das Antrum des Magens.	39
Abbildung 11: Originalaufzeichnung zur Versuchsdurchführung der Wirkung von Campher auf die Portalvene.....	41
Abbildung 12: Dosis-Wirkungsbeziehung der Inhibition von (+)-Campher auf die Durchschnittskraft der Portalvene (links) und des Magenantrum (rechts) unter Voraktivierung von $3 \cdot 10^{-7}$ M ACh.....	44
Abbildung 16: Originalaufzeichnung zur Konzentrationsreihe von BRL 38227 mit anschließender Applikation von Glibenclamid bei $K^+ = 20$ mM.....	48
Abbildung 17: Originalaufzeichnung zur Konzentrationsreihe von (+)-Campher mit anschließender Applikation von Glibenclamid bei $K^+ = 20$ mM.....	49
Abbildung 18: Originalaufzeichnung zur Konzentrationsreihe von BRL 38227 bei einer Kaliumkonzentration von 80 mM auf die Portalvene.	50
Abbildung 19: Originalaufzeichnung zur Konzentrationsreihe von (+)-Campher bei einer Kaliumkonzentration von 80 mM.....	51
Abbildung 13: Originalaufzeichnung zur Konzentrationsreihe von Kalium ohne Campher. ..	52
Abbildung 14: Originalaufzeichnung zur Konzentrationsreihe von Kalium bei einer Konzentration von Campher bei $5 \cdot 10^{-4}$ M.	53

Abbildung 15: Vergleich der Durchschnittskraft der Portalvene mit und ohne 10^{-4} M Campher unter verschiedenen Kaliumkonzentrationen.....	54
Abbildung 20: Wirkung von Campher auf das Magenantrum bei Modulation von extrazellulärem Kalzium.....	55
Abbildung 21: Wirkung von Campher auf die Portalvene bei Modulation von extrazellulärem Kalzium.....	56
Abbildung 22: Wirkung von Campher auf die Portalvene bei räumlich-zeitlicher Darstellung von intrazellulären Kalziumsignalen mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	57
Abbildung 23: Vergleich der Kalziumsignale der Portalvene mit und ohne Campher in der Konzentration $5 \cdot 10^{-4}$ M.	58
Abbildung 24: Vergleich: Inhibition der L-Typ-Kalzium-Kanäle durch Cicletanin ⁷⁴	69

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zusammensetzung der Elektrolytkonzentration der Präparierlösung in mM	12
Tabelle 2: Zusammensetzung der Elektrolytkonzentration der physiologischen Krebslösung in mM	12
Tabelle 3: Zusammensetzung kaliumreicher Lösung ($K^+ = 20 \text{ mM} \triangleq -41 \text{ mV}$, s. Tabelle 5). 14	
Tabelle 4: Zusammensetzung von kaliumreicher Lösung ($K^+ = 118 \text{ mM} \triangleq -10 \text{ mV}$, s. Tabelle 5) und kaliumarmer Lösung ($K^+ = 1,2 \text{ mM} \triangleq -70 \text{ mV}$, s. Tabelle 5)	14
Tabelle 5: Ermitteltes Membranpotential unter verschiedenen Kaliumkonzentrationen durch die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung errechnet.....	24
Tabelle 6: Schematische Darstellung zur Versuchsdurchführung der Messung vom Einfluss von Campher auf die Portalvene mittels Fluoreszenzmikroskopie.	33
Tabelle 7: Durchschnittliche Wirkung verschiedener Konzentrationen von (+)-Campher auf die Aktivität des glatten Muskels des gastrischen Antrum unter Voraktivierung mit 20mM kaliumreicher Lösung.....	36
Tabelle 8: Durchschnittliche Wirkung verschiedener Konzentrationen von (-)-Campher auf die Aktivität des glatten Muskels des gastrischen Antrum unter Voraktivierung mit 20mM kaliumreicher Lösung.....	36
Tabelle 9: Durchschnittliche Wirkung verschiedener Konzentrationen von (+)-Campher auf die Aktivität des glatten Muskels des gastrischen Antrum unter Voraktivierung mit $3 \cdot 10^{-7}$ M Acetylcholin.	40
Tabelle 10: Durchschnittliche Wirkung verschiedener Konzentrationen von (+)-Campher auf die Aktivität des glatten Muskels des gastrischen Antrum unter Voraktivierung mit $3 \cdot 10^{-7}$ M Acetylcholin.	42

Tabelle 11: Vergleich der ED ₅₀ von Campher auf die Durchschnittskraft verschiedener glatter Muskelpräparate unter verschiedenen Voraktivierungen.....	45
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACh	Acetylcholin
AM-E	Acetoxymethylester
ANOVA	Analysis of variance
Ca ²⁺	Kalzium
Cl ⁻	Chlorid
Diacylglycerol	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
ICC	interstitielle Zellen von Cajal
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP ₃ R	Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor
K ⁺	Kalium
K20-Lösung	Krebslösung mit einer Kaliumkonzentration von 20 mM
PMCA	Kalzium-ATPasen der Zellmembran
SERCA	Kalzium-ATPasen des sarkoplasmatischen Retikulums
K _{ATP} -Kanäle	ATP-sensitive Kaliumkanäle
LTCC	L-Typ-Kalziumkanäle
MLC ₂₀	die leichte Kette von Myosin
MLCK	Myosinleichtkettenkinase
NA	Noradrenalin
Na ⁺	Natrium
ROI	Region of Interest
RYR	Ryanodinrezeptor
S.E.M.	Standard Error of the Mean
TRP-Kanäle	„transient receptor potential“-Kanäle
TTCC	T-Typ-Kalziumkanäle

1 EINLEITUNG

Die glatte Muskulatur des menschlichen Körpers ist essentiell für die Regulation verschiedener Organfunktionen. Sie moduliert beispielsweise den Blutdruck, die Magen- und Darmmotilität, den Atemfluss sowie das scharfe Sehen.

Von besonderem pharmakologischem Interesse sind die Funktion und Regulation der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltraktes und des kardiovaskulären Systems. Pathologien des Gastrointestinaltraktes werden häufig durch Motilitätsstörungen verursacht. Motilitätsstörungen bewirken Beschwerden wie Spasmen, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoen und Maldigestion. Im vaskulären System äußern sich Motilitätsstörungen durch pathologische Veränderungen des Blutdrucks und deren Folgen wie Durchblutungsstörungen, Schwindel und Synkopen sowie Aneurysmen und Schlaganfälle.¹

Naturstoffe erlangen in der Bevölkerung immer stärkere Beliebtheit, da sie in der Öffentlichkeit als ungefährlicher und komplikationsärmer als synthetisch hergestellte Pharmaka angesehen werden.² Campher, gewonnen aus dem Baum *Cinnamomum Camphora*, ist ein wichtiges medizinisches Naturprodukt, das seit Jahrhunderten in verschiedensten Anwendungsbereichen eingesetzt wird. Früher wurde Campher besonders bei kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt, jedoch hat der Naturstoff durch neuere Therapeutika in dem Bereich an Bedeutung verloren. Heutzutage findet der Wirkstoff vor allem im respiratorischen System sowie in Form von Cremes und Salben zur lokalen Analgesie oder Kühlung Anwendung.^{1,3,4}

Trotz der großen Vielfalt des Wirkspektrums Camphers sind viele Aspekte der potenziellen Wirkungsweise unerforscht, wie etwa der genaue Einfluss von Campher auf die glatte Muskulatur. In der Arbeitsgruppe von Noack et al. konnte mithilfe von Kraftmessungen verschiedener Arterien im Organbad die These aufgestellt werden, dass Camphenol eine starke Hemmung der Vasomotion verschiedener arterieller und venöser Gefäße bewirkt.^{5,6}

In dieser Arbeit wurde die Wirkung und Wirkweise von Campher auf den glatten Muskel an Modellsystemen des vaskulären und gastrointestinalen Systems der Ratte mittels Organbadmethode und Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Im Folgenden werden zunächst die Kontraktion und Regulation der Kontraktilität des glatten Muskels sowie bekannte Aspekte der Wirkweise von Campher auf den glatten Muskel beschrieben.

1.1 GLATTE MUSKULATUR

Die glatte Muskulatur ist in verschiedenen Organen des Körpers zu finden, beispielsweise dem vaskulären System, dem Gastrointestinaltrakt, den Atemwegen und dem Urogenitaltrakt. Eine Kontraktion des glatten Muskels erfolgt durch eine Verkürzung seiner Muskelzellen. In schlauchförmigen Organen führt dies zur Verkleinerung des Radius und dadurch zur Regulation der Flussgeschwindigkeit im Lumen des Organs. Somit spielt der glatte Muskel von der Fortleitung und Speicherung des Speisebreis im Verdauungstrakt bis hin zur Regulation des Blutkreislaufes eine wichtige Rolle. Weitere Aufgaben der glatten Muskulatur sind das Aufrichten der Haare auf der Haut sowie die Fokussierung und die Regulation des Lichteinfalls im Auge.

Um den verschiedenen Aufgaben, die der glatte Muskel erfüllen muss, gerecht zu werden, besitzt er in unterschiedlichen Organen oder Organabschnitten verschiedene Kontraktionsformen. Dementsprechend ist der Entnahmeort des glatten Muskels für die Kontraktilität, Reagibilität und Rhythmizität des Gewebepreparates entscheidend.⁷

1.1.1 DIE AKTIVITÄT DES GLATTEN MUSKELS

Kalzium spielt sowohl bei der Kontraktion als auch der Relaxation des glatten Muskels eine entscheidende Rolle. Eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration führt zur Kontraktion und beeinflusst die Dauer der Kontraktion. Ein Abfall der intrazellulären Kalziumkonzentrationen reguliert die Relaxation des glatten Muskels.

Mechanismen, die eine zytosolische Kalziumkonzentrationserhöhung bewirken, können extrazellulärer und intrazellulärer Genese sein. Der primäre Mechanismus zur Konzentrationserhöhung ist eine Öffnung von L-Typ-Kalziumkanälen, bewirkt durch die Depolarisation der glatten Muskelzelle durch ein Aktionspotential. Dadurch kommt es zu einem Einstrom extrazellulären Kalziums in die Muskelzelle. L-Typ-Kalziumkanäle sind darüber hinaus für den myogenen Tonus des glatten Muskels verantwortlich.

Weiterhin bewirken Botenstoffe wie Acetylcholin (ACh) und Noradrenalin (NA) die Aktivierung einer Signalkaskade zur Freisetzung von Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃). Das freigesetzte IP₃ aktiviert die am sarkoplasmatischen Retikulum befindlichen Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptoren (IP₃R). Zusätzlich werden dort Ryanodinrezeptoren (RyR) durch das eingeströmte zytosolische Kalzium aktiviert. Durch die Aktivierung der beiden Rezeptoren erfolgt eine Freisetzung intrazellulären Kalziums aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Zytosol.^{8,9} Zu Beginn einer Kontraktion bindet das zytosolische Kalzium an Calmodulin, wodurch die katalytische Untereinheit der Myosinleichtkettenkinase (MLCK) aktiviert wird und die leichte

Kette von Myosin (MLC₂₀) phosphorylieren kann. Aufgrund dieser Phosphorylierung wird die Myosin-ATPase durch den Gegenspieler Aktin, ein dünnes Filament des glatten Muskels, aktiviert. Myosin und Aktin schieben sich nun übereinander und es kommt zu einer Kontraktion der Muskelzelle.^{8,10}

Ein Abfall der intrazellulären Kalziumkonzentration führt zur Inaktivierung der MLCK und zur Dephosphorylierung der MLC₂₀ durch die Myosinleichtketten-Phosphatase. Dadurch wird die Myosin-ATPase inaktiviert. Aufgrund des komplexen Mechanismus der Kontraktion des glatten Muskels kommt es zu Verzögerungen von 300 ms nach dem zytoplasmatischen Anstieg der Kalziumkonzentration bis zur Kontraktion.^{8,10}

Eine gute Übersicht zur Kontraktion und Relaxation des glatten Muskels sowie deren kanalikulären Mechanismen bieten die Arbeiten von Somylo und Somylo, sowie Amberg und Navedo.^{8,11}

1.1.2 MODULATION DER KONTRAKTILITÄT DES GLATTEN MUSKELS

Die Kontraktion des glatten Muskels kann durch verschiedene inhibitorische oder erregende Mechanismen reguliert werden. Diese Modulation der Kontraktion erfolgt auf myogener, mechanischer, neurogener oder humoraler Ebene, oder mithilfe von freigesetzten Metaboliten und Substanzen.

Veränderungen des Membranpotentials des glatten Muskels bewirken über die sogenannte elektromechanische Kopplung eine Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Eine Depolarisation des glatten Muskels kann spannungsabhängige Kalziumkanäle öffnen und somit über eine Erhöhung des zytoplasmatischen Kalziums eine Kontraktion hervorrufen. Diese elektromechanische Kopplung kann pharmakologisch direkt mit Kalziumkanalblockern oder indirekt mit Kaliumkanalöffnern inhibiert werden, was unter anderem eine wichtige Rolle in der Behandlung von Bluthochdruck spielt.¹²

Myogen wird der glatte Muskel durch Aktionspotentiale reguliert, die von sogenannten Schrittmacherzellen autark generiert werden. Diese sogenannten basalen organspezifischen Rhythmen bilden die Grundlage für die Magenperistaltik, die Blutdruckrhythmik und die Segmentationsrhythmik des Dünndarms. Im Magen-Darm-Trakt werden periodische myogene Rhythmen vor allem von den interstitiellen Zellen von Cajal (ICCs) gebildet.^{9,13} Cajalzellen sind modifizierte Muskelzellen mit synzytialen Charakter.¹⁴ Die phasische Muskulatur bildet eine funktionelle Einheit. Das heißt, dass nebeneinanderliegende Muskelzellen durch Aktionspotentiale, die sich entlang dieser Muskelzellen schnell ausbreiten, ein koordiniertes Kontraktionsmuster aufweisen.^{12,15–17} Die Schrittmacherzellen besitzen einen zytosolischen Oszillator, der ein repetitives Kalziumsignal auslöst. Diese Kalziumpulsationen bewirken

Depolarisationen der Muskelzellen durch einen primären extrazellulären Kalziumeinstrom, der meist ligandengesteuert ausgelöst wird. Das Signal der Depolarisation wird über Gap Junctions an benachbarte Zellen weitergeleitet.

Bei einer Depolarisation der glatten Muskulatur über ICCs werden zusätzlich der RYR und der IP_3R des sarkoplasmatischen Retikulums aktiviert. Dies führt zu einem Ausstrom von Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Zytosol der glatten Muskelzellen. Wird ein gewisses Schwellenpotential erreicht, öffnen sich die spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanäle, die ein Aktionspotential auslösen und zu einer Kontraktion des glatten Muskels führen.^{9,17,18} Im Anschluss werden Kalzium-ATPasen, die an der Zellmembran (PMCA) oder am sarkoplasmatischen Retikulum (SERCA) sitzen, aktiviert. Dies führt zu einem Kalziumausstrom und zur Auffüllung von intrazellulären Kalziumspeichern sowie zur Relaxation des glatten Muskels. Bei synchronisierten Oszillationen von Zellverbänden entsteht so eine phasische Muskelaktivität. Dieser Schrittmachermechanismus wird besonders von Neurotransmittern und Hormonen beeinflusst. Zusätzlich kommunizieren die ICCs mit Nervenzellen, von denen sie beeinflusst werden.^{9,19}

Über „Hot spots“ werden einzelne Areale, in denen sich die Cajalzellen befinden, zeitgleich angesteuert. Dies führt zur zeitgleichen, koordinierten Kontraktion.^{13,19,20} Dieser Mechanismus der Cajalzellen lässt sogenannte „slow waves“, also rhythmische Kontraktionen des glatten Muskels im Sekunden- bzw. Minutenrhythmus entstehen.

Neurotransmitter und Hormone erfüllen verschiedene Funktionen und tragen teilweise zu unterschiedlichen Wirkweisen der glatten Muskulatur bei.⁹ Sie binden an spezifische Rezeptoren, die durch nachgeschaltete intrazelluläre Signalkaskaden aktivierend oder inhibitorisch wirken.

Transmitter des vegetativen Nervensystems, wie Noradrenalin und Acetylcholin, haben einen regulierenden Einfluss auf den Tonus und die phasische Aktivität des glatten Muskels. Acetylcholin führt zu einer Bildung von IP_3 und Diacylglycerol (DAG), wodurch es zu einer Aktivierung von Kalziumoszillatoren im glatten Muskel und somit dort zu einer verstärkten Kontraktion kommt.⁷

Eine Freisetzung von DAG hemmt die Myosinphosphatase und führt so zu einer erhöhten Ansprechbarkeit der Myosinfilamente auf Kalzium, was in einer Erhöhung der Kontraktionskraft resultiert. IP_3 bindet weiterhin an den IP_3 -Rezeptor des sarkoplasmatischen Retikulums und führt so zu einer Ausschüttung von intrazellulären Kalziumspeichern in das Zytosol des glatten Muskels.

Besonders durch die Autoregulation von Arteriolen ist die mechanische Modulation der Aktivität des glatten Muskels bekannt. Bei mechanischer Dehnung kommt es zu einer erhöhten Depolarisation von Schrittmacherzellen. Das erhöht die Aktionspotentialfrequenz, wodurch eine stärkere Kontraktion entsteht. Dieser Effekt wird auch Bayliss-Effekt genannt.^{7,21–23}

Beim glatten Muskel anderer Organe kann eine Dehnung bei einem anfänglichem Spannungsanstieg eine Stressrelaxation bewirken, sodass der Muskel auch im gedehnten Zustand vollkommen entspannt ist.²²

Die glatte Muskulatur im Gastrointestinaltrakt wird zusätzlich durch das Darmnervensystem innerviert. Es übernimmt Teile der Koordination und Regulation der Motilität des glatten Muskels des Magen-Darm-Traktes und kontrolliert darüber hinaus die Durchblutung des Magen-Darm-Traktes. Das enterische Nervensystem unterteilt sich anatomisch in zwei Plexus, den Plexus myentericus (Auerbach) und den Plexus submucosus (Meissner).¹² Die Nerven der Plexus sind direkt an den ICCs der glatten Muskulatur anliegend, wodurch die Motilität über den myogenen Tonus gesteuert und kontrolliert werden kann.

1.1.3 PHASISCHE UND TONISCHE KONTRAKTIONEN GLATTER MUSKEL

Vaskulär und gastrointestinal werden hauptsächlich zwei Typen von glatter Muskulatur anhand ihrer Kontraktion unterschieden: die tonische und die phasische Muskulatur.

Die Kontraktion tonischer und phasischer glatter Muskulatur basiert auf dem Mechanismus der Depolarisation der Zellmembran, um eine zytosolische Erhöhung der Kalziumkonzentration hervorzurufen. Diese Depolarisation kann durch Neurotransmitter oder zytosolische Kalziumoszillatoren induziert werden.^{24,25}

Die phasische Muskulatur ist spontan aktiv und kontrahiert schnell und transient durch spasmogene Stimuli. Sie erzeugt ihre Spontanaktivität durch bestimmte Schrittmacherzellen, wie die interstitiellen Cajalzellen. Schrittmacherzellen unterscheiden sich besonders elektrophysiologisch von anderen glatten Muskelzellen, da sie durch zytosolische Kalziumoszillatoren periodische Kalziumpulsationen an der Zellmembran generieren. Die dadurch entstehenden Membrandepolarisationen werden zu den weiteren glatten Muskelzellen über Gap Junctions weitergeleitet. Dadurch entstehen Spikesalven, die bei phasischer Muskulatur zu rhythmischen Kontraktionen führen. Diese sogenannten basalen organspezifischen Rhythmen bilden die Grundlage für die Magenperistaltik, die Blutdruckrhythmik und die Segmentationsrhythmik des Dünndarms. So kann eine rhythmische fortlaufende Kontraktion, wie die Peristaltik im Gastrointestinaltrakt oder die Vasomotion, generiert werden.^{15,26}

Die tonische glatte Muskulatur kontrahiert langsam und anhaltend.^{15,26} Die Kontraktion des tonischen glatten Muskels vollzieht sich im Gegensatz zur phasischen Muskulatur in mehreren kleinen Einheiten. Diese Motor Units können graduelle Änderungen im Membranpotential hervorrufen und somit graduelle Änderungen des Muskeltonus verursachen.¹⁵ Eine Fortleitung

der Aktivität erfolgt hier nicht. Die tonische Muskulatur ist zum Beispiel in großen Arterien und Venen vertreten.^{15,26}

Verschiedene Arbeiten haben darauf hingewiesen, dass die ATPase der phasischen Muskulatur durch verschiedene Isoformen von Myosin eine höhere Aktivität aufweist als in der tonischen Muskulatur. Dies führt zu einer schnelleren Relaxation des glatten Muskels.²⁷⁻²⁹ Zusätzlich ist typischerweise das sarkoplasmatische Retikulum in tonischer Muskulatur stärker ausgeprägt als in phasischer Muskulatur.¹⁶

Eine frühere Klassifizierung unterschied die Kraftaktivierung des glatten Muskels durch elektromechanische oder pharmakomechanische Kopplung. Jedoch ist heute evident, dass beide Arten der Muskulatur durch die jeweiligen Mechanismen beeinflusst werden können.^{15,30}

1.1.4 SPANNUNGSABHÄNGIGE KALZIUMKANÄLE

Der stärkste Ionenstrom im glatten Muskel, der ein Aktionspotential erzeugt, ist der Kalziumeinstrom, der durch spannungsabhängige Kalziumkanäle fließt.³¹ Hierbei werden hauptsächlich L-Typ-Kalziumkanäle (long lasting) und T-Typ-Kalziumkanäle (transient) unterschieden, wobei der L-Typ-Kalziumkanal in der Zellmembran des glatten Muskels anteilmäßig am stärksten exprimiert wird.³¹

Vaskuläre und viszerale L-Typ-Kalziumkanäle werden durch Depolarisation aktiviert, sind durchlässiger für Barium als für Kalzium, werden durch Kalziumkanalblocker inhibiert und werden durch langfristige Membrandepolarisation und eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration inaktiviert.³¹

L-Typ-Kalziumkanäle (LTCCs) gelten als primäre Mediatoren des myogenen Tonus von vaskulären und viszerale glatten Muskeln.^{8,21} Da spannungsabhängige LTCCs die vorherrschenden Vermittler des Kalziumeinstroms in den glatten Muskel sind, spielen sie eine Schlüsselrolle in der Modulation des myogenen Tonus. Durch eine Vielfalt an direkten und indirekten Regulationsmechanismen seiner Aktivität zeigt der L-Typ-Kalziumkanal eine erhebliche Auswirkung auf die muskuläre Reagibilität.²¹

LTCCs bilden nach Erzeugung des Aktionspotenzials den hauptsächlichsten Weg des Kalziumeinstroms in den glatten Muskel zur Generierung der Kontraktion. Sie besitzen einen Spannungssensor, eine kalziumpermeable Pore und regulatorische Einheiten. Sie halten den Tonus des vaskulären glatten Muskels aufrecht. Darüber hinaus sind LTCCs wichtige Ziele von Second Messengern und kinasegesteuerten Signalkaskaden. Modulationen der L-Typ-Kalziumkanalaktivität tragen so zur Aktivität von viszerale und vaskulären glatten Muskeln bei.²¹ L-Typ-Kalziumkanäle zeigen eine Upregulation bei der Entwicklung des Angiotensin II-induzierten Hypertonus.^{21,32}

Durch ihre Schlüsselrolle in der Kontraktion des glatten Muskels erfahren LTCCs ein besonderes Interesse in der Pharmakologie. Verschiedene Hypotonika, sogenannte Dihydropyridin-Antagonisten (Nifedipin, Isradipin, Nicardipin), hemmen den druckinduzierten Anstieg von intrazellulärem Kalzium. Sie sorgen dadurch für eine Relaxation des glatten Muskels und wirken somit inhibitorisch auf den arteriellen Grundtonus.^{8,21}

Anders als die LTCCs werden T-Typ-Kalziumkanäle (TTCCs) bereits durch niedrige Membrandepolarisationen geöffnet, besitzen Resistenzen gegenüber Dihydropyridin-Derivaten und zeigen eine rasche Inaktivierung.²¹ Es wird vermutet, dass die Aktivierung von TTCCs bei deutlich geringeren vaskulären Drücken und niedrigeren Membranspannungen zur Optimierung der Regulation des myogenen Tonus beiträgt.²¹ Zusätzlich wird auch eine Regulation der TTCCs durch Proteinkinasen beschrieben.^{33,34}

1.1.5 EIGENSCHAFTEN VON KALIUMKANÄLEN DES GLATTEN MUSKELS

Kaliumkanäle des glatten Muskels spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation und dem Erhalt des zellulären Membranpotentials. Im glatten Muskel sind insbesondere vier Gruppen vertreten: spannungsabhängige Kaliumkanäle, die in „delayed rectifier“- und transiente Kaliumkanäle unterschieden werden, kalziumabhängige Kaliumkanäle, „inward rectifier“-Kaliumkanäle sowie K_{ATP} -Kanäle.^{35,36}

Bei spannungsabhängigen Kaliumkanälen führt das gleiche Schwellenpotential wie bei Natriumkanälen zum Auslösen einer Aktivierung. Spannungsabhängige Kaliumkanäle des Typs „delayed rectifier“ aktivieren jedoch langsamer, sodass bei Depolarisation zunächst ein Aktionspotential ausgelöst wird und erst anschließend eine Öffnung von Kaliumkanälen erfolgt. Der daraus resultierende verzögerte Kaliumausstrom bewirkt eine Repolarisation der Zellmembran und damit die Beendigung des Aktionspotentials.^{31,37}

Transiente Kaliumkanäle sind schnell aktivierende und inaktivierende spannungsabhängige Kaliumkanäle. Durch ihr schnelles Ansprechverhalten modulieren sie vermutlich die Erregbarkeit des glatten Muskels.^{8,31,36,38}

Kalziumabhängige Kaliumkanäle werden durch Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration und der Depolarisation der Zellmembran aktiviert. Insbesondere in vaskulärer glatter Muskulatur führen sie so zu einer Gegenreaktion zu Depolarisationen und Vasokonstriktionen unterschiedlicher Genese.^{35,36,39,40}

„Inward rectifier“ des glatten Muskels sind hauptsächlich in Arteriolen und kleinen Arterien beschrieben. Die genaue Funktion des Kanals im glatten Muskel ist noch nicht vollständig erforscht. Es wird vermutet, dass „inward rectifier“ zum Ruhemembranpotential und zum Ruhetonus von Arterien und Arteriolen beitragen.^{31,35,36,36,41,42}

K_{ATP}-Kanäle spielen insbesondere in der glatten Muskulatur der Portalvene sowie des GI-Traktes eine wichtige Rolle. Sie zeigen Eigenschaften eines „inward rectifiers“, werden jedoch spannungsunabhängig rezeptorgesteuert (Adenosin, Somatostatin, Galanin) aktiviert.³¹ Die K_{ATP}-Kanäle des glatten Muskels werden außerdem durch verschiedene Metabolite bei ischämischen Zuständen im vaskulären Bereich aktiviert. Darüber hinaus können K_{ATP}-Kanäle mit Vasodilatoren über die Proteinkinasen PKA und PKG geöffnet und mit Vasokonstriktoren über die PKC geschlossen werden.⁴¹ Eine Öffnung der K_{ATP}-Kanäle führt zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran und somit zur Unterdrückung der Erzeugung von Aktionspotentialen.^{31,43} So können sie die Offenwahrscheinlichkeit von L-Typ-Kalziumkanälen verringern. Im GI-Trakt von Kaninchen wurde gezeigt, dass der K_{ATP}-Kanal-Öffner Cromakalim die Amplitude, Dauer und den maximalen Anstieg von sogenannten „slow waves“ des glatten Muskels reduziert, ohne Einfluss auf die Frequenz zu haben.^{31,41,43} Sulfonylharnstoffe wie Glibenclamid inhibieren geöffnete K_{ATP}-Kanäle.³⁶

1.1.6 TRP-KANÄLE

TRP-Kanäle oder „transient receptor potential“-Kanäle gehören zur Familie der Kationenkanäle mit Permeabilität für Kalzium- oder Magnesiumionen und weisen große Variabilität in ihrer Funktion auf. Die Kanäle spielen eine große Rolle in der Geschmackserkennung und der Sensorik, insbesondere zur Wärme- und Kälteempfindung. Die TRP-Kanäle werden in sechs Untergruppen eingeteilt.

Im glatten Muskel können einige TRP-Kanäle die Mechanosensibilität, die Kontraktion und das Membranpotential modulieren.^{21,44} Im Folgenden werden insbesondere die TRP-Kanäle beschrieben, bei denen ein Effekt durch Campher nachgewiesen wurde.

Der TRP-Kanal TRP-A1 besitzt vermutlich eine vasodilatative Komponente, jedoch wurde seine direkte Wirkung an glatter Muskulatur noch nicht nachgewiesen.^{45,46} Im Gastrointestinaltrakt wird durch den TRP-A1-Kanal hauptsächlich eine Ausschüttung von Serotonin durch enterochromaffine Zellen der Mukosa ausgelöst, was indirekt zur Förderung der Peristaltik führt.⁴⁶

Der TRP-V1-Kanal zeigte vasokonstriktive Eigenschaften im vaskulären glatten Muskel und vasorelaxierende Effekte in mesenterischen Arterien.⁴⁷

Der TRP-M8 Kanal wird in der vaskulären glatten Muskulatur exprimiert, über seine Funktion ist jedoch noch nicht viel bekannt.²¹ Es konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von TRP-M8-Kanälen zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt.^{48–50}

1.1.7 EINFLUSS DES MEMBRANPOTENTIALS AUF DIE KONTRAKTION UND DIE OFFENWAHRSCHEINLICHKEIT VON SPANNUNGSABHÄNGIGEN KANÄLEN DES GLATTEN MUSKELS

Die Potentialdifferenz des glatten Muskels ist entscheidend zur Generierung von Aktionspotentialen. Diese Potentialdifferenz ist abhängig von der Membranspannung und den intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen. Dabei ist das Gleichgewichtspotential des glatten Muskels besonders von der Permeabilität für und der Ionenkonzentration von Kalium abhängig.^{51,52}

Besonders hohen Einfluss auf die Polarisierung der Zellmembran haben die Elektrolyte Kalium (K⁺), Natrium (Na⁺) und Chlorid (Cl⁻). Um sich dem Gleichgewichtspotential einer Zelle mithilfe der Konzentrationen permeierender Ionen anzunähern, wird die Goldmann-Hodgkin-Katz-Gleichung, nach Davis Eliot Goldmann, Alan Lloyd Hodgkin und Bernard Katz benannt, verwendet. Dabei wird das Membranpotential mit verschiedenen intra- und extrazellulären Elektrolytkonzentration und der Permeabilität P angenähert. P ist der Quotient aus Diffusionskonstante und Membrandicke und leitet sich aus dem Fick'schen Diffusionsgesetz ab.⁵² Für die Permeabilität und Elektrolytkonzentrationen werden Werte aus Messungen am Magenfundus von Meerschweinchen der Arbeit Lammel et al. verwendet.⁵³

$$U_M = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_{Na}[Na]_a + P_{K}[K]_a + P_{Cl}[Cl]_i}{P_{Na}[Na]_i + P_{K}[K]_i + P_{Cl}[Cl]_a} \right)$$

FORMEL 1: GOLDMANN-HODGKIN-KATZ-GLEICHUNG

- U_M – Membranpotential
- R – universelle Gaskonstante
- T – Temperatur (Kelvin)
- F – Faraday-Konstante
- a – Außen
- i – Innen

1.2 CAMPHER ALS MEDIZINISCHER WIRKSTOFF

Campher als Naturstoff wird in der Regel aus dem Kampferbaum (*Cinnamomum Camphora*) destilliert, kann aber auch aus anderen Arten der Familie der Lorbeergewächse extrahiert werden. Darüber hinaus kann Campher auch synthetisch hergestellt werden.

Chemisch ist Campher ein bicyclisches, chirales Terpen. Die molare Masse von Campher beträgt 152,23 g.⁵⁴ In der natürlichen Form tritt Campher vor allem in seiner (+)-Form (rechtsdrehend) auf. Bei synthetischer Herstellung entsteht hauptsächlich die (-)-Form (linksdrehend). Die Enantiomere weisen unterschiedliche Toxizitäten auf, wobei die (+)-Form weniger toxisch ist als die (-)-Form oder das Racemat.⁵⁵

Campher wird seit Jahrhunderten vielseitig im medizinischen Bereich eingesetzt. Dadurch ist der Naturstoff von wissenschaftlichem Interesse und wurde in seiner Anwendung bereits ausführlich erforscht.

Der Wirkstoff hat einen vasodilatierenden⁵⁶, antitussiven⁵⁷, analgetischen^{58,59} und kühlenden⁶⁰ Effekt. Diese Wirkungen basieren auf der Modulation der Aktivität verschiedener TRP-Kanäle.^{61,62} Die analgetische Komponente wird durch eine Aktivierung von TRP-A1 herbeigeführt. Darüber hinaus sorgt Campher für eine Desensibilisierung von TRP-V1, wodurch der Effekt unterstützt wird.⁵⁸ Campher aktiviert den TRP-V3-Kanal, einen Kanal, der für die Wärmeempfindung eine Rolle spielt.⁵⁹ Auf den TRP-M8-Kanal hat Campher eine zweifache Wirkung, er wirkt aktivierend und inhibiert die Sensitivität des Kanals für Menthol.⁶² Eine gute Übersicht über Campher und seine Eigenschaften bietet die Arbeit von Zuccarini.¹

Lis-Balchin et al. haben Untersuchungen am glatten Muskel des Ileums des Meerschweines sowie am Skelettmuskel des Diaphragmas einer Ratte mit isoliertem N. phrenicus mithilfe von elektrischer Feldstimulation durchgeführt. Bei dieser Methode wird der Muskel über elektrische Impulse auf nervaler Ebene stimuliert. In den Experimenten konnte eine Verstärkung der gemessenen Zuckungen beider Muskeln bei Zuführen von Campher in den Konzentrationen $2 \cdot 10^{-5}$ M und $2 \cdot 10^{-4}$ M beobachtet werden.⁶³

In unserer Arbeitsgruppe zeigten Untersuchungen von Reyes et al. mittels Organbadmethode eine starke Relaxation der Aktivität glatter Muskeln des Kreislaufsystems bei Applikation von Camphenol, einem Arzneistoff, der Campher enthält.^{5,6}

Eine neue Studie von Valtanparast et al. erforschte die Eigenschaft von Campher, bei Intoxikation Krampfanfälle auszulösen.⁶⁴ An Schneckenneuronen induziert Campher epileptiforme Entladungen, gemessen mit der Patch-Clamp-Methode. Eine mögliche Erklärung von Valtanparast et al. ist, dass die Entladungen hauptsächlich über spannungsgesteuerte Kalium-Kanäle (delayed rectifier) erfolgen. Dadurch soll eine sekundäre Hochregulation des Kalziumeinstroms resultieren.⁶⁴

1.3 FRAGESTELLUNG UND METHODISCHER ANSATZ

Ziel dieser Arbeit ist, die allgemeine Wirkung von Campher auf die vaskuläre und viszerale glatte Muskulatur zu beschreiben. Darüber hinaus sollen Wirkunterschiede zwischen den Enantiomeren von Campher untersucht werden. Abschließend soll der genaue Wirkmechanismus von Campher ermittelt werden.

Bisher wurde die Wirkung von Campher hauptsächlich auf Kanalebene und durch elektrische Feldstimulation beschrieben.^{58,63,64} Die in dieser Arbeit angewandte Organbadmethode hingegen erlaubt es, die Wirkung von Campher auf die glatte Muskulatur verschiedener Organe in direkter Messung im Zellverband und im physiologischen Milieu zu ermitteln.

Durch die Untersuchung von Campher an Magenfundus, gastrischen Antrum und Portalvene konnte so die Wirkung des Naturstoffes auf das vaskuläre System und den Gastrointestinaltrakt getestet werden. Weiterhin konnten so Unterschiede zwischen tonischer und phasischer Muskulatur untersucht werden.

Mit der Organbadmethode wird *in vitro* die direkte Kontraktionskraft eines Muskelpräparates in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Hierzu wurden die Präparate voraktiviert. Eine Voraktivierung des glatten Muskels ermöglicht ein gleichmäßiges, reproduzierbares Kontraktionsmuster. Weiterhin werden zu messende Effekte von Wirkstoffen wie Campher mit einer Voraktivierung stärker hervorgehoben.

Die Voraktivierung des glatten Muskels erfolgte entweder über Acetylcholin oder kaliumreiche Lösung. Acetylcholin sorgt für eine Aktivierung des Muskels auf humoraler Ebene. Durch eine Voraktivierung mit kaliumreicher Lösung wird eine direkte Depolarisation der Zellmembran erzeugt.

Durch graduelle Verschiebung des Membranpotentials über Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration kann die Kontraktionsfähigkeit des glatten Muskels sowie die Reagibilität und die Offenwahrscheinlichkeit verschiedener Ionenkanäle beeinflusst werden. So können Schlüsse zum genauen Wirkmechanismus von Campher auf den glatten Muskel gezogen werden. Um sein Wirkmuster kategorisieren zu können, wurde Campher mit weiteren Wirkstoffen verglichen, deren Wirkmechanismen auf den glatten Muskel bereits bekannt sind. Eine mögliche Reversibilität der Wirkung von Campher wurde mittels Kalziumtitration im Organbad untersucht.

Weiterhin wurden mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie Änderungen der zytosolischen Kalziumkonzentration im glatten Muskel unter Einfluss von Campher gemessen. Hiermit konnte untersucht werden, ob die Wirkung von Campher eher durch eine direkte Verringerung der zytosolischen Kalziumkonzentration oder durch Änderungen der intrazellulären Kalziumsensibilität des glatten Muskels erklärt werden kann.

2 MATERIAL UND METHODIK

2.1 LÖSUNGEN

Sämtliche in den Versuchen verwendete Wirkstoffe wurden von Sigma Aldrich bezogen Als Träger der Wirkstoffe wurde, je nach ihrer Beschaffenheit, destilliertes Wasser, physiologische Kochsalzlösung, Ethanol oder Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Die Lösungen wurden jeweils unmittelbar vor den Versuchen angemischt. So konnte eine Veränderung der Wirkung durch etwaige Sedimentierung der gelösten Wirkstoffe vermieden werden.

2.1.1 PRÄPARIERLÖSUNG

Die Präparierlösung ist eine stabile Lösung, die während der Präparation der Muskelstreifen sowie zur Aufbewahrung und dem Transport der Organe und fertigen Präparate außerhalb der Versuche verwendet wurde. In der Präparierlösung können die jeweiligen Muskelpräparate über einen längeren Zeitraum bei kühlen Temperaturen gelagert werden. Die Kontraktionskraft des Muskels bleibt dabei gut erhalten. Dazu sind die Elektrolytkonzentrationen der Präparierlösung einem physiologischen Milieu nachempfunden, ohne dass, wie bei der Krebslösung, eine spezielle Begasung zum Erhalt der Kontraktionskraft des glatten Muskels benötigt wird.

Substanz	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻
[mmol/l]	144	5,9	3,7	157

TABELLE 1: ZUSAMMENSETZUNG DER ELEKTROLYTKONZENTRATION DER PRÄPARIERLÖSUNG IN MM

2.1.2 KREBSLÖSUNG

Substanz	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	Glucose
[mmol/l]	137	5,9	2,5	1,2	124	25	1,2	11,5

TABELLE 2: ZUSAMMENSETZUNG DER ELEKTROLYTKONZENTRATION DER PHYSIOLOGISCHEN KREBSLÖSUNG IN MM

Die Krebslösung ist eine physiologische Elektrolytlösung, in der sich das Präparat während des Versuchs im Organbad befindet, um das physiologische Milieu des glatten Muskels der Ratte zu simulieren. Somit kann eine beständige und langfristige Kontraktilität des Präparates gewährleistet werden. Zu den Versuchen muss die Lösung im Organbad auf eine Temperatur von ca. 38 °C erwärmt werden und stets mit Carbogen begast werden, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung und einen pH-Wert von 7,4 zu gewähren.⁶⁵ Die Krebslösung war die Grundlage aller Organbadversuche.

2.1.3 ACETYLCHOLIN

Zur Voraktivierung des glatten Muskels wurde einerseits Acetylcholin eingesetzt, welches eine transmittergesteuerte Aktivierung des glatten Muskels bewirkt, andererseits eine kaliumreiche Lösung von $K^+ = 20 \text{ mM}$ ($\triangleq -41 \text{ mV}$, s. Tabelle 5), welche durch eine Veränderung der Zusammensetzung der extrazellulären Elektrolytenkonzentrationen zu einer Depolarisation des Membranpotentials führt.^{66,67}

Acetylcholin (ACh, Molekulargewicht: 146,2 g/mol) wurde zur Voraktivierung des glatten Muskels durch das cholinerge System genutzt. Acetylcholin ist ein physiologischer Agonist von muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren und erhöht durch einen Anstieg des intrazellulären Kalziums die Kontraktilität des glatten Muskels.⁶⁷ Durch die Aktivierung des glatten Muskels mit Acetylcholin entsteht beim gastrischen Antrum und der Portalvene eine gleichmäßige phasische Kontraktion, beim Magenfundus eine verstärkte tonische Kontraktion. Dadurch wird für eine reproduzierbare Aktivität des Muskels gesorgt. Auf dieser Basis lässt sich die Wirkung einer Substanz auf die Kontraktilität des glatten Muskels gut mit einer Kontrolle (ohne zusätzliche Gabe von zu untersuchenden Wirkstoffen) vergleichen.

ACh wurde in den Konzentrationen von 10^{-8} bis 10^{-5} M im Organbad verwendet. Dafür wurde festes Acetylcholin in den Konzentrationen 10^{-5} bis 10^{-2} M in H_2O gelöst und zu den Versuchen direkt in das Organbad appliziert.

2.1.4 DIE KALIUMREICHE LÖSUNG

Für die verschiedenen Versuche wurde die Krebslösung so modifiziert, dass unter Erhalt der Isoosmolarität der Versuchslösung die Konzentration von Kalium verändert wurde. Dafür wurde bei Erhöhung der Kaliumkonzentration die Natriumkonzentration verringert.

Ein extrazelluläres Milieu mit erhöhter Kaliumkonzentration bei Isoosmolarität sorgt für eine Depolarisation der Zellmembran des glatten Muskels und erhöht somit die Erregbarkeit des glatten Muskels. Daher kann durch eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration die Erregungsschwelle des glatten Muskels herabgesetzt werden.^{66,67} Eine kaliumreiche Lösung (20 mM \triangleq -41 mV, s. Tabelle 5) sorgt beim glatten Muskel des Antrum pyloricum und der Portalvene für eine kontinuierliche regelmäßige phasische Aktivität, die während des Versuchs stabil bleibt. Der Magenfundus verstärkt in kaliumreicher Lösung seine tonische Kontraktion. Durch eine Voraktivierung der Präparate mit kaliumreicher Lösung wird eine Veränderung der Aktivität des glatten Muskels durch einen Wirkstoff besser sichtbar und reproduzierbar. Zur Voraktivierung der Präparate wurde dementsprechend eine Konzentration von $K^+ = 20$ mM (K20-Lösung) ausgewählt.

Substanz	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	Glucose
[mmol/l]	122,9	20	1,2	124	25	1,2	11,5

TABELLE 3: ZUSAMMENSETZUNG KALIUMREICHER LÖSUNG ($K^+ = 20$ mM \triangleq -41 mV, s. TABELLE 5)

Je nach Kaliumkonzentration im Organbad ändert sich das Membranpotential des glatten Muskels und somit seine Kontraktilität. Die Kaliumkonzentration in der Versuchskammer wurde durch Zugabe von kaliumarmer oder kaliumreicher Lösung verändert. Dafür wurden Lösungen mit Konzentrationen von $K^+ = 1,2$ mM (\triangleq -70 mV, s. Tabelle 5) und $K^+ = 118$ mM (\triangleq -10 mV, s. Tabelle 5), respektive, verwendet.

Substanz	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	Glucose
K-118-Lösung [mmol/l]	24,9	118	1,2	124	25	1,2	11,5
K-1-Lösung [mmol/l]	141,7	1,2	1,2	124	25	1,2	11,5

TABELLE 4: ZUSAMMENSETZUNG VON KALIUMREICHER LÖSUNG ($K^+ = 118$ mM \triangleq -10 mV, s. TABELLE 5) UND KALIUMARMER LÖSUNG ($K^+ = 1,2$ mM \triangleq -70 mV, s. TABELLE 5)

2.1.5 CAMPHER

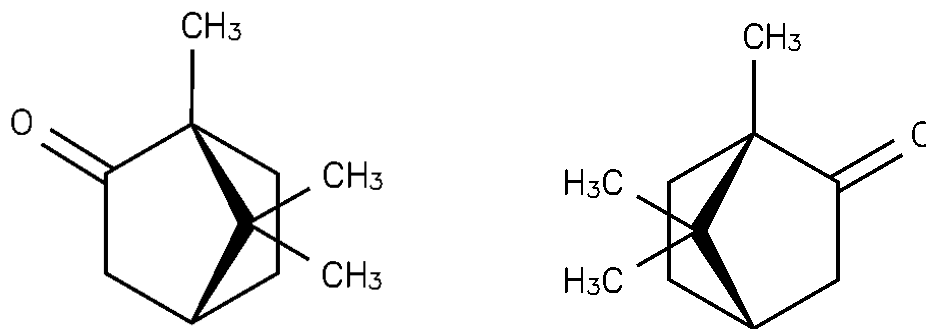


ABBILDUNG 1: (+)-CAMPHER (LINKS) UND (-)-CAMPHER (RECHTS) IN FISCHER-PROJEKTION.

Campher bildet ein bizyklisches Monoterpen-Keton und leitet sich formal von Bornan ab.

Für die Versuche wurden die Enantiomere (+)- und (-)-Campher (siehe Abbildung 1^{68,69}) (Molekulargewicht: 152,23 g/mol) genutzt.

Um die Wirkung von Campher auf den glatten Muskel quantitativ zu untersuchen, wurde eine aufsteigende Konzentrationsreihe von 10^{-6} M bis 10^{-3} M (im Organbad) hergestellt. Hierzu wurden, abhängig von der zu erreichenden Zielkonzentration, verschiedene Träger zum Lösen von Campher verwendet. Durch diese Verwendung verschiedener Träger konnte jeweils eine Veränderung der ursprünglichen Elektrolytkonzentrationen im Organbad minimiert werden.

In H_2O lässt sich Campher bis zu einer Konzentration von 10^{-2} M lösen. Um Konzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-5} M im Organbad zu erreichen, wurden 40 μ l Lösung (10^{-3} M bzw. 10^{-2} M) in das Organbad (40 ml Volumen) appliziert. Für die Konzentrationen von 10^{-4} M und 3×10^{-4} M im Organbad wurde Campher in der Konzentration 10^{-2} M in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Die Zielkonzentrationen wurden durch Applizieren von 400 μ l bzw. 1200 μ l dieser Lösung in das Organbad hergestellt. Durch die physiologische Kochsalzlösung als Trägerlösung wird ein hypotones Milieu in der Organbadkammer und eine mögliche Beeinträchtigung der Kontraktionskraft durch das Medium vermieden.

Für die höchsten Konzentrationen von 5×10^{-4} M und 10^{-3} M im Organbad wurde Campher in einer Konzentration von 1 M in DMSO gelöst. Von dieser Lösung wurden 20 μ l bzw. 40 μ l in das Organbad gegeben. Kontrollversuche zeigten, dass DMSO in diesen Konzentrationen keine Einwirkung auf die Kontraktionskraft des glatten Muskels besitzt.

2.1.6 LEVCROMAKALIM (BRL 38227): K_{ATP}-KANAL-ÖFFNER AN GLATTEN MUSKELN

Der Wirkstoff Levchromakalim dient in der Medizin als Vasodilatator und öffnet ATP-sensitive Kaliumkanäle des glatten Muskels. Der Wirkmechanismus von Campher auf den glatten Muskel wurde mit dem Wirkmechanismus von Levchromakalim verglichen. Der Wirkstoff wurde in der Konzentration 10^{-2} M in 70%igem Ethanol gelöst und weiter mit Wasser verdünnt, sodass Levchromakalim in resultierenden Konzentrationen von 10^{-8} M bis $3 \cdot 10^{-6}$ M in das Organbad pipettiert werden konnte. Möglichem Wirkeinfluss von Ethanol auf den glatten Muskel konnte so vorgebeugt werden.⁷⁰

2.1.7 GLIBENCLAMID (SULPHONYLHARNSTOFF)

Glibenclamid ist ein Antidiabetikum und zählt zu der Gruppe der Sulfonylharnstoffe. Es gilt als spezifischer Blocker von ATP-sensitiven Kaliumkanälen (K_{ATP}-Kanäle). Die Substanz hemmt die Wirkung von K_{ATP}-Kanal-Öffnern und sorgt somit für eine erhöhte Kontraktion des glatten Muskels sofern zuvor K_{ATP}-Kanäle im Grundzustand geöffnet wurden. Für die Versuche wurde Glibenclamid zu einer resultierenden Konzentration von 10^{-5} M in das Organbad pipettiert.

2.2 ORGANBAD

Die Organbadmethode ist eine *in-vitro*-Methode zur direkten Messung von Kontraktionskräften von Muskelpräparaten in physiologischem Milieu. Wirkstoffe können direkt in das Organbad (effektiv den Extrazellulärraum) appliziert werden, wodurch ein direkter Wirkeffekt dieser Stoffe auf die Aktivität des Muskelpräparats gemessen werden kann. Die Organbadmethode wurde genutzt, um eine direkte Wirkung von Campher auf den glatten Muskel verschiedener Organe auf multizellulärer Ebene zu messen. Weiterhin konnten so auch Messungen zur Ermittlung des genauen Wirkmechanismus von Campher auf den glatten Muskel durchgeführt werden.

2.2.1 PRÄPARATION

Zur Präparation wurden weibliche und männliche Ratten von der Art Wistar im Alter von 60-320 Tagen verwendet. Die Tiere wurden gemäß §4 TierSchG artgerecht getötet. Zunächst erfolgte eine Betäubung mit Ether, anschließend wurde die Ratte mithilfe einer Guillotine dekaptiert. Unmittelbar danach erfolgte die grobe Entnahme der jeweiligen Organe und deren Lagerung in gekühlter Präparierlösung zur Schonung der Muskelschichten. Die feine Präparation wurde unter einem Lichtmikroskop (Olympus SZ) durchgeführt.

Für die Antrumpräparate wurden halbzirkuläre, transversale, ca. 3x12 mm große Präparate am aboralen Teil des Magens geschnitten.

Zur Präparation des Magenfundus wurde longitudinal entlang der großen Kurvatur ein ca. 3 mm breites, 7-12 mm langes Teil des Magenfundus entnommen.

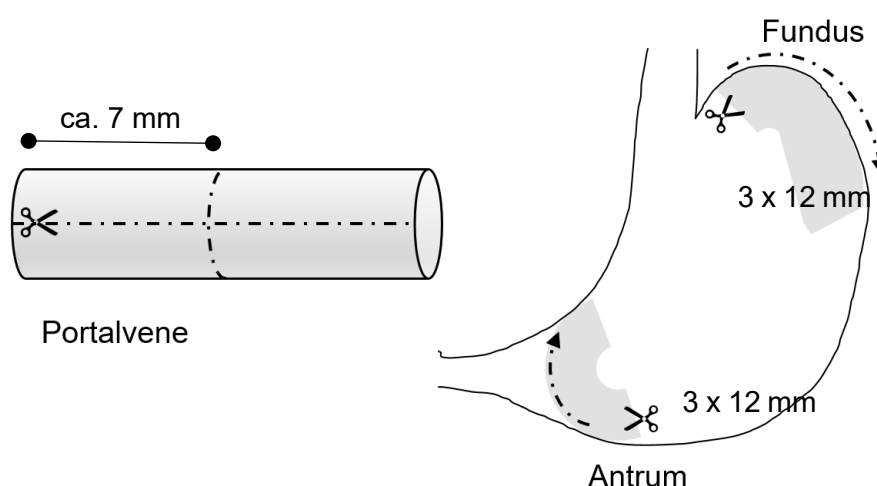


ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PRÄPARATION DER PORTALVENE (LINKS) UND DES ANTRUMPRÄPARATES (RECHTS).

Aus einer Portalvene konnten zwei Muskelpräparate gewonnen werden. Aus einem Magen konnten mehrere Präparate des gastrischen Antrum und des Magenfundus gewonnen werden.

Zur Präparation der Portalvene wurde zunächst das Muskelgewebe von Fett- und Bindegewebe an der Serosaseite freipräpariert und longitudinal eröffnet. Nach der Entfernung letzter Blutreste wurde die Portalvene in der Mitte quer geteilt. Aus einer Portalvene konnten so jeweils zwei Präparate in einer Größe von ca. 0,7 x 3 mm gewonnen werden.

2.2.2 AUFBAU

Im ersten Teil der Versuche wurden Messungen des glatten Muskels im Organbad durchgeführt. So konnten alle Reaktionen des glatten Muskels auf verschiedene Wirkstoffe unmittelbar beobachtet, gemessen sowie verglichen werden.

Das Organbad ist eine Vorrichtung, die aus zwei Kammern besteht. Eine Kammer dient als Vorratskammer, in der Lösungen für die Versuche vorbereitet werden können (Abbildung 3). Die andere Kammer ist die eigentliche Versuchskammer, in der sich das Präparat befindet. Beide Kammern wurden zu jeder Zeit auf eine Temperatur von 38°C erwärmt und mit Carbogen, einer Mischung aus 95% CO₂ und 5% O₂, begast. So konnte einerseits ein pH-Wert von 7,4 aufrechterhalten sowie eine Sauerstoffversorgung des Präparates garantiert werden. Die Versuchskammer kann mit bis zu 40 ml Lösung gefüllt werden und ist offen, wodurch bestimmte Wirkstoffe in geringen Mengen direkt in die Versuchskammer appliziert werden können.

Alle Muskelpräparate wurden mithilfe von Fäden an einem Ende kurz an einer gläsernen Hakenvorrichtung befestigt, am anderen Ende lang an einem isometrischen elektromechanischen Transducer. Der Transducer misst die Kontraktionskraft der jeweiligen Präparate und wandelt dieses Signal in ein elektrisches Signal um. Er wurde zu Beginn jeder Versuchsreihe geeicht. Weiterhin wurde im Anschluss die Vorspannung der jeweiligen Präparate über den verschiebbaren Transducer eingestellt.

Die gemessene Kraft der Präparate wurde mithilfe des PC-Programms *LabChart* von *ADInstruments* aufgezeichnet und ausgewertet.

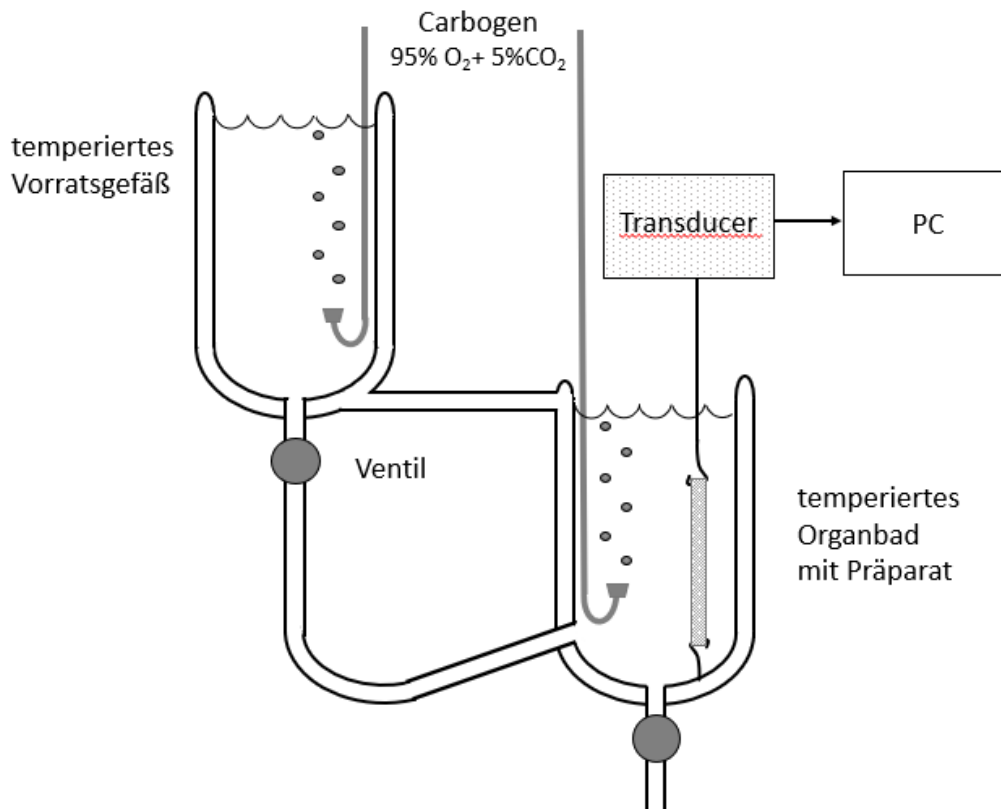


ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHER VERSUCHSAUFBAU DES ORGANBADES (MODIFIZIERT NACH GOLENHOFEN, 1983).

Das Organbad ist eine in-vitro-Methode und dient der unmittelbaren Messung von Änderungen der Kontraktionskraft des Muskelpräparates in Abhängigkeit von der Zeit. Mit Krebslösung wird ein annähernd physiologisches extrazelluläres Milieu für die Präparate geschaffen. Im Organbad ist eine direkte Applikation von Wirkstoffen möglich. So kann eine Reaktion des Präparates auf verschiedene Wirkstoffe in zeitlicher Abhängigkeit gemessen werden.

2.2.3 MESSABLAUF

Zunächst wurde die Wirkung von Campher auf den glatten Muskel ermittelt. Hierzu wurden die Kombinationen aus Enantiomeren, Organen und verschiedenen Voraktivierungen verglichen. Die Versuche zur Wirkung von Campher auf den glatten Muskel wurden mit der Organbadmethode durchgeführt. In allen Versuchen wurde auf eine einheitliche Arbeitsweise geachtet und Vorspannung, Ruhezeit und Applikationsintervalle der verschiedenen Wirksubstanzen konstant gehalten.

Zunächst wurden die Transducer mit einem Eichgewicht von 14,3 g ($\pm 14,3$ mN) geeicht und genullt, um vor jedem Versuch die gleichen Voraussetzungen zu haben. Danach wurden die

jeweiligen Präparate eingespannt und je nach Beschaffenheit und Art des Präparates auf 4-8 mN vorgespannt.

Zu Beginn des Versuches wurde das Präparat unter Vorspannung ca. 1,5 h im Organbad in Krebslösung inkubiert, um die Aktivierbarkeit des glatten Muskels zu gewähren. Typischerweise erzeugte das Muskelpräparat in dieser Ruhephase bereits eine gleichmäßige Spontanaktivität.

Zur Vitalitätskontrolle wurde Acetylcholin so in das Organbad appliziert, dass es in einer Konzentration von 10^{-6} M vorlag, was bei einem vitalen Muskel zu einer deutlichen Kontraktion führt. Diese Vitalitätskontrolle des glatten Muskels erfolgte für 10 min. Zusätzlich zur Vitalität des glatten Muskels konnte so getestet werden, ob ein typisches Kontraktionsmuster des Muskelpräparates erzeugt werden kann. Abnorme Kontraktionsmuster weisen auf Ungenauigkeiten der Präparation, eine verminderte Vitalität oder eine Pathologie des Präparates hin.

Nach der Vitalitätskontrolle wurde eine Spülung durchgeführt. Zu Beginn des Spülvorgangs wurde die Lösung in der Versuchskammer zweimal mit vorgewärmter und begaster Krebslösung aus der Vorratskammer ersetzt. Danach erfolgte in Abständen von jeweils 5 min ein dritter und vierter Austausch. Anschließend wurde eine 15-minütige Anpassungsphase des Präparates gewährleistet.

Für die Voraktivierung des Muskelpräparates für die jeweilige Versuchsreihe wurde nun die entsprechende Lösung in das Organbad appliziert. Bei einer Voraktivierung mit ACh wurde ein Konzentrat des Wirkstoffes so appliziert, dass ACh in der Organbadlösung in einer Konzentration von 3×10^{-7} M vorlag. Bei Voraktivierung mit kaliumreicher Lösung wurde die Lösung in der Versuchskammer mit einer bereits vorgefertigten physiologischen Lösung mit erhöhter Kaliumkonzentration ($K^+ = 20$ mM) ausgetauscht.

Um während der Versuchsreihe eine konstante und reproduzierbare Aktivität der Muskelpräparate zu erhalten, wurde nach Gabe der voraktivierenden Substanzen in die Kammer eine Inkubationszeit von 15 min (Voraktivierung mit ACh) bzw. 20 min (Voraktivierung mit kaliumreicher Lösung) eingehalten. Die jeweiligen Versuchsreihen begannen daraufhin mit der Applikation der zu untersuchenden Substanzen in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe in 10-Minuten-Schritten. Nach Ende jeder Versuchsreihe wurde das Präparat wie im bereits beschriebenen Spülprozess vierstufig gespült. Im Anschluss konnte eine weitere Versuchsreihe durchgeführt werden.

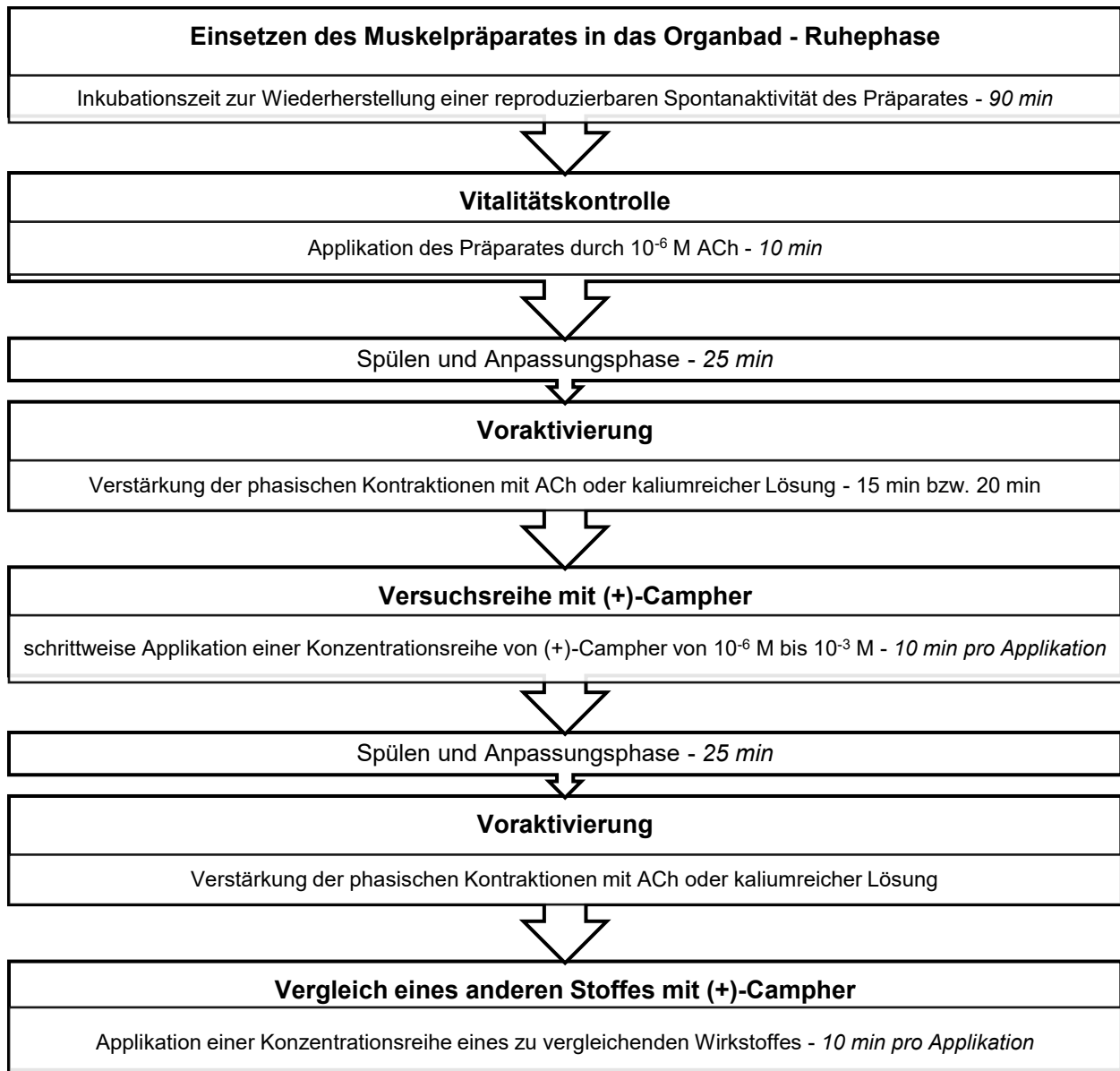


ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG ZUR ALLGEMEINEN VERSUCHSDURCHFÜHRUNG DER ORGANBADMETHODE.

Die Vitalitätskontrolle des glatten Muskels wurde vor Beginn des Versuchs nach dem Einsetzen des Präparates im Organbad durchgeführt. Danach erfolgte eine Spülung des Muskelpräparates und eine anschließende, der Versuchsreihe entsprechende, Voraktivierung. Nach erneuter Spülung erfolgte typischerweise ein Kreuzversuch. Bei mehreren Muskelpräparaten, die parallel die Versuchsreihen durchliefen, wurde parallel zuerst der vergleichende Wirkstoff appliziert und danach die Versuchsreihe mit (+)-Campher durchgeführt. Somit wurden Messfehler durch etwaige Erschöpfung der Präparate oder Einfluss des vorigen Stoffes auf die darauffolgende Versuchsreihe vermieden.

Da mit dem vierstufigen Spülprozess Campher und die anderen Substanzen gut auswaschbar waren, erfolgten einige Versuche über Kreuz. Dies ermöglichte, zwei Präparate in eigenen Organbadkammern und jeweils unterschiedlichen Versuchsbedingungen parallel zu beobachten und miteinander vergleichen zu können. Nach Ende der Versuchsreihe und adäquater Spülung konnten die jeweiligen Versuchsbedingungen getauscht werden, um einen reproduzierbaren Vergleich zweier Präparate unter gleichen Bedingungen zu erhalten. Diese Kreuzversuche wurden zum direkten Vergleich von Enantiomeren, zwei verschiedenen Wirkstoffen oder Kontrollen genutzt.

Da bis zu acht Organbäder zur Verfügung standen, konnten bis zu acht Versuche gleichzeitig durchgeführt werden.

2.2.3.1 WIRKUNG VON CAMPHER AUF DEN GLATTEN MUSKEL

Zu untersuchen war ein potentieller Wirkunterschied zwischen den beiden Enantiomeren von Campher sowie der Einfluss von Campher auf unterschiedliche Muskelgewebe verschiedener Organe. Dazu wurden Muskelpräparate der Ratte aus Magenfundus und Magenantrum sowie der Portalvene genutzt. Die Versuche wurden über Kreuz mit Wechsel der Enantiomere wiederholt.

2.2.3.2 VERGLEICH DER WIRKUNG VON CAMPHER AUF VERSCHIEDENE ORGANE

Verschiedene Stoffe können auf den gleichen Gewebstyp unterschiedlicher Organe ein anderes Wirkmuster zeigen.⁷¹ Entsprechend wurde die Wirkung von Campher auf den glatten Muskel von Verdauungsorganen sowie aus dem vaskulären System untersucht.

Verglichen wurden Präparate des gastrischen Fundus, des gastrischen Antrum und der Portalvene. Der glatte Muskel des Magenfundus zeigt lediglich eine tonische Aktivität. Präparate der Portalvene und des gastrischen Antrum zeigen wiederum phasische Aktivität.

2.2.3.3 WIRKMECHANISMUS VON CAMPHER AUF DEN GLATTEN MUSKEL

Vergleich von Campher und Kaliumkanalmodulatoren

Um das Wirkmuster von Campher mit gängigen Kaliumkanalöffnern zu vergleichen, wurde ein K20-K80-Test an der Portalvene durchgeführt. Dafür wurden zunächst zwei Präparate der Portalvene mit einer kaliumreichen Lösung von $K^+ = 20 \text{ mM}$ voraktiviert. Nach 20 min wurde an einem Präparat eine Konzentrationsreihe von Levromakalim in 5-Minuten-Abständen in den Konzentrationen von 10^{-8} M bis $3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ in das Organbad appliziert.

Parallel dazu wurde nach gleicher Voraktivierung an einem anderen Portalvenenpräparat in 5-Minuten-Abständen (+)-Campher in den Konzentrationen 10^{-5} M bis 10^{-3} M in das Organbad appliziert.

Im Anschluss wurde zu beiden Versuchsansätzen der spezifische K_{ATP} -Kanalblocker Glibenclamid (resultierende Konzentration im Organbad: 10^{-5} M) für 10 min hinzugegeben. So konnte eine mögliche Reversibilität der Wirkstoffe untersucht werden.

Nach dem vierstufigem Spülvorgang wurden die Portalvenenpräparate mit einer kaliumreichen Lösung von $K^+ = 80 \text{ mM}$ ($\triangleq -10 \text{ mV}$, s. Tabelle 5) voraktiviert. Nach 20 min Inkubationszeit wurden die Versuche mit den gleichen Konzentrationsreihen und Intervallen erneut durchgeführt.

Anschließend erfolgte ein weiterer Spülvorgang und die Präparate wurden über Kreuz getestet, um eine Reproduzierbarkeit und Validität der Versuche zu gewähren.⁷⁰

Wirkung von Campher auf den glatten Muskel bei Membranpotentialverschiebung

Normalerweise beträgt die Konzentration extrazellulären Kaliums in Krebslösung $5,9 \text{ mM}$. Durch den schrittweisen Ersatz von Krebslösung durch vorgewärmte kaliumarme ($K^+ = 1,2 \text{ mM}$) bzw. kaliumreiche Lösung ($K^+ = 118 \text{ mM}$) konnte eine kontinuierliche Hyper- bzw. Depolarisation des glatten Muskels erzeugt werden.

Der erste Teil der Versuchsreihe erfolgte durch fünfmaliges Ablassen von 10 ml der bereits im Organbad vorhandenen Lösung mit Ersatz durch 10 ml kaliumarme Lösung. Zu Beginn und nach jedem Austausch wurde eine Messung durchgeführt. Der zweite Teil bestand aus achtmaligem Austausch in gleicher Weise von 5 ml vorhandener Lösung durch 5 ml kaliumreiche Lösung, ausgehend vom Endpunkt des ersten Teils. Die Lösung wurde jeweils in Zeitintervallen von jeweils 10 min ausgetauscht.

Im Anschluss wurde der Versuch nach mehrmaligem Spülen erneut mit einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ Campher in allen Lösungen durchgeführt.

Mithilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung lässt sich das Membranpotential bei unterschiedlichen Elektrolytzusammensetzungen annähernd ermitteln (s. Formel 1). Die folgende Tabelle zeigt die verschiedenen Kaliumkonzentrationen und das jeweils errechnete Membranpotential des Versuches:

Kaliumkonzentration [mM]	Membranpotential [mV]
1,2	-70
2,4	-67
2,7	-66,1
3,2	-64,1
3,8	-63,5
4,7	-61,9
5,9	-59,3
16,5	-44,2
20	-40,1
29,1	-33,3
40,3	-26,4
49,4	-21,7
58,5	-18,1
65,9	-15,5
72,4	-13
78,1	-11
80	-10,74

TABELLE 5: ERMITTELTES MEMBRANPOTENTIAL UNTER VERSCHIEDENEN KALIUMKONZENTRATIONEN DURCH DIE GOLDMANN-HODGKIN-KATZ-GLEICHUNG ERRECHNET

Besonders die Kaliumkonzentration spielt bei der Generierung eines Membranpotentials eine wichtige Rolle. In Abhängigkeit von der Temperatur, der Permeabilität und den intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen lässt sich annäherungsweise das Membranpotential bei verschiedenen Kaliumkonzentrationen errechnen. Werte der Permeabilität und Elektrolytkonzentrationen wurden aus vorigen Versuchen von Lammel et al. entnommen.⁵³

Effekt von Campher auf den glatten Muskel bei Kalziumtitration in kalziumarmer Lösung

Mithilfe einer Titration von Kalzium in kalziumarme Lösung konnte bestimmt werden, ob die Wirkung von Campher auf den glatten Muskel kalziumabhängig reversibel ist.

Um den Effekt der Titration von Kalzium besser darstellen zu können, wurde zu Beginn des Versuches eine kalziumarme Lösung von $\text{Ca}^{2+} = 1 \text{ mM}$ ausgewählt. Die Titration erfolgte direkt in die Versuchskammer des Organbades alle 15 min in je 0,2 mM-Schritten. Es erfolgte je eine Kontrolle ohne Campher in der Organbadlösung und eine Titration mit (+)-Campher in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ im Organbad.

2.2.4 AUSWERTUNG

Die Auswertungen der Messungen der Organbadversuche erfolgten über das Messprogramm *LabChart* von *ADInstruments*. Hierzu wurden verschiedene Messparameter erhoben.

Für die Organe mit phasischer Kontraktion während der Organbadversuche wurden folgende Messparameter ausgewählt: die durchschnittliche Maximalkraft, d.h. die durchschnittliche Amplitudenhöhe der phasischen Kontraktionen, die Frequenz der phasischen Kontraktionen, d.h. die Anzahl der Amplituden geteilt durch die Messzeit, und die Durchschnittskraft der Kontraktion.

Als Messintervall wurden jeweils die letzten 3 min eines Versuchsintervalls für jeden Messparameter ausgewählt. So wurde eine gleichmäßige Auswertung ohne Artefakte durch Applikation und ohne Ungenauigkeiten durch unzureichende Verteilung des Wirkstoffes in der Lösung ermöglicht.

Für die Durchschnittskraft wurde das Integral mithilfe von *LabChart* erhoben und durch die Zeit des ausgewählten Intervalls geteilt. Für die Maximalkraft und die Durchschnittskraft der Messungen wurde jeweils die Vorspannung von den gemessenen Werten abgezogen. Für die Frequenz wurde die Anzahl der phasischen Kontraktionen durch die Messzeit dividiert.

Bei tonischen Muskelkontraktionen wurde die Durchschnittskraft der Kontraktion im Verhältnis zur Kontrolle gemessen. Auch hierbei wurde das Integral der Kontraktion durch *LabChart* ermittelt und durch den angegebenen Messzeitraum dividiert. Es wurde ebenfalls die Vorspannung von der Messung abgezogen.

Zusammengefasst wurden die einzelnen ausgewerteten Messergebnisse im Kalkulationsprogramm *Excel*. Alle Messwerte wurden im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent ausgewertet. Dadurch konnte die Streumenge der Messungen durch die ursprünglich unterschiedliche Kontraktionskraft der Präparate reduziert werden.

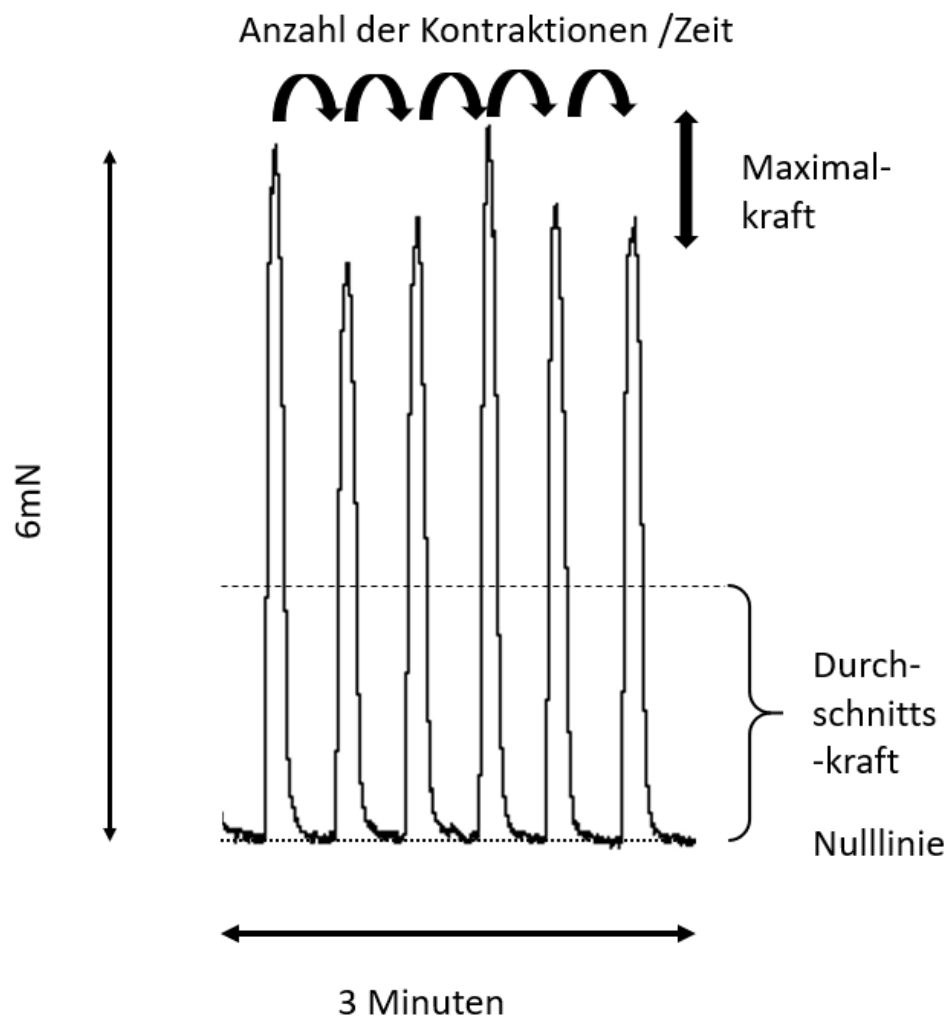


ABBILDUNG 5: DARSTELLUNG ZUR AUSWERTUNG DER PHASISCHEN KONTRAKTION EINES GLATTEN MUSKELS.

Die drei Parameter zur Messung der Aktivität von Magenantrum und Portalvene sind die durchschnittliche Maximalkraft, die Frequenz und die Durchschnittskraft des glatten Muskels. Die Frequenz wird aus der Anzahl der Amplituden in dem Messintervall von drei Minuten berechnet. Die durchschnittliche Maximalkraft ist die mittlere Amplitudenhöhe der phasischen Aktivität im selben Messzeitraum. Hiervon wird der Wert der Nulllinie subtrahiert. Die Nulllinie der Muskelpräparate zeigt eine Relaxation des glatten Muskels zwischen den Amplituden der phasischen Kontraktion an und entspricht der Vorspannung. Die Durchschnittskraft des glatten Muskels ist der Quotient aus Integral der phasischen Kontraktion und dem Messintervall. Der Wert der Nulllinie wird ebenfalls subtrahiert.

2.3 FLUORESZENZMIKROSKOPIE

Die Fluoreszenzmikroskopie mit dem Farbstoff Fluo-3 ist eine *in-vitro*-Methode, die Messungen von Veränderungen der zytosolischen Kalziumkonzentration des glatten Muskels in räumlich-zeitlicher Darstellung ermöglicht. Hierzu wird der glatte Muskel der Portalvene mit dem Farbstoff Fluo-3 beladen und im Anschluss in einem kleinen Organbad unter einem konfokalen Mikroskop mithilfe eines Argon-Lasers dargestellt.

2.3.1 FLUO-3: INDIKATOR FÜR KALZIUM

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde der Indikatorfarbstoff Fluo-3 AM (Molekulargewicht: 1129,86 g/mol) ausgewählt.

Fluo-3 ist ein Farbstoff, der kalziumgebunden unter Aktivierung durch Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm ein Fluoreszenzsignal in einer Wellenlänge von 525 nm ausstrahlt. Der Farbstoff hat die Eigenschaft, passiv in das Zytosol der Muskelzellen einzudringen ohne ihre Zellaktivität zu zerstören.²⁰ Fluo-3 bindet an intrazelluläres Kalzium und kann dadurch die intrazelluläre Kalziumkonzentration einer Muskelzelle im zeitlichen Verlauf mithilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie sichtbar machen.

Fluo-3 AM ist zunächst an Acetoxymethylester (AM-E) gebunden. Die Substanz in Lösung ist lipophil, nicht fluoreszierend und nicht kalziumsensitiv. In dieser Form kann Fluo-3 AM die Zellmembran passieren. Intrazellulär wird der Farbstoff durch Hydrolyse vom AM-E-Teil abgespalten und somit die Lipidlöslichkeit verringert. Ein Rücktransport in den Extrazellularraum ist nicht mehr möglich. Zusätzlich kann der Fluo-3-Teil nach Spaltung von AM-E an intrazelluläres Kalzium binden, wodurch die Fluoreszenzeigenschaft von Fluo-3 auf das vierzigfache gesteigert wird.^{19,20,72} Das emittierte Fluoreszenzsignal kann nun durch das konfokale Mikroskop aufgenommen und gemessen werden.

Da der Farbstoff nicht ratiometrisch ist, sind die Aussagen über die Aktivität des glatten Muskels anhand der Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration mithilfe des Fluoreszenzsignals semi-quantitativ.

2.3.2 PRÄPARATION

Zunächst erfolgte eine Freilegung des glatten Muskels der Portalvene von Fett- und Gewebsresten und eine longitudinale Eröffnung des Gefäßes. Danach wurde eine Fixierung

des Präparates mit der Serosaseite an einem Silikonkissen (1 x 3 x 2 mm) durch feine Nadeln vorgenommen, die seitlich an dem Silikonkissen angebracht wurden.

Nach Präparation und Fixation der Portalvene wurde das Muskelpräparat in einer Farbstofflösung mit dem Indikator Fluo-3 AM beladen.

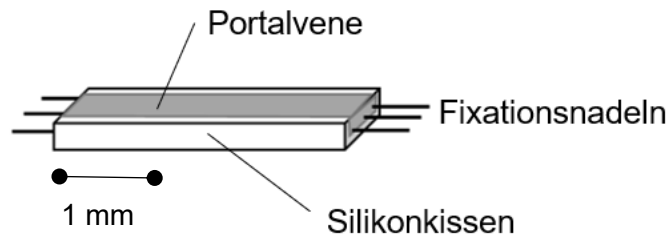


ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG ZUR FIXATION DER PORTALVENE ZUR FLUORESZENZMIKROSKOPIE.

Eine korrekte Fixation der Portalvene auf das Silikonkissen erlaubt eine optimale Messung der Aktivität glatter Muskelzellen. Das Präparat sollte unter Spannung am Silikonkissen fixiert werden, sodass ein Verrutschen bei Kontraktion der Muskelzellen im Organbad vermieden wird. Das Präparat wird vor der Inkubation mit dem fluoreszierenden Farbstoff fixiert. Nach Inkubation kann das Präparat durch das Silikonkissen im Organbad schonend mit der Präparatseite in Richtung Objektiv befestigt werden.

2.3.3 FLUORESZENZBELADUNG

Für die Farbstofflösung wurden 5 µg Fluo-3 in 10 µl DMSO gelöst, dann mit 10 µl Pluronic vermischt und für 3 min in einem Ultraschallbad inkubiert. Pluronic dient als Emulgator und sorgt für eine verbesserte Verteilung des Indikatorfarbstoffs. Dadurch gewährt Pluronic eine bessere Diffusion in die Muskelzellen. Im Anschluss wurden 980 µl Präparierlösung sowie 5 µl Cremophor hinzugefügt und ein weiteres Mal für 3 min im Ultraschallbad inkubiert, um eine ausreichende Verteilung des Farbstoffes in der Lösung zu erhalten. Zusätzlich wurden weitere 5 µl Cremophor mit der Lösung vermischt und erneut im Ultraschallbad inkubiert. Cremophor verbessert die Diffusionskapazität des Farbstoffes in die Zellen des glatten Muskels. Zuletzt wurde das Präparat hinzugegeben. Das Präparat wurde dann ca. 2,5 h in Dunkelheit und bei Raumtemperatur inkubiert, um eine ausreichende Beladung des Präparates mit dem Farbstoff zu gewährleisten.

2.3.4 AUFBAU

2.3.4.1 ORGANBAD

Während der Messung wurde das Muskelpräparat in ein kleines Organbad gelegt, um eine bestmögliche Aktivität in einer annähernd physiologischen Umgebung zu gewähren.

Das nun mit Fluo-3 beladene Präparat wurde mithilfe von Drähten in einer Objektträgerkammer mit gläsernem Boden befestigt, wobei die Seite des Silikonkissens mit dem befestigten Gewebe nach unten in Richtung des Objektivs zeigte. Zur Messung wurde so die dem Kammerboden anliegende Muskelschicht verwendet.

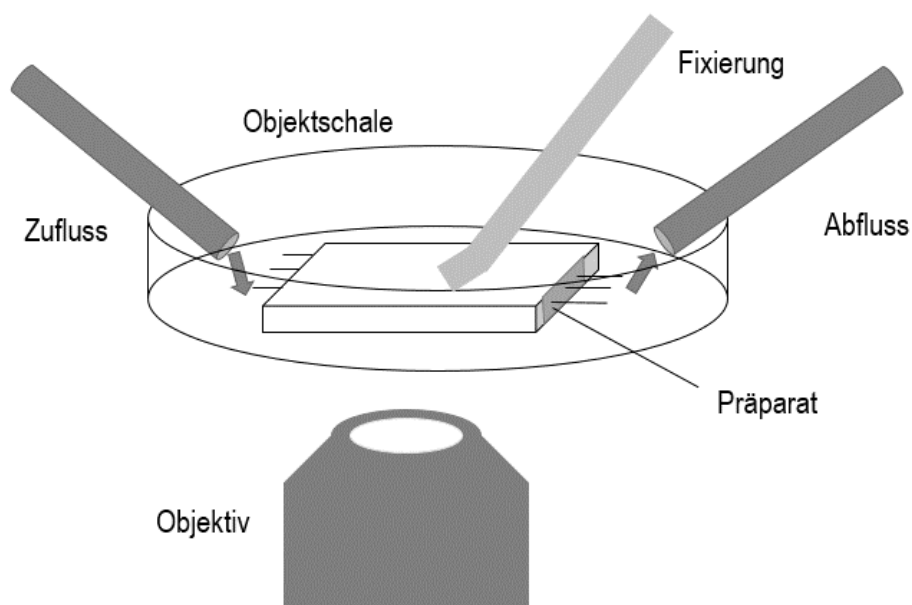


ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHER VERSUCHSAUFBAU DES ORGANBADTEILS DER FLUORESZENZMIKROSKOPIE.

Dargestellt ist der Teil des Fluoreszenzmikroskops, der als kleines Organbad für das fixierte Präparat dient. Das Silikonkissen wird mit der Präparateseite in Richtung Objektiv fixiert, um eine möglichst genaue Messung zu ermöglichen. Durch das Objektiv wird das fixierte Präparat in 20- oder 60-facher Vergrößerung dargestellt. Die Vitalität des Präparates wird durch ein Zu- und Abflusssystem mit carbogenisierter Krebslösung erhalten.

Die Objektträgerkammer mitsamt Präparat fasst ca. 2 ml Lösung. Die Kammer wurde während der Nutzung des Fluoreszenzmikroskops konstant erwärmt, sodass in der Kammer eine Temperatur zwischen 35 und 38 °C herrscht. Während der gesamten Versuchszeit wurde die Temperatur in der Kammer gemessen und kontrolliert, um ein möglichst gut reproduzierbares Ergebnis zu erhalten.

Ein Pumpsystem transportiert kontinuierlich frische vorgewärmte Lösung von einem mit Carbogen begasten Reservoir zur Objektträgerkammer, welches hierfür ca. 20 s benötigt. Zeitgleich fließt Lösung vom Organbad über das Pumpsystem in einen Abfallbehälter ab. So erfolgt eine kontinuierliche Spülung des Muskelpräparates.

2.3.4.2 KONFOKALES MIKROSKOP

Für die Versuchsreihen, die fluoreszenzmikroskopisch gemessen wurden, wurde ein konfokales Mikroskop (Nikon Eclipse TE-2000-S, Nikon Instruments Inc.) mit einer integrierten Scannereinheit (CSU-10, Yokogawa) zum zeitlich schnellen Erfassen der Kalziumsignale der Muskelzellen genutzt. Die integrierte Scannereinheit besteht aus zwei verbundenen rotierenden Scheiben (1800 rpm), dem sogenannten Spinning-Disc-System. Die Präparate wurden mithilfe von Objektiven mit 20-facher und 60-facher Verstärkung betrachtet. Zwischen Objektiv und Objektträgerkammer wurde zusätzlich Immersionsöl eingesetzt.

Zur Generierung eines Fluoreszenzsignals wurde ein Argon-Laser (643 Ion Laser, CVI Melles Griot) verwendet. Der Argon-Laser strahlt zu den Messzeiten monochromatisches Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm aus. Die Fokussierung des Lasers auf das Präparat erfolgt mithilfe des Spinning-Disc-Systems durch ca. 20 000 Mikrolinsen auf Lochblenden einer sogenannten Nipkow-Scheibe. Der Laserstrahl wird durch den Objektträger fokussiert und trifft dann auf das zu messende Präparat. Durch das Lasersignal wird der Indikatorfarbstoff, der an das intrazelluläre Kalzium gebunden ist, angeregt. Der angeregte Farbstoff emittiert dann ein Lichtsignal mit einer Wellenlänge von 525 nm.

Das emittierte Fluoreszenzsignal passiert retrograd das Objektiv und die Lochblenden der Nipkow-Scheibe. Es wird daraufhin an einem dichroitischen Spiegel reflektiert und trifft auf die CCD-Kamera. Diese erfasst die emittierten Strahlen und wandelt das Signal mit einem A/D-Wandler in ein Bild um, welches an den PC übermittelt wird und mithilfe des Programms *UltraView* eingesehen werden kann.

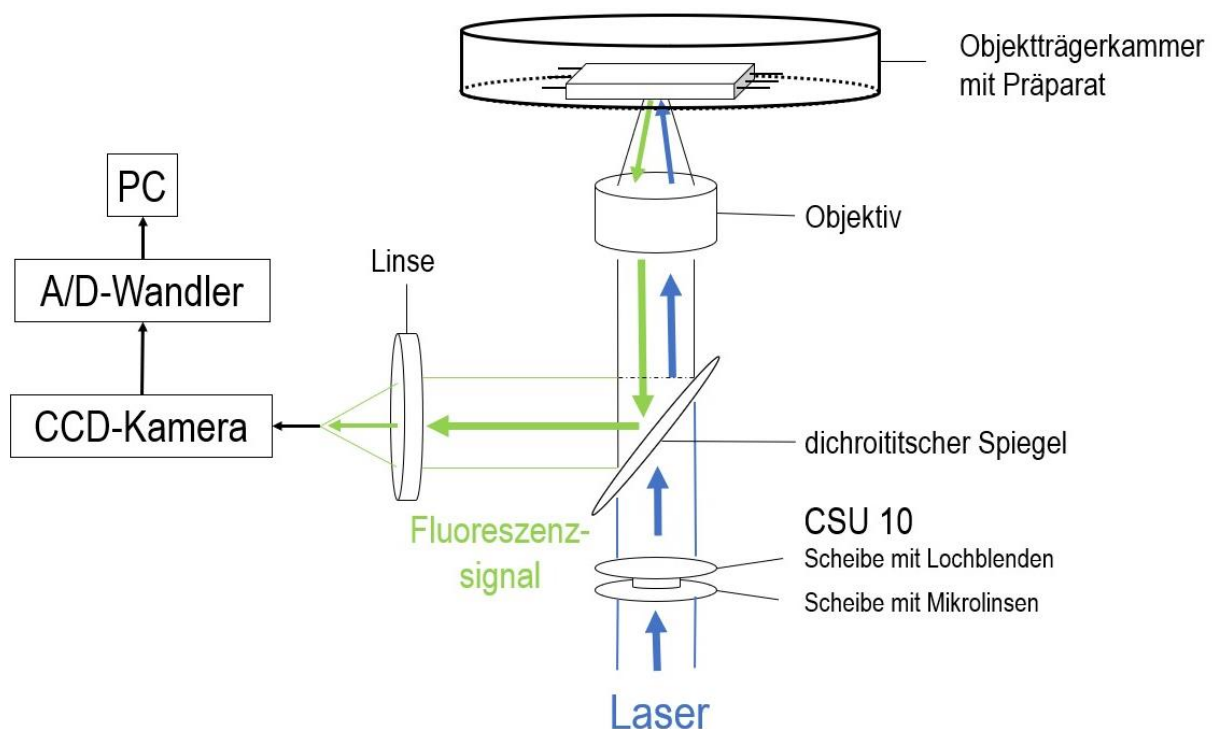


ABBILDUNG 8: SCHEMATISCHER VERSUCHSAUFBAU DER KONFOKALEN FLUORESZENZMIKROSKOPIE.

Der schematische Aufbau zeigt den Mechanismus des konfokalen Mikroskops zur Untersuchung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch den Indikatorwirkstoff Fluo-3. Der Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm strahlt durch das Objektiv auf die Messfläche. Dort wird der Indikatorfarbstoff Fluo-3, der an intrazellulärem Kalzium gebunden ist, angeregt, woraufhin er ein Lichtsignal in einer Wellenlänge von 525 nm emittiert. Das Fluoreszenzsignal strahlt durch das Objektiv, wird an einem dichroitischen Spiegel reflektiert und gebündelt von der CCD-Kamera erfasst. Durch das Programm UltraView wird das Fluoreszenzsignal als zweidimensionales Bild wiedergegeben. Hier werden Signale anhand einer Farbskala dargestellt, wobei blau und grün ein niedriges Signal und rot ein hohes Signal darstellen. Ein hohes Fluoreszenzsignal zeigt eine hohe intrazelluläre Kalziumkonzentration an. Eine Erhöhung des Kalziumsignals kann auf eine direkte Verstärkung der Kontraktion des Muskels deuten.

2.3.5 BILDAUFNAHME DES FLUORESZENZSIGNALS

Der Argon-Laser wurde auf eine Stärke von 50-75% der maximal möglichen Strahlung eingestellt, um einerseits ein gut messbares Fluoreszenzsignal der Präparate zu erhalten, andererseits aber die mit Farbstoff beladenen Präparate während des Versuches nicht zu stark auszubleichen.

Mit dem PC-Programm *UltraView* konnte nun das Bild des Fluoreszenzsignals gemessen, gespeichert und bearbeitet werden. Über *UltraView* wurden verschiedene Parameter zur Ermittlung des Signales eingestellt.

Alle gemessenen Bilder wurden mit einem Binning von 2 x 2 erstellt, was bedeutet, dass jeweils 2 x 2 Bildpunkte als Mittelwert zusammengefasst wurden, um ein optimales Verhältnis zwischen guter Auflösung und Ausblenden unerwünschten Hintergrundrauschens zu erhalten. Die Belichtungszeit betrug je 500 ms, sodass zwei Signalbilder pro Sekunde aufgenommen wurden. Dies führt zu einem verminderten Abblenden des Fluoreszenzsignals. Es wurden Messlängen abhängig der Messung (zusätzliche Applikation, Wechsel der Lösung) entweder von 120 s oder 240 s gewählt. Die z-Ebene blieb während der Versuche konstant.

2.3.6 MESSABLAUF

Zum Messen wurde zunächst das mit Krebslösung perfundierte Präparat für 30 min in der Objektträgerkammer inkubiert. Anschließend wurde eine zur Messung geeignete Stelle des Präparates ausgesucht. Je nach Stärke der Beladung wurde der Laser auf 50%-75% der maximalen Strahlung eingestellt. Ein bis zwei Kontrollmessungen erfolgten dann für je 120 s, um ein gleichmäßiges Fluoreszenzsignal des Präparates gewährleisten zu können. Anschließend wurde eine Erholungsphase des Präparates von 15 min eingehalten.

Die nächste Messung stellte einen Wechsel der Reservoirs von Krebslösung zu 20 mM kaliumreicher Lösung nach 30 s dar, wobei eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumsignals durch Depolarisation des glatten Muskels erwartet wird.“. Insgesamt wurde hierfür über einen Zeitraum von 240 s gemessen, um den Effekt komplett zu erfassen. Nach einer weiteren Regenerationsphase von 15 min begann eine Messung von 240 s, in der nach 50 s ein Bolus von 100 µl Campher in physiologischer Kochsalzlösung ($5 \cdot 10^{-4}$ M Campher im Organbad) appliziert wurde. Nach weiteren 15 min Regenerationsphase erfolgte eine Nachkontrolle, um auf eine Auswaschung des applizierten Camphers und eine Reversibilität des Camphereffektes auf den glatten Muskel unter kaliumreicher Lösung ($K^+ = 20$ mM) zu prüfen.

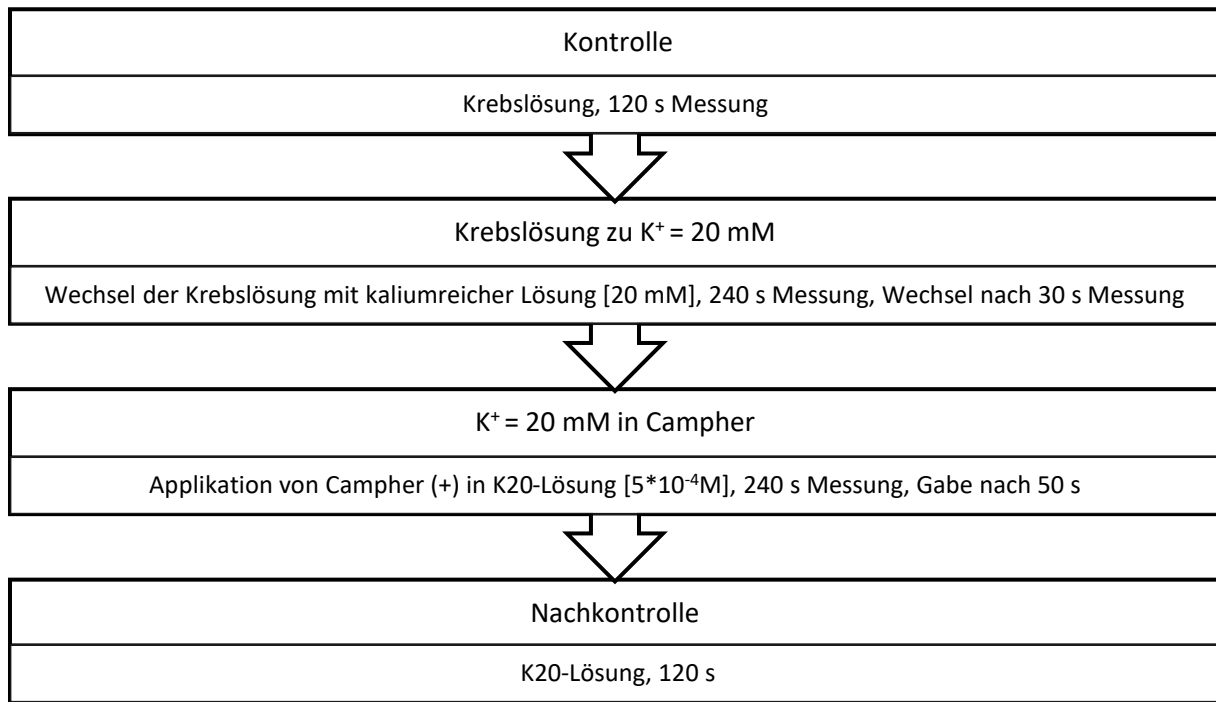


TABELLE 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG ZUR VERSUCHSDURCHFÜHRUNG DER MESSUNG VOM EINFLUSS VON CAMPHER AUF DIE PORTALVENE MITTELS FLUORESZENZMIKROSKOPIE.

Durch die verschiedenen Messungen kann die Vitalität des Muskels und die Reaktion des Präparates auf Wirkstoffe aufgenommen werden. Bei einem Wechsel der perfundierenden Krebslösung zu einer kaliumreichen Lösung mit K⁺ = 20 mM wird eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumsignals durch Depolarisation des glatten Muskels erwartet. Die Nachkontrolle zeigt vor allem die Vitalität des glatten Muskels an. Durch sämtliche Messungen am Präparat erfolgen Ausbleichungen des Fluoreszenzwirkstoffes, sodass über mehrere Messungen eine gewisse Abschwächung des Fluoreszenzsignals zu erwarten ist.

2.3.7 AUSWERTUNG

Im Programm *UltraView* wurden die Aufnahmen pixelweise über den ausgewählten Zeitraum gespeichert. Die Aktivität des glatten Muskels wurde über das Programm in Grey-Leveln gemessen. Ausgewertet wurden bestimmte Areale, die eine hohe Konzentration von intrazellulärem Kalzium und somit eine hohe Aktivität des glatten Muskels zeigten. Diese Areale wurden als „Region of Interest“ (ROI) bezeichnet, wobei eine ausgewählte Fläche die einzelnen Messpunkte in dem ausgewählten Bereich zum Durchschnitt nimmt.

Die gemessenen Daten der ROI wurden mithilfe von *Excel* ausgewertet.

2.4 STATISTIK

Die gemessenen Daten der Organbadversuche wurden mit *LabChart* erfasst, in das Kalkulationsprogramm *Excel* übertragen und dort analysiert. Für die Auswertung und zur statistischen Beschreibung der gemessenen Daten wurden Mittelwert, Standardabweichung und Standard Error of the Mean (S.E.M.) ermittelt.

Für die Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie wurden die in *UltraView* gemessenen Werte der ROIs in das Programm *Excel* übertragen. Dort wurden der Median der ausgewählten Zeitabschnitte, Mittelwert sowie Standardabweichung und S.E.M. berechnet.

Zum Vergleich der Ergebnisse mit der Kontrolle und untereinander wurde eine Varianzanalyse verwendet (ANOVA: analysis of variance), welche die Möglichkeit zum Vergleichen von mehr als zwei Gruppen bietet und so eine Alternative zum t-Test bei einer Normalverteilung der Ergebnisse darstellt.

Die Ergebnisse werden als arithmetisches Mittel \pm S.E.M. im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent angegeben, wobei das Signifikanzniveau der Ergebnisse auf $p < 0,05$ festgelegt wurde (im Text mit * hinter den Ergebnissen markiert).

Mittelwert oder arithmetisches Mittel:

$$\bar{x}_{arithm} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

FORMEL 2

Standardabweichung:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} * \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}_{arithm})^2}$$

FORMEL 3

Standard error of the mean:

$$S.E.M. = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

FORMEL 4

t-Test für unverbundene Stichproben:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s} * \sqrt{\frac{n_1 * n_2}{n_1 + n_2}}$$

FORMEL 5

3 ERGEBNISSE

3.1 WIRKUNG VON CAMPHER AUF DEN GLATTEN MUSKEL

An den Modellsystemen Magen und Portalvene sollte die Wirkung und im weiteren Verlauf der Wirkmechanismus von Campher ermittelt werden. Zuerst wurden die Enantiomere von Campher in Bezug auf ihre Wirkung bzw. Wirkunterschiede auf die glatte Muskulatur untersucht. Weiterhin wurde die Wirkung von Campher auf Präparate der glatten Muskulatur von gastrischem Fundus, Antrum und Portalvene unter verschiedenen Voraktivierungen gemessen. Mit den Resultaten der verschiedenen Messungen konnte im Anschluss annähernd die ED_{50} von Campher auf Magen und Portalvene bei unterschiedlichen Voraktivierungen ermittelt werden.

3.1.1 VERGLEICH DER ENANTIOMERE VON CAMPHER UND DEREN EINFLUSS AUF DEN GLATTEN MUSKEL DES MAGENANTRUM

Zunächst galt es, eine generelle Wirkung von Campher auf den glatten Muskel zu ermitteln. Dazu sollten mögliche Unterschiede zwischen (+)-Campher und (-)-Campher beschrieben werden sowie ein möglicher Unterschied zwischen verschiedenen Typen des glatten Muskels gemessen werden.

Um das stärker wirksame Enantiomer der chiralen Formen von Campher zu ermitteln, wurden die Enantiomere in ihrer Wirkung auf die Frequenz der Kontraktionen, Maximalkraft und Durchschnittskraft des glatten Muskels gemessen.

Der Wirkunterschied von (+)- und (-)-Campher wurde am glatten Muskel des gastrischen Antrum ermittelt. Voraktivierung durch eine kaliumreiche Lösung von $K^+ = 20 \text{ mM}$ (ca. -41 mV , s. Tabelle 5) führte zu einer konstanten und gut reproduzierbaren Aktivität. Nach der Voraktivierung und anschließender Wartezeit von 20 min wurden (+)- und (-)-Campher in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von 10^{-6} bis $3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ in 10-Minuten-Abständen appliziert und nach Spülung der Präparate über Kreuz getestet.

Konzentration	(+)-Campher			
	Durchschnittskraft	Maximalkraft	Frequenz	n
10^{-6} M	103,04±3,05%	105,69±1,24%	97,13±0,47%	5
10^{-5} M	95,76±4,51%	105,69±3,3%	93,49±1,97%	6
10^{-4} M	77,91±3,99%*	85,07±3,94%*	95,23±0,94%*	27
$3 \cdot 10^{-4}$ M (in 0,9% NaCl)	60,39±5,03%*	70,14±4,6%*	92,07±2,11%*	27

TABELLE 7: DURCHSCHNITTICHE WIRKUNG VERSCHIEDENER KONZENTRATIONEN VON (+)-CAMPHER AUF DIE AKTIVITÄT DES GLATTEN MUSKELS DES GASTRISCHEN ANTRUM UNTER VORAKTIVIERUNG MIT 20MM KALIUMREICHER LÖSUNG.

Mit steigender Konzentration von (+)-Campher ist eine Hemmung der Aktivität des glatten Muskels, besonders der Durchschnittskraft um ca. 40% und der Maximalkraft um ca. 30% bei einer Konzentration $3 \cdot 10^{-4}$ M, zu erkennen. In der Frequenz der periodischen Aktivität des glatten Muskels ist nur eine leichte Hemmung von ca. $8 \pm 2\%$ unter maximaler Konzentration von Campher im Vergleich zur Voraktivierung zu erkennen. Die Wirkung von Campher zeigt sich signifikant zur Kontrolle ($p < 0,05$).

Konzentration	(-)-Campher			
	Durchschnittskraft	Maximalkraft	Frequenz	n
10^{-6} M	99,94±2,02%	105,17±1,5%	98,52±1,6%	6
10^{-5} M	93,69±3,21%	105,12±2,01%	95,80±1,37%	6
10^{-4} M	79,30±3,08%*	84,7±3,19%*	96,23±0,92%*	28
$3 \cdot 10^{-4}$ M (in 0,9% NaCl)	58,15±4,9%*	67,45±5,48%*	96,43±1,57%*	28

TABELLE 8: DURCHSCHNITTICHE WIRKUNG VERSCHIEDENER KONZENTRATIONEN VON (-)-CAMPHER AUF DIE AKTIVITÄT DES GLATTEN MUSKELS DES GASTRISCHEN ANTRUM UNTER VORAKTIVIERUNG MIT 20MM KALIUMREICHER LÖSUNG

Der Einfluss von (-)-Campher auf den glatten Muskel äußert sich in einer deutlichen Hemmung der Durchschnittskraft um ca. 42 % und der Maximalkraft um ca. 32% bei einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-4}$ M. Es ist nur eine leichte Hemmung der Frequenz der periodischen Aktivität des glatten Muskels um $3,5 \pm 1,57\%$ bei einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-4}$ M (-)-Campher gemessen worden. Die Wirkung von Campher zeigt sich signifikant zur Kontrolle ($p < 0,05$).

Bei Konzentrationen von 10^{-6} M wurden bei beiden Enantiomeren eine geringe Verstärkung der Maximalkontraktion, sowie der Durchschnittskraft bei (+)-Campher, festgestellt. In höheren

Konzentrationen wurde vor allem eine Inhibition der phasischen Kontraktionen bei nur geringer Hemmung der Frequenz der Kontraktionen des glatten Muskels gemessen.

Bei der maximalen Campher-Konzentration von $3 \cdot 10^{-4}$ M betrug die Durchschnittskraft $60\% \pm 5\%^*$ unter (+)-Campher bzw. $58 \pm 5\%^*$ unter (-)-Campher im Vergleich zur Kontrolle. Die durchschnittliche Maximalkraft für $3 \cdot 10^{-4}$ M (+)-Campher lag bei $70\% \pm 4,6\%^*$ und bei (-)-Campher bei $67,5\% \pm 5,5\%^*$ im Vergleich zur Kontrolle. Die Frequenz des Antrum sank bei (+)-Campher auf $92,1 \pm 2,1\%^*$ und bei (-)-Campher auf $96 \pm 1,6\%^*$.

Bei keiner der Messungen wurden signifikante Unterschiede ($p \geq 0,1$) in der Wirkung der Enantiomere festgestellt. Somit konnte kein signifikanter Unterschied in der Wirkung der Enantiomere von Campher auf die Hemmung des glatten Muskels des Antrum beschrieben werden. Für die weiteren Untersuchungen wurde ausschließlich (+)-Campher verwendet, da hauptsächlich (+)-Campher in der medizinischen Anwendung vertreten ist und *in vivo* geringere Toxizitäten aufweist.^{1,55}

3.1.2 UNTERSCHIEDLICHE WIRKSTÄRKEN VON RECHTSDREHENDEM CAMPHER AM GLATTEN MUSKEL

Um weitere Wirkunterschiede von Campher auf die glatte Muskulatur untersuchen zu können, wurden drei verschiedene Arten von Muskelpräparaten der Ratte verglichen. Das gastrische Antrum und die Portalvene der Ratte zeigten beide unter Voraktivierung periodische Kontraktionen. Der gastrische Fundus der Ratte zeigte unter Voraktivierung tonische Kontraktionen. Als Voraktivierung wurde Acetylcholin und kaliumreiche Lösung verwendet. Rechtsdrehendes Campher wurde in aufsteigender Konzentration zwischen 10^{-6} M und 10^{-3} M verwendet. Der Magenfundus wurde mit Acetylcholin voraktiviert und Campher wurde in den Konzentrationen 10^{-6} M und $3 \cdot 10^{-4}$ M verwendet.

So konnten Schlüsse über die Wirkung von Campher auf den Verdauungstrakt und auf das kardiovaskuläre System der Ratte sowie über die Wirkung auf phasische Aktivität und Haltetonus von glatter Muskulatur gezogen werden.

Vergleich der Wirkung von Campher auf verschiedene Organe

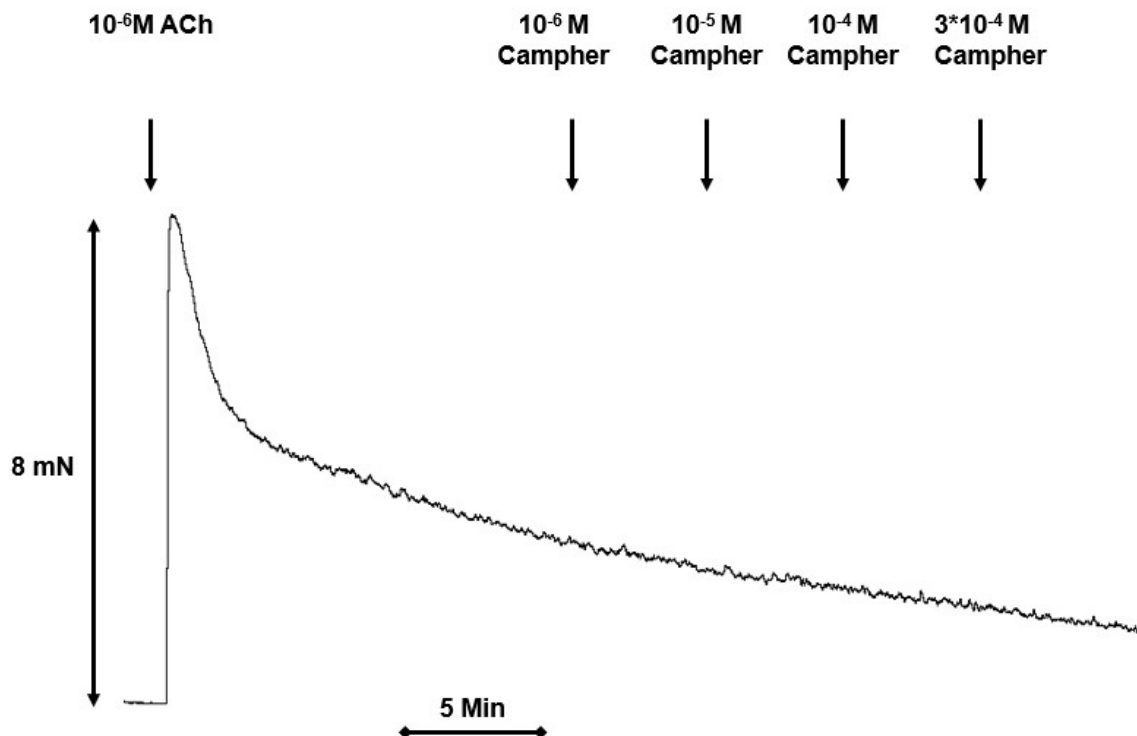


ABBILDUNG 9: ORIGINALAUFZEICHNUNG ZUR VERSUCHSDURCHFÜHRUNG DER WIRKUNG VON CAMPHER AUF DEN FUNDUS DES MAGENS.

Bei der tonischen Kontraktion des Magenfundus unter Voraktivierung durch $\text{ACh} = 10^{-6} \text{ M}$ wurde im Vergleich zur Nullprobe kein signifikanter Effekt von Campher bei einer Anzahl von $n = 9$ beobachtet.

Der gastrische Fundus der Ratte zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass er unter Voraktivierung lediglich tonische Kontraktionen aufweist. Bei tonischer Kontraktion wurde die Durchschnittskraft im zeitlichen Vergleich zur Kontrolle gemessen

Bei Voraktivierung durch Acetylcholin in den Konzentrationen 10^{-6} M und 10^{-5} M wurde kein signifikanter Effekt von Campher auf die tonische Kontraktion beobachtet. Die Anzahl der Versuche betrug $n = 9$.

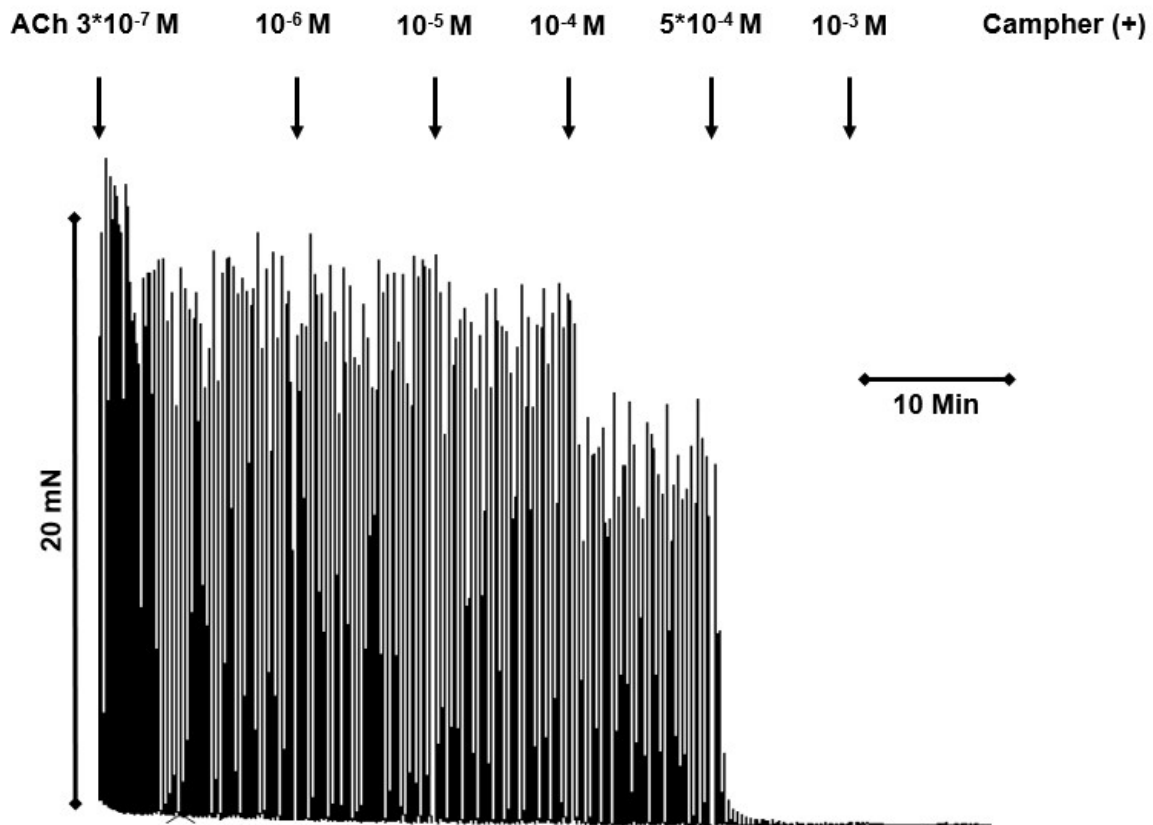


ABBILDUNG 10: ORIGINALAUFZEICHNUNG ZUR VERSUCHSDURCHFÜHRUNG DER WIRKUNG VON CAMPHER AUF DAS ANTRUM DES MAGENS.

In der Aufnahme ist eine signifikante Hemmung durch Campher auf die phasische Kontraktion des Magenantrum, insbesondere eine starke Hemmung der Durchschnittskraft, erkennbar. Durchschnittlich ist eine komplette Hemmung der phasischen Aktivität des gastrischen Antrum ab einer Konzentration von Campher = 10^{-3} M gemessen worden.

Unter der Voraktivierung mit $ACh = 3 \cdot 10^{-7}$ M wiesen die Präparate des gastrischen Antrum der Ratte gleichmäßige phasische Kontraktionen auf. Bei niedrigeren Konzentrationen von rechtsdrehendem Campher war zunächst nur eine leichte Hemmung der Kontraktionskraft des Antrumpräparates zu sehen. Bei steigenden Konzentrationen von Campher wurden stetig stärkere Hemmungen der Durchschnittskraft und der Maximalkraft gemessen. Ab einer Konzentration von (+)-Campher = 10^{-3} M im Organbad wurde häufig eine komplette Hemmung der phasischen Aktivität des glatten Muskels gemessen. Wenn eine Restaktivität zu erkennen war, zeigte sich eine gesteigerte Frequenz der geringen Aktivität bei $136,5 \pm 11,5\%$. Die Messungen in der Konzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ M Campher im Organbad zeigen eine Maximalkraft von $15,7 \pm 4,5\%^*$, eine Frequenz von $118,6 \pm 7,4\%^*$ und eine Durchschnittskraft von $18,6 \pm 1,3\%^*$ im Verhältnis zur Kontrolle. Die Anzahl der Versuche betrug $n = 17$.

Konzentration	Magenantrum (Voraktivierung mit $3 \cdot 10^{-7}$ M Acetylcholin)			
	Durchschnittskraft	Maximalkraft	Frequenz	n
10^{-6} M	100,49±1,32%	99,35±2,45%	98,89±1,42%	17
10^{-5} M	99,74±2,40%	99,55±3,16%	94,04±1,63%	17
10^{-4} M	88,57±2,60%	85,93±3,72%	92,68±1,87%	17
$5 \cdot 10^{-4}$ M (in DMSO)	18,63±1,33%*	15,69±4,48%*	118,64±7,37%*	17
10^{-3} M (in DMSO)	3,73±1,32%*	6,97±3,27%*	136,51±11,51%*	17

TABELLE 9: DURCHSCHNITTICHE WIRKUNG VERSCHIEDENER KONZENTRATIONEN VON (+)-CAMPHER AUF DIE AKTIVITÄT DES GLATTEN MUSKELS DES GASTRISCHEN ANTRUM UNTER VORAKTIVIERUNG MIT $3 \cdot 10^{-7}$ M ACETYLCHOLIN.

Mit steigender Konzentration von (+)-Campher ist am gastrischen Antrum eine graduelle Hemmung, besonders der Durchschnittskraft und der Maximalkraft der phasischen Aktivität des Präparates zu erkennen. Bei stärkerer Hemmung durch $5 \cdot 10^{-4}$ M Campher ist eine Erhöhung der Frequenz der phasischen Aktivität der Antrumpräparate zu sehen gewesen. Ab einer Konzentration von 10^{-3} M zeigt sich eine nahezu komplette Hemmung der phasischen Aktivität des glatten Muskels des gastrischen Antrum. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Wirkunterschied in allen drei Messparametern im Vergleich zur Kontrolle.

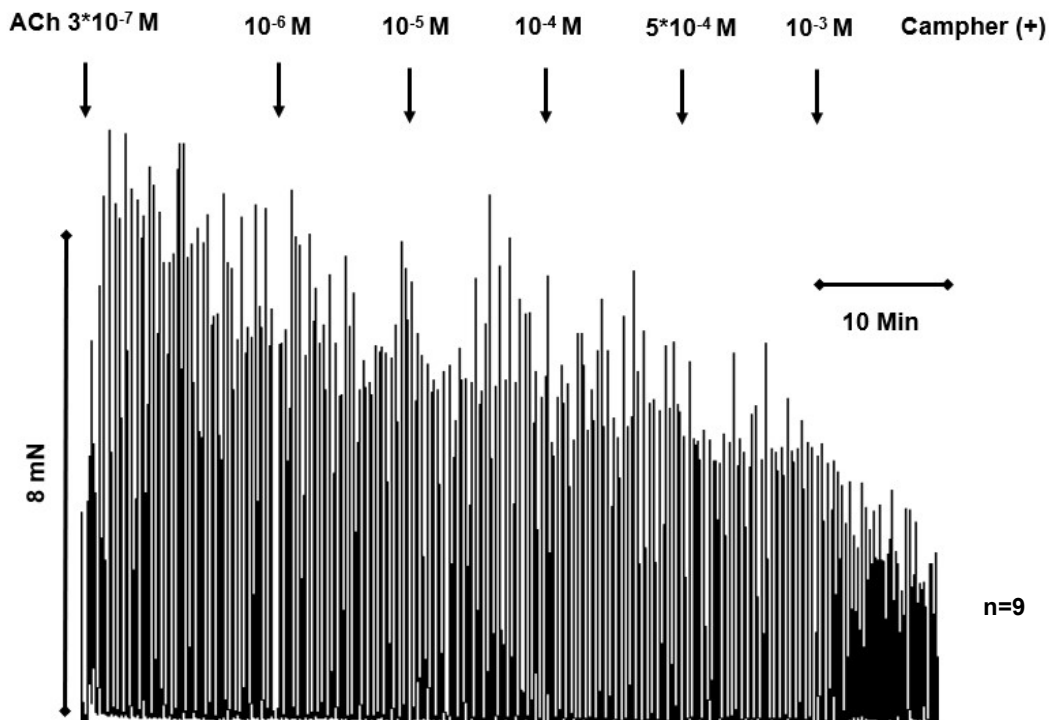


ABBILDUNG 11: ORIGINALAUFZEICHNUNG ZUR VERSUCHSDURCHFÜHRUNG DER WIRKUNG VON CAMPHER AUF DIE PORTALVENE.

Die Messung der phasischen Kontraktionen der Portalvene unter Voraktivierung mit ACh = $3 \cdot 10^{-7}$ M bei einer Konzentrationsreihe von (+)-Campher zeigt eine signifikante Senkung der Maximalkraft der Kontraktionen und eine signifikante Hemmung der Durchschnittskraft. Zusätzlich ist bei erhöhten Konzentrationen von (+)-Campher auch eine Erhöhung der Frequenz der phasischen Kontraktion erkennbar.

Die Portalvene ist Teil des kardiovaskulären Systems der Ratte und weist ein phasisches Kontraktionsmuster auf. Es wurden signifikante Hemmungen von Durchschnittskraft und Maximalkraft der phasischen Kontraktion durch Campher gemessen. Die Frequenz der Kontraktionen war erhöht.

Unter Voraktivierung mit ACh = $3 \cdot 10^{-7}$ M betrug die stärkste gemessene durchschnittliche Hemmung der Maximalkraft der Portalvene bei einer Konzentration von Campher = 10^{-3} M $24,4 \pm 4\%^*$, die Frequenz betrug $164,9 \pm 11\%^*$ und die Durchschnittskraft $38,4 \pm 4,9\%^*$. Die Anzahl der Versuche betrug $n = 9$.

Konzentration	Portalvene (Voraktivierung mit $3 \cdot 10^{-7}$ M Acetylcholin)			
	Durchschnittskraft	Maximalkraft	Frequenz	n
10^{-6} M	101,06±1,67%	87,66±4,73%	102,25±3,22%	9
10^{-5} M	93,55±1,95%	78,24±2,67%	98,73±3,53%	11
10^{-4} M	77,99±2,85%	71,75±3,43%	99,44±5,34%	11
$5 \cdot 10^{-4}$ M (in DMSO)	54,91±2,24%*	60,10±9,03%*	139,97±8,98%*	6
10^{-3} M (in DMSO)	38,35±4,92%*	24,39±3,98%*	164,88±11,0%*	9

TABELLE 10: DURCHSCHNITTliche WIRKUNG VERSCHIEDENER KONZENTRATIONEN VON (+)-CAMPHER AUF DIE AKTIVITÄT DES GLATTEN MUSKELS DES GASTRISCHEN ANTRUM UNTER VORAKTIVIERUNG MIT $3 \cdot 10^{-7}$ M ACETYLCHOLIN.

In den verschiedenen Portalvenen-Präparaten ist insgesamt bereits bei einer Konzentration von 10^{-5} M (+)-Campher eine gewisse Hemmung der Durchschnittskraft und Maximalkraft bei gleichbleibender Frequenz zu erkennen. Diese Hemmung verstärkt sich mit höheren Konzentrationen, jedoch ist die Hemmung der phasischen Aktivität der Portalvene nicht so ausgeprägt wie die in den Versuchen mit dem gastrischen Antrum gemessene Hemmung. Dies weist möglicherweise auf eine höhere Wirkstärke von Campher auf das gastrische Antrum als auf die Portalvene hin. Es zeigte sich hierbei eine signifikante Wirkung von Campher auf alle drei Messparameter ($p < 0,05$).

Vergleich der Wirkung von Campher auf verschiedene Muskelpräparate in kaliumreicher Lösung

Im Unterschied zur Voraktivierung des glatten Muskels mit Acetylcholin erfolgt eine Aktivierung des glatten Muskels durch kaliumreiche Lösung nicht transmittergesteuert, sondern spannungsgesteuert. So konnte ein Einfluss von Campher auf den glatten Muskel bei Membrandepolarisation alleine, zum Ausschluss weiterer Aktivierungsmöglichkeiten, ermittelt werden.

Die Präparate des gastrischen Antrum und der Portalvene zeigten auch bei spannungsgesteuerter Voraktivierung mit 20 mM Kalium (entspricht -41 mV lt GHK, s. Tabelle 5) eine stark signifikante Hemmung der Maximalkraft und der Durchschnittskraft des glatten Muskels.

Bei aufsteigenden Konzentrationen von (+)-Campher zwischen 10^{-5} M und 10^{-3} M zeigte die Portalvene eine steigende Hemmung der Durchschnittskraft und der Maximalkraft. Bei einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ M (+)-Campher betrug die Durchschnittskraft $90,35 \pm 3,07\%^*$, die Maximalkraft $84,03 \pm 3,89\%$ und die Frequenz $143,5 \pm 10,43\%$ im Verhältnis zur Kontrolle. Bei maximaler Hemmung der Portalvene durch 10^{-3} M (+)-Campher betrug die Durchschnittskraft $42,17 \pm 3,12\%^*$, die Maximalkraft $28,58 \pm 3,16\%^*$ und die Frequenz $167 \pm 11,67\%^*$.

Die Wirkung von Campher ($3 \cdot 10^{-4}$ M) auf den glatten Muskel des gastrischen Antrum zeigt eine Durchschnittskraft von $60,39 \pm 5,03\%^*$, eine Maximalkraft von $70,14 \pm 4,6\%^*$ und eine Frequenz von $92,07 \pm 2,11\%^*$ im Vergleich zur Kontrolle.

Insgesamt ist bei einer spannungsgesteuerten Voraktivierung der Präparate bei gleicher Dosis eine weniger starke hemmende Wirkung auf den Muskel zu beobachten als bei Voraktivierung durch Acetylcholin. Nichtsdestotrotz zeigt Campher auch hier eine signifikante Hemmung der Durchschnits- und der Maximalkraft der phasischen Muskelaktivität.

Ermittlung der ED_{50} von (+)-Campher bei unterschiedlichen Organen unter Voraktivierung mit Acetylcholin

Um verschiedene Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Organbadversuche darzustellen, wurden die berechneten Ergebnisse verschiedener Konzentrationen von Campher mit einer gängigen Formel für eine Fittingkurve verglichen.⁷³ Die „Wirkung des Stoffes bei einer Konzentration X“ und der „slope factor“ stellen veränderbare Variablen dar.

Hierzu wurde eine gängige Boltzmann-Funktion zur Errechnung einer Sigmoidkurve mit den zu ermittelnden Parametern der ED_{50} und des „slope factors“ (Steigung) so angeglichen, dass

die Messwerte die kleinstmögliche Differenz zum Quadrat der errechneten Werte der Sigmoidkurve besitzt. Dafür wurde das Programm „Excel Solver“ genutzt.

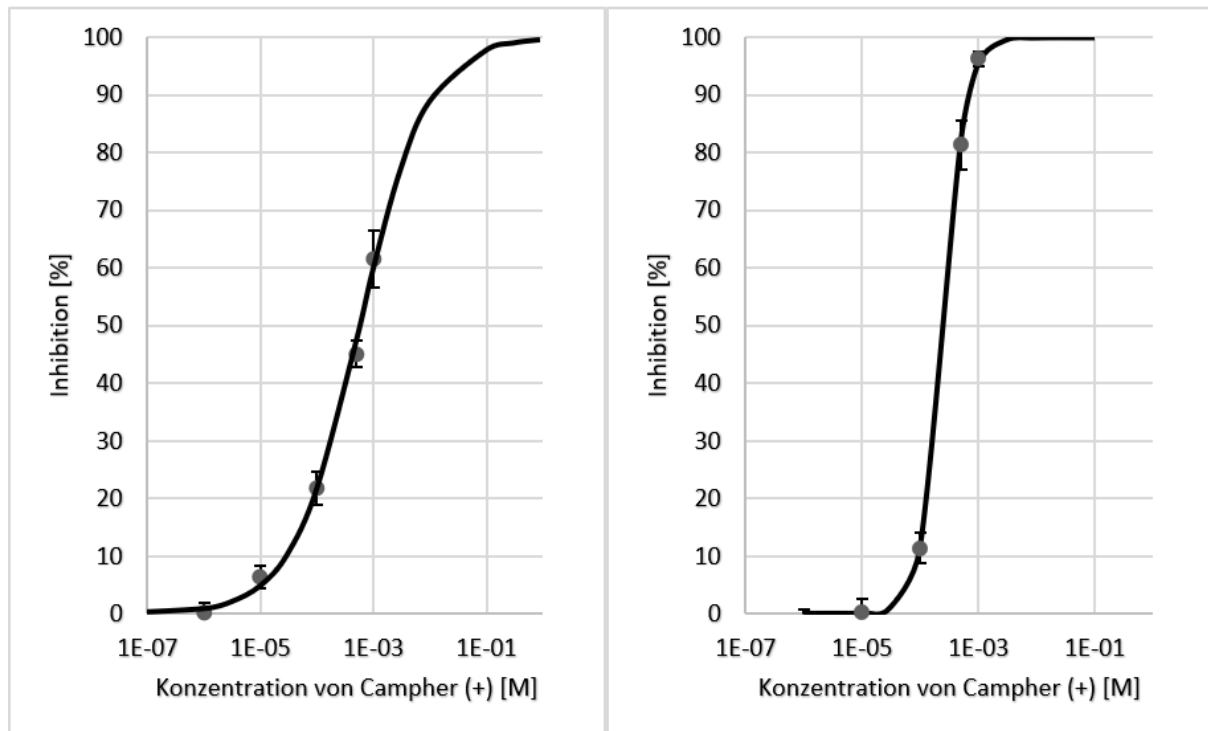


ABBILDUNG 12: DOSIS-WIRKUNGSBEZIEHUNG DER INHIBITION VON (+)-CAMPHER AUF DIE DURCHSCHNITTSKRAFT DER PORTALVENE (LINKS) UND DES MAGENANTRUM (RECHTS) UNTER VORAKTIVIERUNG VON $3 \cdot 10^{-7}$ M ACh.

Mithilfe der Messungen der jeweiligen Wirkung von Campher auf das gastrische Antrum und die Portalvene konnte eine sigmoidale Dosis-Wirkungs-Kurve der hemmenden Wirkung von Campher erstellt werden. Zu erkennen ist, dass die ED_{50} beim Antrumpräparat geringer ist. Zusätzlich ist die Trendlinie der Dosis-Wirkungsbeziehung von Campher auf die Durchschnittskraft des Magenantrum steiler als der Trendlinie der Portalvene.

Die ED_{50} des Magenantrum unter Voraktivierung mit ACh = $3 \cdot 10^{-7}$ M liegt bei $2,5 \cdot 10^{-4}$ M (+)-Campher (n = 19), die ED_{50} der Portalvene liegt bei $5,8 \cdot 10^{-4}$ M (+)-Campher (n = 9).

Zusammenfassung der Wirkung von Campher auf verschiedene Muskelpräparate mit unterschiedlichen Voraktivierungen.

Die Dosis-Wirkungs-Beziehung und die ED_{50} von (+)-Campher auf die Aktivität des glatten Muskels wurde mit den Messungen der Portalvene und des gastrischen Antrum unter Voraktivierung der Präparate mit sowohl Acetylcholin als auch kaliumreicher Lösung ermittelt. So konnte ein unmittelbarer Vergleich der Wirkung von Campher unter verschiedenen Voraktivierungen und Organen gezogen werden.

Es zeigt sich, dass eine Halbierung der Aktivität des gastrischen Antrum sowohl unter Voraktivierung mit Acetylcholin als auch mit kaliumreicher Lösung bei deutlich geringeren Konzentrationen von (+)-Campher eintritt als bei der Portalvene. Zusätzlich tritt die ED_{50} unter einer Voraktivierung mit kaliumreicher Lösung erst bei höheren Konzentrationen von Campher ein als unter Voraktivierung mit Acetylcholin. Auf den gastrischen Fundus der Ratte wurde unter Voraktivierung mit Acetylcholin kein Effekt von Campher nachgewiesen.

Präparat	Voraktivierung: Acetylcholin	Voraktivierung: kaliumreiche Lösung
Magenfundus	Kein Effekt nachgewiesen n = 9	Keine Messungen durchgeführt.
Magenantrum	Hemmung der Durchschnittskraft $ED_{50} = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (n = 19)	Hemmung der Durchschnittskraft $ED_{50} = 4,9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (n = 26)
Portalvene	Hemmung der Durchschnittskraft $ED_{50} = 4,9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (n = 27)	Hemmung der Durchschnittskraft $ED_{50} = 9,3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ (n = 5)

TABELLE 11: VERGLEICH DER ED_{50} VON CAMPHER AUF DIE DURCHSCHNITTSKRAFT VERSCHIEDENER GLATTER MUSKELPRÄPARATE UNTER VERSCHIEDENEN VORAKTIVIERUNGEN.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die Durchschnittskraft von Portalvene und Antrum des Magens unter Voraktivierung mit Acetylcholin im Vergleich zu kaliumreicher Lösung bereits bei geringeren Konzentrationen von Campher eine Inhibition von 50 % zeigt. Im Vergleich der Muskelpräparate zueinander ist eine Hemmung der Spontanaktivität des Magenantrum schon bei geringeren Konzentrationen als bei der Portalvene zu erkennen. Am gastrischen Fundus konnte kein Effekt von Campher nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse zeigen eine deutliche und gleichmäßige inhibitorische Wirkung von Campher auf den gastrischen und vaskulären phasischen glatten Muskel, insbesondere auf die Kontraktionskraft. Eine Hemmung des glatten Muskels ist unmittelbar nach Applikation von Campher zu erkennen gewesen. Nach Spülung stellte sich eine normale Aktivität des Muskels ein, was eine gute Auswaschbarkeit von Campher belegt. Auf Basis dieser Informationen wurde daraufhin der genaue Wirkmechanismus untersucht.

3.2 WIRKMECHANISMUS VON CAMPHER

Das Wirkungsprofil von Campher auf die phasische Aktivität des glatten Muskels zeigte in den vorigen Versuchen eine signifikante Inhibition der Durchschnittskraft und der Maximalkraft. Die Frequenz der phasischen Aktivität wurde entweder nur leicht inhibiert oder bei starker Hemmung erhöht. Es ist kein Effekt von Campher auf die Aktivität von tonischer glatter Muskulatur nachgewiesen worden. Insgesamt ist eine Hemmung des phasischen glatten Muskels von gastrointestinalen und kardiovaskulären Organen durch Campher nachgewiesen worden. Diese Hemmung konnte sowohl bei transmittergesteuerter als auch spannungsgesteuerter Aktivierung gemessen werden. Eine Membrandepolarisation durch kaliumreiche Lösung führt hauptsächlich zu einer Aktivierung von spannungsgesteuerten L-Typ-Kalziumkanälen unter Ausschluss weiterer Aktivierungsmöglichkeiten. Eine Hemmung der erhöhten phasischen Aktivität lässt entweder auf eine direkte Inhibition von L-Typ-Kalziumkanälen oder einen indirekten Mechanismus, wie durch reflektorische Hyperpolarisation über K_{ATP} -Kanäle, schließen.

Da durch vorige Arbeiten zur Wirkung von Campher auf neuronaler Ebene eine Wirkung auf spannungsgesteuerte Kalziumkanäle sowie eine sekundäre Regulation von Kaliumkanälen vermutet wurde,⁶⁴ wurden die hemmenden Eigenschaften von Campher zunächst mit denen von K_{ATP} -Kanal-Öffnern verglichen. Hierfür wurde Campher direkt dem K_{ATP} -Kanal-Öffner Levromakalim (BRL 34915) gegenübergestellt.

Es wurde eine Kaliumtitration am glatten Muskel unter Einfluss von Campher durchgeführt. Durch die Änderung der extrazellulären Kaliumkonzentration konnte die Wirkung von Campher auf den glatten Muskel bei unterschiedlichen Membranspannungen ermittelt werden.

Im Anschluss wurde weiterhin die Wirkung von Campher auf den glatten Muskel bei einer Kalziumtitration gemessen, um eine mögliche Reversibilität des hemmenden Effektes nachzuweisen.

Schließlich wurde über die Fluoreszenzmikroskopie das Verhalten intrazellulären Kalziums der glatten Muskulatur der Portalvene unter Einfluss von Campher beobachtet.

3.2.1 VERGLEICH VON CAMPHER UND KALIUMKANALMODULATOREN

Um einen unmittelbaren Vergleich zwischen den Eigenschaften von (+)-Campher und den Eigenschaften von Kaliumkanalmodulatoren zu erzielen, wurde ein K20-K80-Test durchgeführt.

Durch eine kaliumreiche Lösung von 20 mM wird das Membranpotential des glatten Muskels depolarisiert. Levromakalim (BRL 38227) öffnet ATP-sensitive Kaliumkanäle, wodurch das

Membranpotential wieder hyperpolarisiert und somit die Spontanaktivität inhibiert wird. Der Sulfonylharnstoff Glibenclamid, welcher unter anderem zur Behandlung von Diabetes Mellitus Typ 2 verwendet wird, blockiert spezifisch ATP-sensitive Kaliumkanäle und sorgt so für die Reversibilität der hemmenden Eigenschaften des K_{ATP} -Kanal-Öffners. Mit der höchsten Konzentration von Levromakalim im Organbad war eine komplette Hemmung der Spontanaktivität der Portalvene zu beobachten.

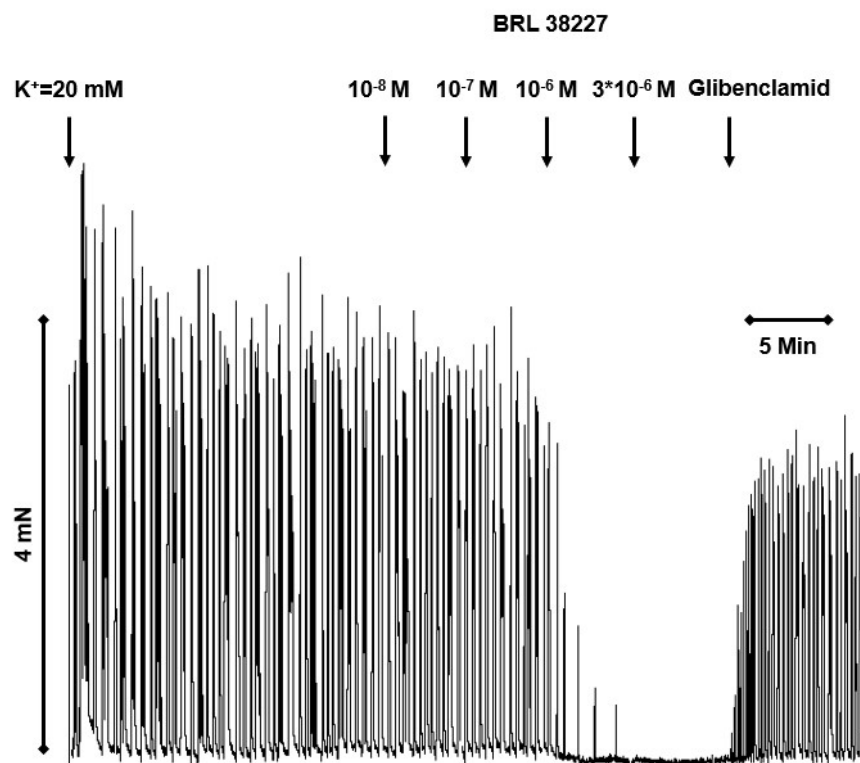


ABBILDUNG 13: ORIGINALAUFZEICHNUNG ZUR KONZENTRATIONSREIHE VON BRL 38227 MIT ANSCHLIEßENDER APPLIKATION VON GLIBENCLAMID BEI $K^+ = 20$ mM.

Levcromakalim zeigt eine hemmende Wirkung auf die phasische Aktivität der Portalvene. Glibenclamid hebt als K_{ATP} -Kanal-Blocker den Wirkmechanismus von Levromakalim teilweise auf.

Nach der Gabe von Glibenclamid zeigte sich ein Rückgang der Hemmung auf eine Maximalkraft von $81,45 \pm 4,33\%^*$, eine Durchschnittskraft von $79,66 \pm 4,58\%^*$ und eine Frequenz von $105,47 \pm 8,21\%^*$ vom Ursprungswert. Dies zeigt ein typisches Wirkmuster von Kaliumkanalöffnern.

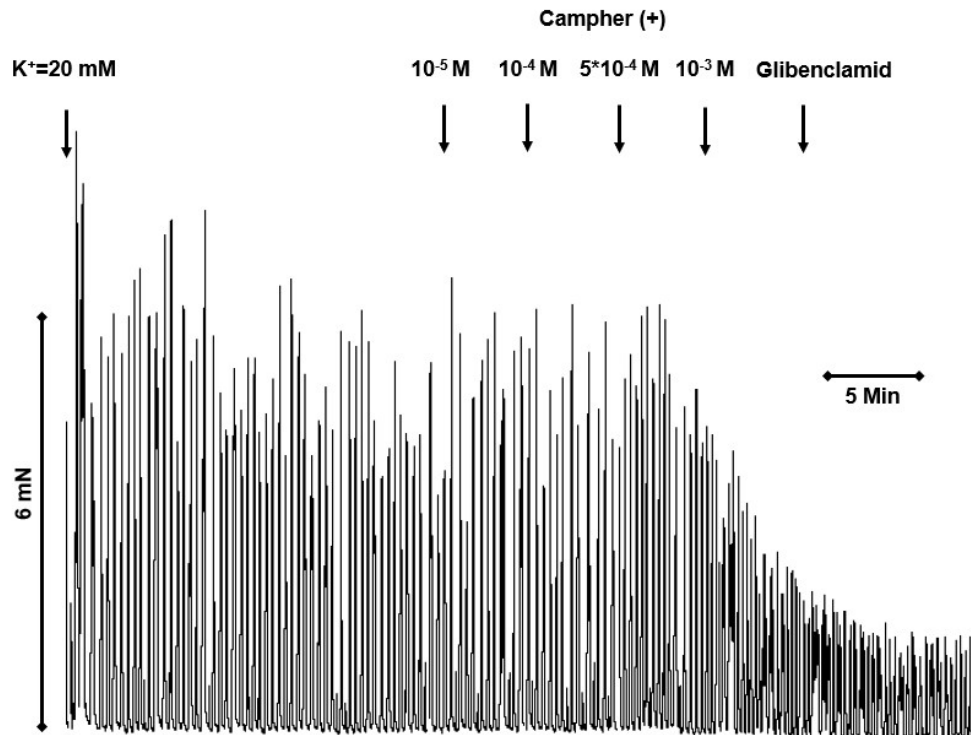


ABBILDUNG 14: ORIGINALAUFZEICHNUNG ZUR KONZENTRATIONSREIHE VON (+)-CAMPHER MIT ANSCHLIEßENDER APPLIKATION VON GLIBENCLAMID BEI $K^+ = 20 \text{ mM}$.

Der Wirkeinfluss von Campher auf die Portalvene wird nicht durch Glibenclamid aufgehoben. Die Anzahl der Versuchsreihen liegt bei $n = 5$.

Im Vergleich dazu wurde der Wirkeinfluss von Campher auf die Portalvene nicht durch Glibenclamid aufgehoben, wie es für Kaliumkanalöffner typisch ist, sondern es wurde eine fortgehende Hemmung der Aktivität des glatten Muskels beobachtet. Dieses Verhalten ist typisch für Kalziumkanalblocker.

Die Hemmung der Portalvene bei einer Konzentration von 10^{-3} M (+)-Campher reduzierte die Maximalkraft auf $51,2 \pm 3,16\%^*$, die Durchschnittskraft auf $70,28 \pm 3,13\%^*$ und erhöhte die Frequenz auf $167 \pm 11,61\%^*$ des Ursprungswertes. Die Hemmung blieb nach Applikation von Glibenclamid bestehen.

Bei einer kaliumreichen Lösung von $K^+ = 80 \text{ mM}$ ist das Membranpotential so stark depolarisiert, dass die Offenwahrscheinlichkeit von K_{ATP} -Kanälen stark erhöht ist. Zusätzlich wird durch ein Einstellen der extrazellulären Kaliumkonzentration auf 80 mM die extrazelluläre der intrazellulären Konzentration angeglichen. K_{ATP} -Kanal-Öffner zeigen dadurch keinen starken Einfluss auf die Aktivität eines glatten Muskels. Dementsprechend konnte keine Hemmung durch Levromakalim auf die Aktivität des glatten Muskels gemessen werden.

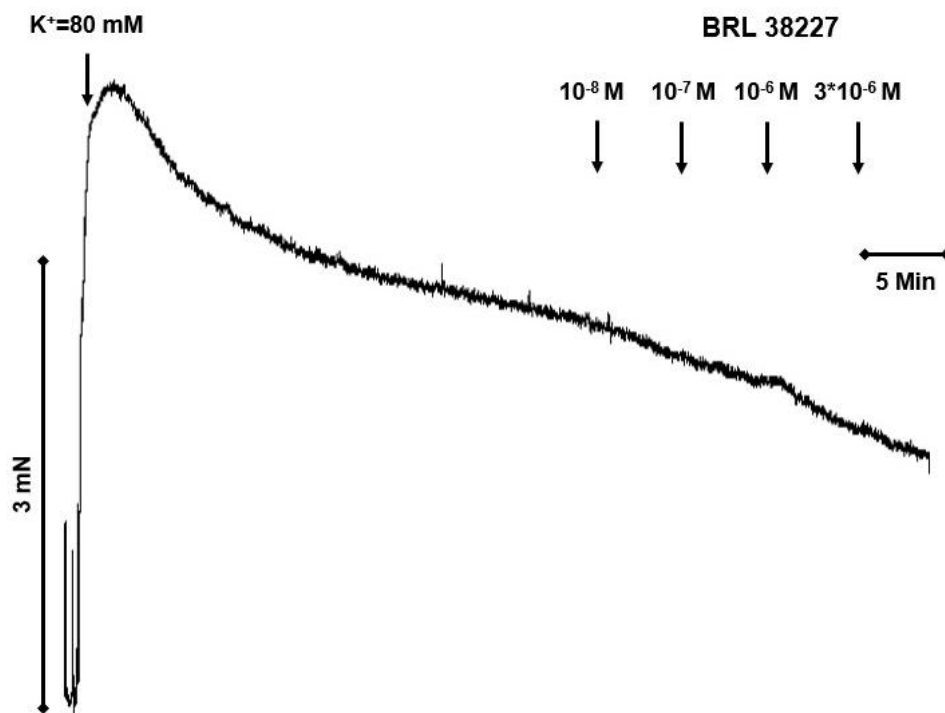


ABBILDUNG 15: ORIGINALAUFZEICHNUNG ZUR KONZENTRATIONSREIHE VON BRL 38227 BEI EINER KALIUMKONZENTRATION VON 80 mM AUF DIE PORTALVENE.

Bei einer Kaliumkonzentration von 80 mM ist bei K_{ATP}-Kanal-Öffnung kein Wirkeffekt von Levromakalim zu erkennen.

Campher zeigt am glatten Muskel nicht die Eigenschaften von K_{ATP}-Kanal-Öffnern, da bei einer Konzentration von K⁺ = 80 mM nichtsdestotrotz eine starke Hemmung der Aktivität der Portalvene zu erkennen war. Campher hemmte die tonische Aktivität der Portalvene auf 41,09±6,29%*. Dementsprechend wäre der Wirkmechanismus von Campher als K_{ATP}-Kanal-Öffner untypisch. Eine Hemmung durch Campher über eine direkte Blockade von Kalziumkanälen ist wahrscheinlicher.

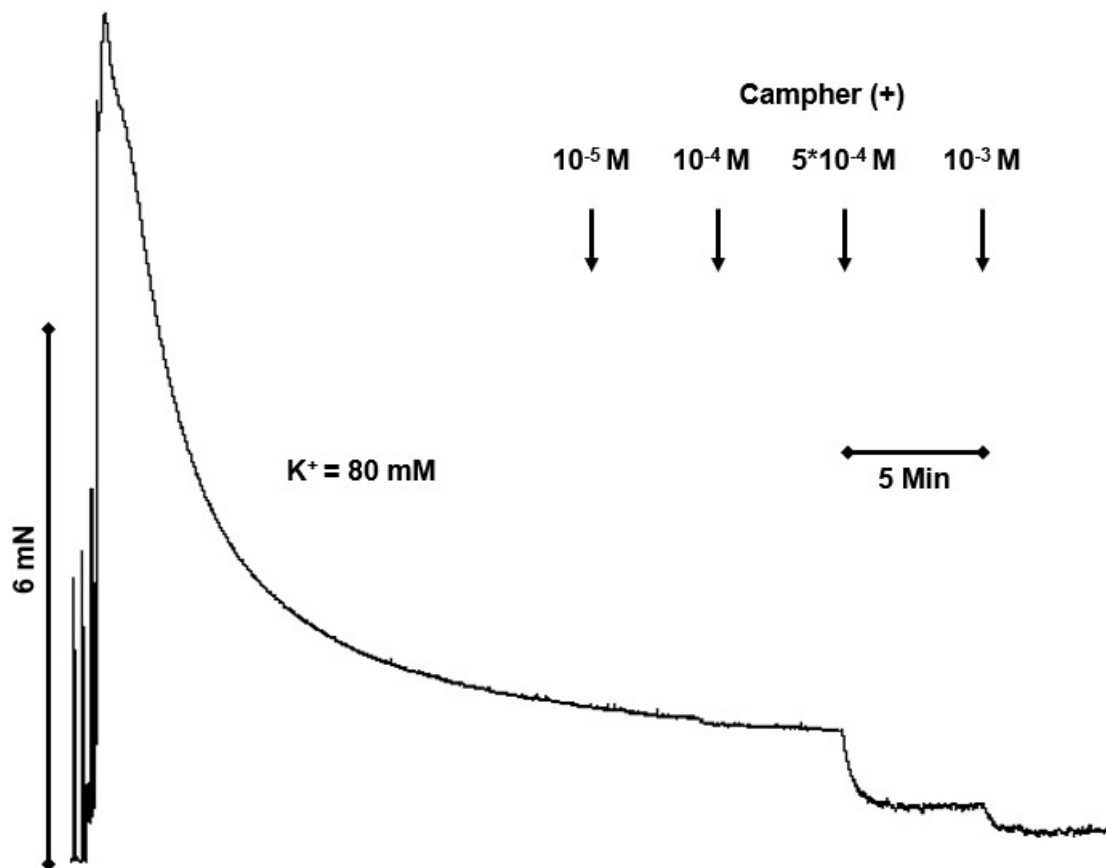


ABBILDUNG 16: ORIGINALAUFZEICHNUNG ZUR KONZENTRATIONSREIHE VON (+)-CAMPHER BEI EINER KALIUMKON-ZENTRATION VON 80 mM.

Campher zeigt bei einer Konzentration von $K^+ = 80 \text{ mM}$ eine starke Hemmung der Aktivität der Portalvene. Campher hemmt die tonische Aktivität der Portalvene auf eine Durchschnittskraft von $41,09 \pm 6,29\%$ vom Ausgangswert bei $n = 5$ Präparaten.

3.2.2 WIRKUNG VON CAMPHER BEI MEMBRANPOTENTIALVERSCHIEBUNG

Veränderungen des Membranpotentials beeinflussen die Offenwahrscheinlichkeiten spannungsabhängiger Kanäle. Um den Wirkmechanismus von Campher auf den glatten Muskel bei verschiedenen Membranpotentialen zu beobachten, wurde ein Versuch mit Veränderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration durchgeführt. Dadurch konnte eine kontinuierliche Verschiebung des extrazellulären Membranpotentials erzeugt und somit eine Annäherung an die Wirkweise von Campher gefunden werden.

Zunächst wurde die Kaliumkonzentration verringert, was zu einer Hyperpolarisation des glatten Muskels führt, danach stark erhöht, was wiederum mit einer Depolarisation des glatten Muskels einhergeht. Eine Verringerung der Kaliumkonzentration führt zu einer Abschwächung der phasischen Aktivität des glatten Muskels. Bei einer Kaliumerhöhung kommt es bei der Portalvene zuerst zu einer stärkeren phasischen Aktivität, ab einer Konzentration von $K^+ \approx 30$ mM kommt es zu einem Spasmus der Portalvene und es ist eine gleichmäßige tonische Kontraktion zu beobachten. Der Versuch wurde dann zur Kontrolle an einer Portalvene ohne Campher durchgeführt.

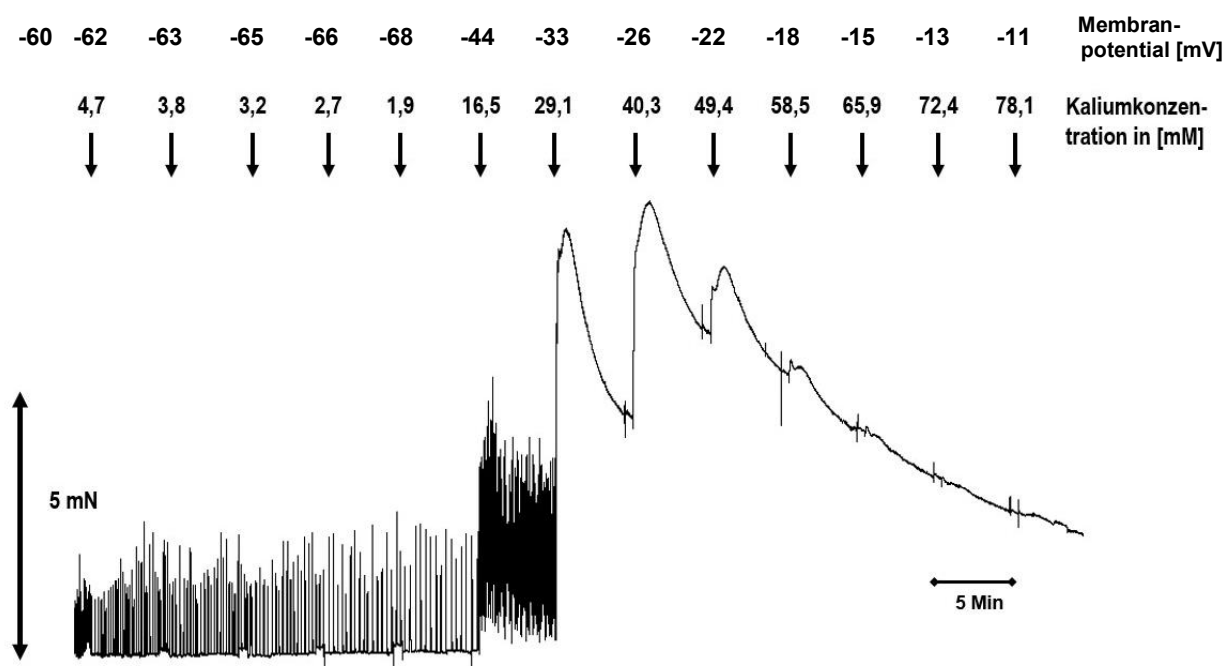


ABBILDUNG 17: ORIGINALAUFZEICHNUNG ZUR KONZENTRATIONSREIHE VON KALIUM OHNE CAMPHER.

In der Originalaufzeichnung ist zunächst eine Verminderung der phasischen Aktivität des glatten Muskels der Portalvene durch Verminderung der Kaliumkonzentration zu erkennen. Bei Erhöhung der Kaliumkonzentration ist eine Verstärkung der phasischen Kontraktion und im Anschluss eine Dauerkontraktion ab einer Kaliumkonzentration von 29,1 mM (\triangleq -33 mV, s. Tabelle 5) zu erkennen. Die Maximalkraft der Portalvene ist am höchsten bei einer Kaliumkonzentration von durchschnittlich 40,3 mM (\triangleq -26 mV, s. Tabelle 5).

Die Hemmung der Portalvene durch Campher bei unterschiedlichen Membranpotentialen zeigte eine gleichmäßige Hemmung des glatten Muskels. Die phasische Aktivität des glatten Muskels wurde in kaliumarmer Lösung fast komplett aufgehoben. Eine Dauerkontraktion der Portalvene war wie in der Kontrolle ab einer Konzentration von $K^+ = 29,1$ mM (\triangleq -33 mV, s. Tabelle 5) zu erkennen. In der Kontrolle wie unter Camphereinfluss wurde die stärkste

Kontraktion des glatten Muskels bei einer Konzentration von $K^+ = 40,3 \text{ mM}$ ($\triangleq -26 \text{ mV}$, s. Tabelle 5) gemessen.

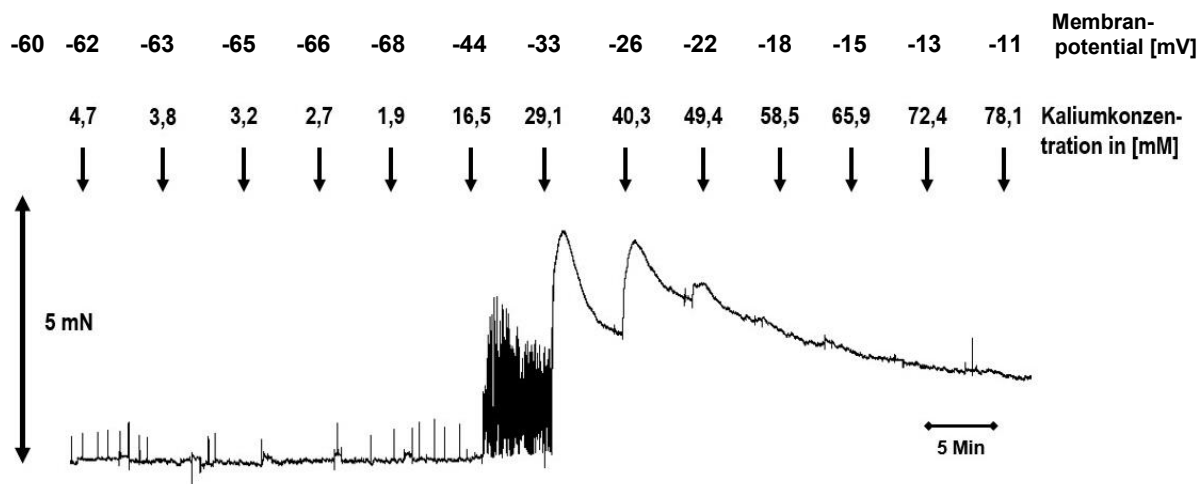


ABBILDUNG 18: ORIGINALAUFZEICHNUNG ZUR KONZENTRATIONSREIHE VON KALIUM BEI EINER KONZENTRATION VON CAMPHER BEI $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

Es ist eine gleichmäßige Hemmung der Aktivität des glatten Muskels unter Einfluss von Campher zu erkennen, wobei hier wiederum das Muster des Aktivitätsverhaltens dem der Kontrollversuche bei verminderter Maximal- und Durchschnittskraft entspricht.

Insgesamt wurde bei der Messung der Durchschnittskraft im Verhältnis zur Kontrolle eine Hemmung durch Campher auf maximal $26,05 \pm 0,3\%*$ bei der physiologischen Konzentration von $5,9 \text{ mM}$ Kalium ($\triangleq -60 \text{ mV}$) gezeigt. Bei der maximalen Durchschnittskraft der Portalvene wurde einer Hemmung der Aktivität auf $56,1\% \pm 10,2\%*$ bei einer Kaliumkonzentration von $40,3 \text{ mM}$ ($\triangleq -26 \text{ mV}$) gemessen. Die Anzahl der Versuche lag bei $n = 4$.

Bei hohen Kaliumkonzentrationen (ab ca. 60 mM) glich sich die Aktivität des glatten Muskels unter Camphereinfluss der Kontrolle an. Zur Veranschaulichung der Hemmung der Portalvene durch Campher wurde ein Graph der Durchschnittskraft des glatten Muskels im Verhältnis zur Kaliumkonzentration erstellt (Abb. 15). Hier zeigt sich eine maximale Hemmung des glatten Muskels bei $K^+ = 40,3 \text{ mM}$ sowie eine Angleichung der Aktivität bei höheren und niedrigeren Kaliumkonzentrationen in Richtung der Kontrolle.

Das Muster des hemmenden Einflusses von Campher auf den glatten Muskel der Portalvene bei Membranpotentialverschiebung gleicht dem Muster der Wirkung von Kalziumkanalhemmern durch Beeinflussung des Membranpotentials.⁷⁴

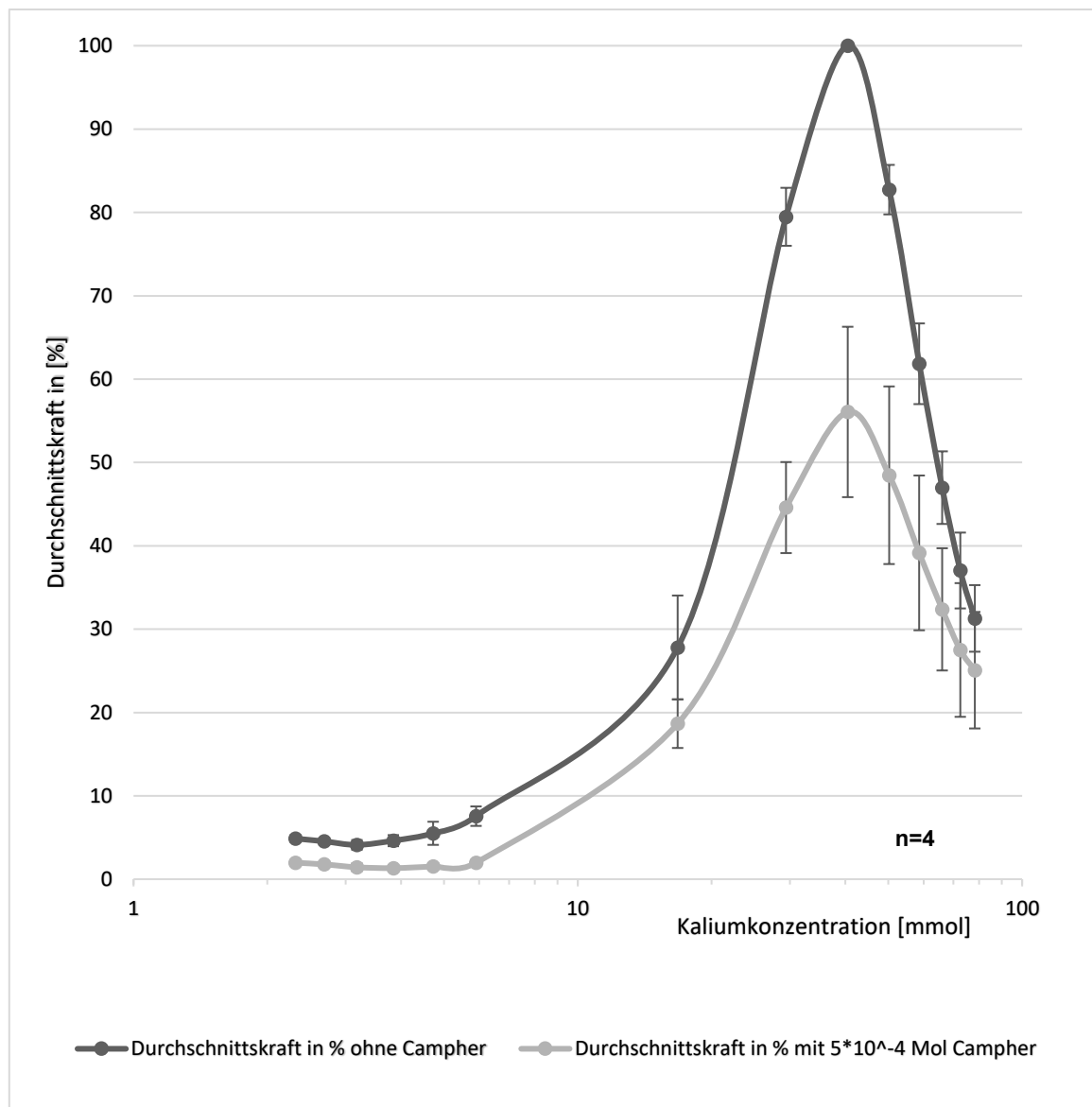


ABBILDUNG 19: VERGLEICH DER DURCHSCHNITTSKRAFT DER PORTALVENE MIT UND OHNE 10^{-4} M CAMPHER UNTER VERSCHIEDENEN KALIUMKONZENTRATIONEN.

Der Graph zeigt, dass Campher bei unterschiedlichen Membranpotentialen ein gleichmäßiges Verhältnis der Hemmung auf den glatten Muskel aufweist.

*Bei der Messung der Durchschnittskraft im Verhältnis zur Kontrolle wurde eine Hemmung durch Campher auf maximal $26,05 \pm 0,3\%$ * bei 5,9 mM Kalium ($\triangleq -60$ mV, s. Tabelle 5) festgestellt. Bei der Messung der maximalen Durchschnittskraft der Portalvene wurde eine Reduktion auf $56,1\% \pm 10,2\%$ * bei einer Kaliumkonzentration von 40,3 mM ($\triangleq -26$ mV, s. Tabelle 5) festgestellt. Die stärkste Hemmung der Durchschnittskraft ist somit auch bei der höchsten Durchschnittskraft der Portalvene (bei $K^+ = 40,3$ mM) zu erkennen. Die Anzahl der Versuchsreihen liegt bei $n = 4$. Die Wirkung von Campher zeigt sich hier signifikant im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$).*

3.2.3 WIRKUNG VON CAMPHER AUF DIE PORTALVENE BEI MODULATION VON EXTRAZELLULÄREM KALZIUM

Um eine mögliche Reversibilität des Wirkmechanismus von Campher bei Veränderung der Kalziumkonzentration zu testen, wurde der Einfluss von Campher auf den glatten Muskel bei Kalziumtitration gemessen. Begonnen wurde mit einer kalziumarmen Lösung mit $\text{Ca}^{2+} = 1 \text{ mM}$, in die Kalzium in Schritten von $\text{Ca}^{2+} = 0,2 \text{ mM}$ auftitriert wurde.

Bei anfänglichen Kalziumkonzentrationen im physiologischen Bereich ($\triangleq 2,5 \text{ mM}$) konnten Wirkeffekte von Campher erst bei hohen Titrationswerten gemessen werden, weshalb eine niedrige anfängliche Kalziumkonzentration (1 mM) gewählt wurde. Hierdurch wurde die Aktivität des glatten Muskels zwar zunächst durch die verminderte Konzentration extrazellulären Kalziums gehemmt, konnte durch die nachfolgende Erhöhung aber schnell wiederhergestellt werden.⁷⁵ Dadurch wurde eine bessere Darstellung des Effektes von Campher ermöglicht.

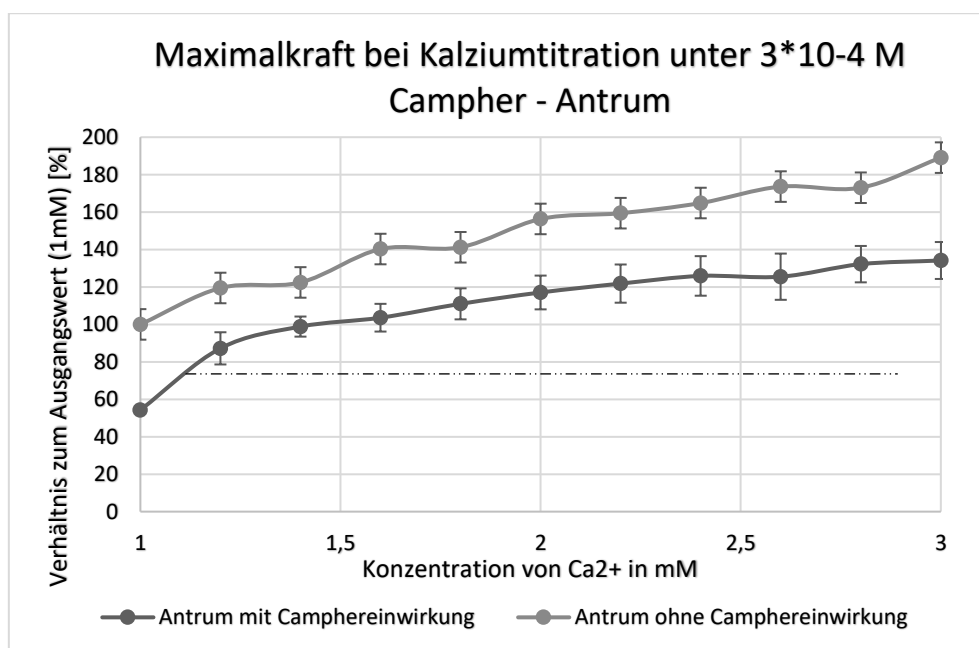


ABBILDUNG 20: WIRKUNG VON CAMPHER AUF DAS MAGENANTRUM BEI MODULATION VON EXTRAZELLULÄREM KALZIUM.

Die Hemmung von Campher auf das gastrische Antrum zeigt unter Kalziumtitration ein parallel zur Kontrolle versetztes Wirkmuster. Bei einer Konzentration von $\text{Ca}^{2+} = 1,4 \text{ mM}$ ist die Aktivität des gastrischen Antrum mit einer Hemmung durch Campher gleich der Aktivität der Kontrolle bei einer Konzentration von $\text{Ca}^{2+} = 1 \text{ mM}$. Die Aktivität des glatten Muskels unter Hemmung mit (+)-Campher zeigt ein ähnliches Muster wie das der Kontrolle mit einer konstanten Hemmung von je ca. 30-40% im Vergleich zur Kontrolle bei gleicher Kalziumkonzentration. Das Ergebnis zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) bei einer Versuchsanzahl von $n = 6$.

Die Wirkung von Campher auf das gastrische Antrum war ab einer Konzentration von $\text{Ca}^{2+} = 1,4 \text{ mM}$ im Vergleich zur initialen Kalziumkonzentration aufgehoben.

Die Aktivität der Portalvene mit Campher in der Konzentration $3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ bei $\text{Ca}^{2+} = 1,2 \text{ mM}$ gleicht dem Wert der Kontrolle mit einer Konzentration von $\text{Ca}^{2+} = 1 \text{ mM}$.

Bei der Titration von Kalzium ist ein im Verhältnis zur Kontrolle gleiches, aber schwächeres Aktivitätsmuster von je Maximalkraft, Durchschnittskraft und Frequenz zu erkennen.

Insgesamt konnte eine gleichmäßige Hemmung des glatten Muskels unter Campher im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Wirkmechanismus wahrscheinlich kaliumunabhängig und kalziumabhängig ist. Um den Wirkmechanismus von Campher näher beschreiben zu können, wurden die Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration unter (+)-Campher mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie gemessen.

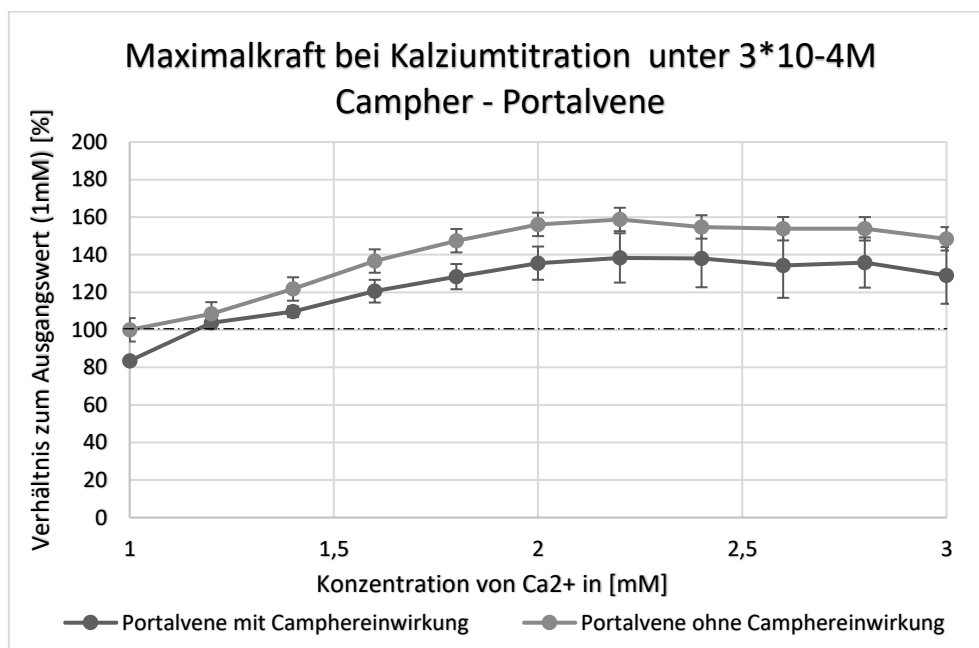


ABBILDUNG 21: WIRKUNG VON CAMPHER AUF DIE PORTALVENE BEI MODULATION VON EXTRAZELLULÄREM KALZIUM.

Der Effekt von Campher auf die Portalvene bei $\text{Ca}^{2+} = 1,2 \text{ mM}$ gleicht dem Wert von 1 M Ca^{2+} der Kontrolle. Die Aktivität des glatten Muskels unter Hemmung mit (+)-Campher gleicht sich zunächst der Kontrolle an. Insgesamt ist bei weiterer Titration eine Minderung der Wirkung um ca. 20 % im Vergleich zur Kontrolle bei gleicher Kalziumkonzentration zu sehen. Das Ergebnis zeigt signifikante Unterschiede ($p = 0,05$) bei der Anzahl $n = 4$.

3.2.4 WIRKUNG VON CAMPHER AUF DIE PORTALVENE BEI RÄUMLICH-ZEITLICHER DARSTELLUNG EINES INTRAZELLULÄREN KALZIUMSIGNALS MITTELS FLUORESZENZMIKROSKOPIE

Für eine Messung der Wirkung von Campher auf intrazellulärer Ebene wurde die Methode der Fluoreszenzmikroskopie mit dem Indikator Fluo-3 gewählt. So kann mithilfe einer räumlich-zeitlichen Darstellung von intrazellulären Kalziumsignalen ein direkter Nachweis eines Einflusses von Campher auf das intrazelluläre Kalzium des glatten Muskels der Portalvene erbracht werden. Die Messungen wurden unter Aktivierung der Portalvene mit kaliumreicher Lösung ($K^+ = 20 \text{ mM}$) durchgeführt.

Bei Bolusapplikation von Campher zeigt der glatte Muskel zunächst eine leichte Erhöhung des Kalziumsignals von ca. 50 s, bevor eine Hemmung des intrazellulären Kalziumsignals zu erkennen ist.

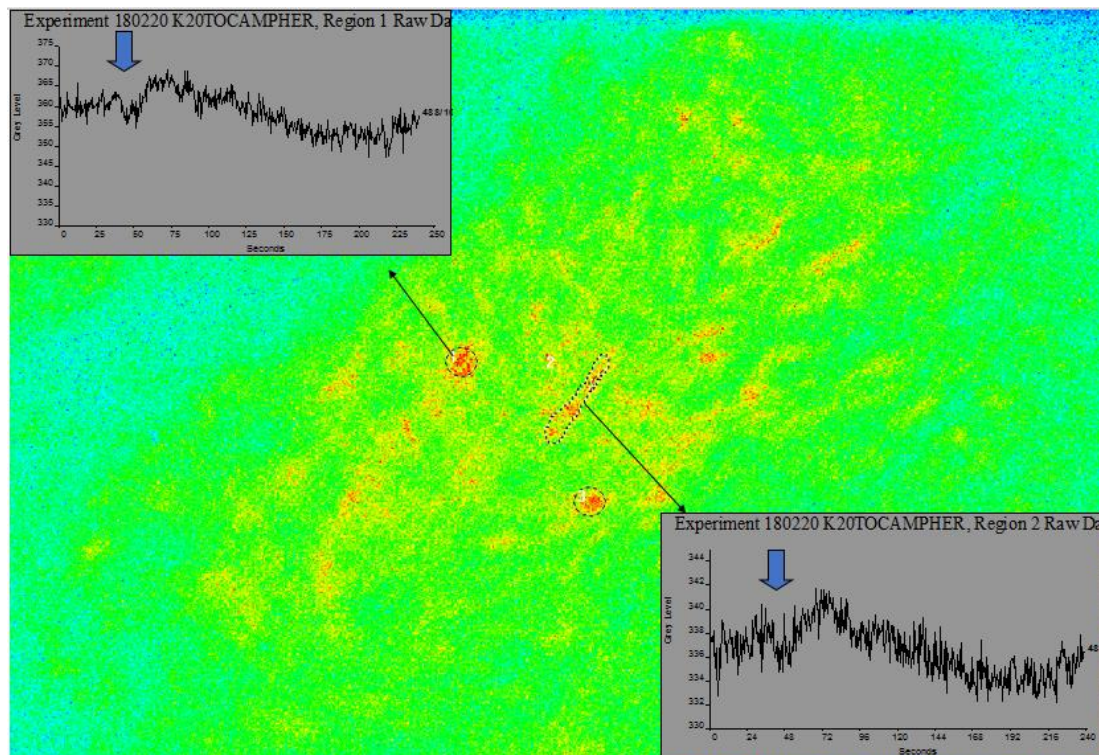


ABBILDUNG 22: WIRKUNG VON CAMPHER AUF DIE PORTALVENE BEI RÄUMLICH-ZEITLICHER DARSTELLUNG VON INTRAZELLULÄREN KALZIUMSIGNALEN MITTELS FLUORESZENZMIKROSKOPIE.

Bild einer Messung des glatten Muskels der Portalvene mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Die roten Flächen zeigen eine erhöhte Konzentration des intrazellulären Kalziums. Gemessen wurden Regions of Interest (ROI) mit einem starken initialen Kalziumsignal. Es ist zusätzlich die graphische Darstellung der Fluoreszenzaktivität der ROIs des Präparates in Abhängigkeit der gemessenen Zeit dargestellt. Der blaue Pfeil markiert den Zeitpunkt der Applikation von Campher.

Insgesamt ist bei einem hohen intrazellulärem Kalziumsignal und dadurch einer höheren gemessenen Spontanaktivität der Präparate eine höhere Inhibition des intrazellulären Kalziumsignals durch Campher beobachtet worden.

Verglichen wurde in den Messungen der Median einer 20-sekündigen Periode der initialen K20-Voraktivierung mit dem Median einer 20-sekündigen Zeitspanne nach Bolusgabe von Campher in dem gemessenen Zeitabschnitt „K20toCampher“. Es wurde ein Median als Messparameter ausgewählt, da in den erfassten Daten oft ein „Hintergrundrauschen“ (d.h. ein Graph mit sehr wechselhaften Messwerten) durch die verschiedenen Muskelschichten des Präparates zu sehen war und so starke Ausschläge des Hintergrundrauschens besser in den Rechnungen ausgeblendet werden konnten.

Bei der Erhebung wurden nur Kalziumsignale berücksichtigt, wenn bei der Voraktivierung Signale von >250 Grey-Leveln im Median gemessen werden konnten, da ein niedrigeres Kalziumsignal eine zu niedrige Ausgangssignalstärke zur Darstellung eines Effektes durch Campher auf den glatten Muskel liefert.

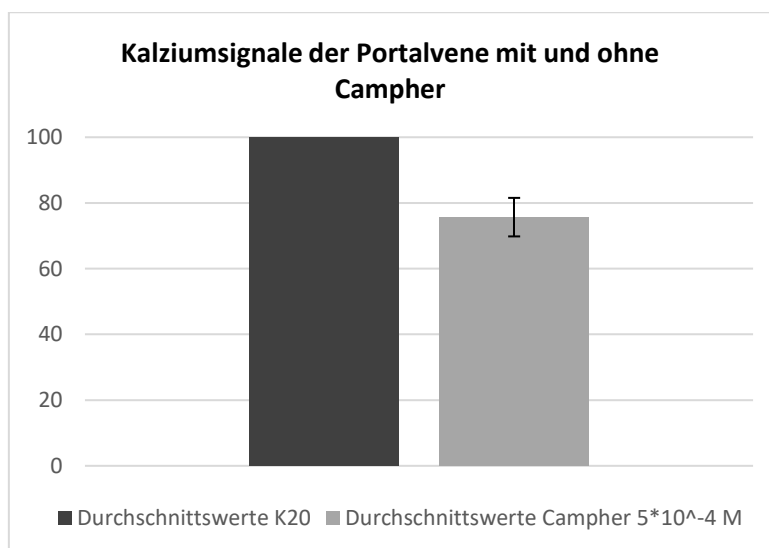


ABBILDUNG 23: VERGLEICH DER KALZIUMSIGNALE DER PORTALVENE MIT UND OHNE CAMPHER IN DER KONZENTRATION $5 \cdot 10^{-4}$ M.

Die Werte zeigen die Signalstärke des Fluoreszenzsignal der Portalvene vor und nach Applikation von $5 \cdot 10^{-4}$ M (+)-Campher. Hier zeigt sich eine Hemmung der gemessenen Aktivität des glatten Muskels auf durchschnittlich $75,6 \pm 5,8$ %. Diese Hemmung gilt bei $n = 6$ Präparaten als signifikant ($p = 0,05$).

Bei direkter Gabe von $5 \cdot 10^{-4}$ M (+)-Campher auf den glatten Muskel im Organbad war eine Hemmung der Fluoreszenzaktivität ca. 100 s nach Applikation zu erkennen. Bei den gemessenen Präparaten mit ausreichendem Kalziumsignal von >250 Grey-Leveln ($n = 6$) betrug die Hemmung des Kalziumsignals durchschnittlich $24,4 \pm 5,8\%^*$. So führte die

Applikation von Campher auf den glatten Muskel insgesamt zu einer intrazellulären Kalziumverminderung.

4 DISKUSSION

Das Ziel dieser Arbeit ist die Analyse der Wirkung von Campher auf den glatten Muskel verschiedener Organe, um somit auf den zellulären Wirkmechanismus schließen zu können. Zunächst wurde ein potentieller Wirkunterschied der Enantiomere von Campher untersucht. Im Anschluss wurden weitere Experimente zur Wirkung und schließlich dem Wirkmechanismus von (+)-Campher durchgeführt. Die Untersuchungen des gastrischen Antrum, des Fundus und der Portalvene der Ratte erfolgte mithilfe der Organbadmethode sowie der Fluoreszenzmikroskopie.

4.1 DISKUSSION DER METHODIK

Die Methodik der Versuche unterteilt sich in mehrere große Teilgebiete. Die Organbadmethode ist eine bewährte Methode zur direkten Untersuchung und Messung des Aktivitätsverhaltens von Organen auf multizellulärer Ebene unter *in-vitro*-Bedingungen. Mit ihr wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ermittelt sowie die Methodik der Kalzium-Titration und der Kalium-Titration durchgeführt. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden *in-vitro*-Messungen der zytosolischen Kalziumkonzentration an einzelnen Zellgebieten getätigt.

4.1.1 ORGANBADMETHODE

Das Organbad ist besonders gut geeignet, um die direkte Wirkung eines Stoffes auf ein Gewebe im physiologischen Milieu beurteilen zu können. Um Messfehler zu reduzieren und für eine kontinuierliche Aktivität des glatten Muskels zu sorgen, wurden verschiedene Aspekte in der Methodik berücksichtigt.

Für eine gute Vergleichbarkeit und den bestmöglichen Erhalt der Vitalität der Gewebe wurden Magen und Portalvene unmittelbar nach der Dekaptierung der Wistar-Ratten entnommen und in einer gekühlten Präparierlösung zum Transport und zur Präparation aufbewahrt. Die Eigenschaft der Präparierlösung, pH-Schwankungen zu puffern, ist nützlich, um bei möglichem Austritt von Magensäure ein stabiles extrazelluläres Milieu zu garantieren und so potenzielle Schädigungen des Gewebes zu vermeiden. Die Präparation der Muskelschichten erfolgte entlang der Fasern, um das bestmögliche Kontraktionsverhalten der Gewebspräparate zu erhalten, sowie in gleich große Streifen, um eine gute Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Versuche zu gewährleisten. Schwankungen der Dicke der Präparate können nicht

behalten werden, da diese abhängig von der Beschaffenheit der individuellen Organe ist. Zur Präparation von Antrum und Fundus des Magens erfolgte eine Entnahme der äußeren Muskelschicht, damit eine Beschädigung der Schleimhaut möglichst vermieden wird. So konnten mögliche Einflüsse von Botenstoffen, die in der Mukosa entstehen und einen Einfluss auf die Aktivität der Muskelschichten haben, vermieden werden.

Der Transducer wurde vor jedem Versuch mit einem Eichgewicht kalibriert, damit mögliche Messfehler minimiert wurden.

Im Organbad befanden sich die Präparate in vorgewärmter Krebslösung. Die Krebslösung ist eine physiologische Elektrolytlösung zur Maximierung der Vitalität und Aktivität der Präparate. Sie wurde so erwärmt, dass die Temperatur, während sich das Präparat im Organbad befand, konstant bei 38 °C lag. Zusätzlich wurde der Krebslösung durchgehend Carbogen zugeführt, um den natürlichen pH-Wert von 7,4 zu erhalten und eine eventuelle Sedimentierung von Salzen in Lösung zu vermeiden. So wurde ein möglichst physiologisches Milieu geschaffen, um Spontanaktivität und Reaktionsfähigkeit des glatten Muskels *in vitro* zu beobachten.^{76,77}

Zur Gewöhnung des Präparates an das neue Milieu nach Präparation wurde vor Beginn der Versuchsreihe eine Wartezeit von ca. 1,5 h gewählt. Dadurch wurden eine konstante Spontanaktivität sowie eine gleichbleibende Reaktion auf Aktivierung und Hemmung des glatten Muskels sichergestellt. Zum besseren Vergleich der Versuchsreihen und zum Erhalt der Reproduzierbarkeit wurden die Applikationen und Spülungen des Muskelpräparates zeitlich in gleichbleibenden Intervallen durchgeführt. Zusätzlich wurde zur Auswertung ein spezifisches Zeitintervall an einem genauen Zeitpunkt nach Applikation der verschiedenen Wirkstoffe gewählt, um Messfehler zu minimieren.

Die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung

Die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung wurde als mathematische Annäherung des Membranpotentials genutzt. Das Membranpotential einer Zelle wird insbesondere durch extrazelluläre Kaliumveränderungen beeinflusst. Die Permeabilitäten und intrazellulären Elektrolytkonzentrationen wurden aus einer vorigen Arbeit von Lammel et al. am Magenfundus eines Meerschweinchens entnommen.⁵³ Hier können gewisse Abweichungen der intrazellulären Elektrolytkonzentrationen vorhanden sein, jedoch sind diese bei geringem Einfluss auf die Veränderung des Membranpotentials zu vernachlässigen, da genaue Angaben für das extrazelluläre Kalium als Hauptfaktor für die Änderung des Membranpotentials vorliegen.

Ermittlung der ED₅₀ von Campher bei verschiedenen Organen

Mithilfe einer gängigen Boltzmann-Funktion wurde ermittelt, bei welcher Konzentration von rechtsdrehendem Campher eine Hemmung der Aktivität des glatten Muskels von 50 % besteht. Hierbei wurden über die sigmoidale Funktion die Parameter ED₅₀ und „slope factors“ so angeglichen, dass die Messwerte die kleinstmögliche Differenz zum Quadrat zu den errechneten Werten der Sigmoidkurve haben. Hierbei können die Steigung und die ED₅₀ durch eine niedrige Hemmung der Aktivität der glatten Muskulatur eine niedrigere Aussagekraft haben als bei Messungen, bei denen etwa eine komplette Inhibition des glatten Muskels ermöglicht wurde. Darüber hinaus kann die ED₅₀ einer Dosis-Wirkungs-Kurve durch weitere Bedingungen wie Temperatur oder Art bzw. Stärke der Voraktivierung beeinflusst werden.

4.1.2 FLUORESZENZMIKROSKOPIE

Die Fluoreszenzmikroskopie erlaubt eine direkte Messung der intrazellulären Kalziumaktivität durch die Fluoreszenz des Indikatorfarbstoffes Fluo-3. Kalziumgebundenes Fluo-3 kann durch Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden, woraufhin es ein Fluoreszenzsignal mit einer Wellenlänge von 525 nm ausstrahlt. Das emittierte Licht wird dann mit einer CCD-Kamera gemessen.

Die Präparation der Portalvene erfolgte, wie für die Organbadmethode, direkt nach der Dekaptierung der Wistar-Ratte. Zur Präparation und Anfärbung wurde die Portalvene stets mit Präparationslösung gekühlt, um die Vitalität bestmöglich zu erhalten.

Der Farbstoff, Fluo-3, muss in die Muskelzelle transportiert werden, um ein intrazelluläres Signal anzeigen zu können. Trotz strikter Einhaltung des Anfärbeprotokolls unter Verwendung einiger Hilfsmittel zeigten einige Gewebsschnitte jedoch keine oder nur ungenügende Signale. Es wurden daher nur angefärbte Präparate mit adäquater Signalübertragung von Beginn bis zur letzten Kontrolle verwendet.

Trotz der Ähnlichkeiten zum experimentellen Aufbau der Organbadmethode wurden Anpassungen und Optimierungen durchgeführt, um Veränderungen des extrazellulären Milieus weiter zu minimieren und den Erhalt der Vitalität der Portalvene bis zum Versuchsende zu maximieren. Zum einen wurden die Lösungen sowohl in den Aufbewahrungsbehältern als auch im Organbad mit Carbon begast. Weiterhin sorgte das Pumpsystem dafür, dass während der gesamten Versuchszeit frische Krebslösung in das Organbad gelangte und die alte ausgetauscht wurde, um gleichmäßige Versuchsbedingungen zu erhalten. Darüber hinaus konnten durch die Vorwärmung der verschiedenen Lösungen im Wärmebad sowie die direkte

Erwärmung des Organbades mit konstanter Temperaturmessung eine gleichmäßige Temperatur und gleichbleibende Versuchsbedingungen ermöglicht werden.

Zur verbesserten Aufnahme und Einsicht der Signalwirkung des intrazellulären Fluo-3 wurde am Objektiv Immersionsöl appliziert. Weiterhin wurde eine Änderung an der ursprünglichen Versuchsdurchführung zur Applikation von Campher gemacht. Anstatt Campher in kaliumreicher Lösung von $K^+ = 20 \text{ mM}$ in einem Vorratsbehälter anzumischen und die Versuchslösung über das Pumpsystem zu applizieren, wurde Campher als Bolus direkt in das Organbad pipettiert. Dadurch konnte eine direkte Veränderung des intrazellulären Kalziumsignals beobachtet und besser verglichen werden. Weiterhin wurden Ungenauigkeiten durch Auswaschung mit dem Pumpsystem oder Ungenauigkeiten der Konzentration von Campher vermieden und eine stärkere Ausbleichung bzw. verminderte Aktivität des glatten Muskels durch schnellere Applikation und Möglichkeit der Messung der Muskelaktivität verhindert.

Um zusätzlich eine Signalminderung durch Ausbleichen aufgrund des Lasers zu vermeiden, wurde die Intensität des Lasersignals so gewählt, dass eine Signalwahrnehmung des Fluoreszenzsignals gerade noch gut möglich war. Die Versuchsdurchführung wurde so kurz wie möglich gehalten. Im Anschluss wurde der Versuch wiederholt, um eine gleichbleibende Signalstärke einsehen zu können.

Es wurden konstante Zeitintervalle zur Messung des Fluoreszenzsignals bestimmt, wobei der Laser die Präparate nur zur Zeit der Messintervalle bestrahlte. Die Auswertung erfolgte auch anhand bestimmter, gleicher Zeitintervalle, um eine bestmögliche Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit zu gewährleisten.

Mit Fluo-3 als Farbstoff kann keine ratiometrische Angabe zur Senkung des Kalziumsignals gemacht werden.⁷⁸ Weiterhin müssen bei der Messung potentielle Ungenauigkeiten durch die Signalwirkung mehrerer Zellschichten eines Gewebes und dem daraus resultierenden Grundrauschen berücksichtigt werden.

Um zwei Zeitintervalle vergleichen zu können, mussten Ungenauigkeiten der Messwerte durch das Hintergrundrauschen minimiert werden. Dafür wurde für jedes Intervall repräsentativ der Median der gemessenen Werte verwendet.

Zur statistischen Auswertung der verschiedenen Stichproben wurden das arithmetische Mittel der verschiedenen Medianwerte der Stichproben, die Standardabweichung, der Standardfehler und eine ANOVA gewählt.

4.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

4.2.1 WIRKUNG VON CAMPHER AUF DEN GLATTEN MUSKEL VERSCHIEDENER ORGANE

Obwohl Campher viel erforscht wurde, wurde der Naturstoff hauptsächlich in Bezug auf seine Toxizität und seine Reaktion auf der dermalen Ebene, hier besonders die Sensibilität und Kälteempfindung, beschrieben.^{4,59,60,79} Pharmakologisch werden dem Naturstoff vasodilatierende⁸⁰, antitussive⁵⁷ und analgetische⁵⁸ Eigenschaften zugeschrieben. Zusätzlich wird (+)-Campher heute noch therapeutisch bei orthostatischer oder hypotensiver Dysregulation eingesetzt.⁸¹

Die direkte Wirkung von Campher auf den glatten Muskel wurde von Lis-Balchin und Hart 1997 *in vitro* durch Feldstimulation am Ileum des Meerschweinchens erforscht. Ihre Ergebnisse zeigten, dass sich die neural induzierten Zuckungen des Muskels unter einer Konzentration von Campher von $2 \cdot 10^{-5}$ M und 10^{-4} M verstärkten.⁶³ Bei vorigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte hingegen gezeigt werden, dass Camphenol, ein Campher enthaltendes Arzneimittel, sowohl bei humoraler Stimulation als auch bei Aktivierung durch Depolarisation eine Relaxation glatter Muskeln des kardiovaskulären Systems hervorruft.⁶

Um die Wirkung von Campher auf die glatte Muskulatur zu ermitteln wurde die Aktivität der Präparate mit Acetylcholin oder kaliumreicher Lösung induziert. Acetylcholin wurde verwendet, um einen möglichen Einfluss von Campher auf den glatten Muskel unter humoraler Voraktivierung zu zeigen und damit einen Einfluss auf die Aktivität, die über intrazelluläre Kaskaden und Membrankanäle generiert wird, zu beschreiben. Unter kaliumreicher Lösung kann ein Einfluss auf eine spannungsgesteuerte Aktivierung unter Ausschluss weiterer Einflussfaktoren gezeigt werden. Eine spannungsgesteuerte Aktivierung des glatten Muskels führt hauptsächlich zu einer Öffnung von spannungsgesteuerten L-Typ-Kalziumkanälen.¹⁶ Durch Präparation einer isolierten Muskelschicht wurde keine Wirkung von Campher auf neurogener Ebene gemessen. Zusätzlich wurde die Vorspannung des Muskelpräparates nach Beginn der Versuche nicht verändert, weshalb weiterhin keine mechanischen Aktivierungen auf den glatten Muskel ausgeübt wurden. Gemessen wurde also besonders die Auswirkung von Campher auf humoraler und myogener Ebene des glatten Muskels.

Es zeigte sich sowohl bei transmittergesteuerter als auch spannungsgesteuerter Aktivierung eine starke Hemmung der phasischen Aktivität. Dementsprechend lässt sich vermuten, dass Campher entweder eine direkte Hemmung spannungsgesteuerter L-Typ-Kalziumkanäle oder eine indirekte Hemmung über Öffnung von ligandengesteuerten K_{ATP} -Kanälen, die wiederum zu einer Schließung von L-Typ-Kalziumkanälen führt, bewirkt. Die Effekte von Campher auf spannungsgesteuerte Kalzium- und Kaliumkanäle werden in der Arbeit von Vatanparast et al. anhand ihrer Untersuchung des ösophagealen Ganglions beschrieben.⁶⁴

4.2.2 EINFLUSS VON CAMPHER AUF DEN GLATTEN MUSKEL DES GASTROINTESTINALTRAKTES

Zunächst wurde die Wirkung von Campher auf unterschiedliche Organe der Wistar-Ratte untersucht. Aus dem Gastrointestinaltrakt wurden gastrisches Antrum und Fundus untersucht, um Beispiele für phasische als auch tonische Muskulatur, respektive, zu haben.

Hierbei zeigte sich eine signifikante Hemmung der phasischen Aktivität des gastrischen Antrum durch Hemmung der Maximalkraft und Hemmung der Durchschnittskraft. Die Frequenz der phasischen Aktivität wurde durch Campher zunächst nur leicht reduziert. Bei höheren Konzentrationen von Campher konnte teilweise eine Frequenzsteigerung der phasischen Aktivität nachgewiesen werden. Die hemmende Eigenschaft von Campher auf den glatten Muskel des gastrischen Antrum konnte sowohl unter Voraktivierung mit Acetylcholin, als auch unter Voraktivierung mit kaliumreicher Lösung nachgewiesen werden.

Der gastrische Fundus wurde unter einer Voraktivierung von 10^{-6} M Acetylcholin bis zu einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-4}$ M Campher getestet. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Effekt von Campher auf die phasische Aktivität der glatten Muskulatur. Bei einer Aktivierung des Magenfundus mit erhöhten Konzentrationen von Acetylcholin wird vor allem die intrazelluläre Signalkaskade über eine Aktivierung des IP_3 -Weges und somit intrazelluläres Kalzium genutzt.^{82,83} Zusätzlich gilt der Tonus des gastrischen Fundus als elektrisch weniger erregbar,^{15,26} weshalb hier von einer Versuchsreihe mit Voraktivierung durch kaliumreiche Lösung abgesehen wurde. Eine Aktivierung von L-Typ-Kalziumkanälen ist bei solch hohen Aktivierungen mit Acetylcholin eher gering. Dementsprechend kann ein möglicher Effekt von Campher auf den Magenfundus durch eine zu hohe Aktivierung durch Acetylcholin verdeckt werden.

Insgesamt weisen die Resultate auf eine Hemmung der sowohl transmitter- als auch spannungsgesteuert induzierten phasischen Aktivität der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltraktes hin.

4.2.3 EINFLUSS VON CAMPHER AUF DEN GLATTEN MUSKEL DES KARDIOVASKULÄREN SYSTEMS

Bei vorigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass Camphenol, ein Campher enthaltendes Arzneimittel, sowohl bei humoraler Stimulation als auch bei Aktivierung durch Depolarisation eine Relaxation glatter Muskel des kardiovaskulären Systems hervorruft.⁶

Campher zeigte in den hier durchgeführten Versuchen eine Inhibition der Durchschnittskraft und Maximalkraft der Portalvene. Eine Änderung der Frequenz der phasischen Aktivität ließ sich lediglich unter höheren Konzentrationen von Campher darstellen.

Eine Hemmung der phasischen, aber nicht der tonischen Aktivität des glatten Muskels kann auch bei verschiedenen K_{ATP} -Kanalöffnern, wie Cromakalim,⁴¹ sowie verschiedenen L-Typ-Kalziumkanalblockern, wie Nifedipin,⁸⁴ beobachtet werden.

Die starke Hemmung der Kontraktilität und die vergleichsweise geringe Hemmung der Frequenz der Spontanaktivität des glatten Muskels des Magenantrum und der Portalvene lässt dementsprechend eine Hemmung von L-Typ-Kalziumkanälen oder eine Öffnung von K_{ATP} -Kanälen vermuten.^{8,85}

4.2.4 WIRKWEISE DER VERSCHIEDENEN ENANTIOMERE AUF DIE GLATTE MUSKULATUR

Da Naturprodukte und medizinische Stoffe, die eine Chiralität aufweisen, häufig ein aktiveres und ein weniger aktiveres Enantiomer (Eutomer bzw. Distomer) besitzen, galt es in dem Versuch, das Eutomer von Campher herauszufinden.

Zunächst unterscheiden sich die beiden Enantiomere in der Art ihrer Produktion. Während (+)-Campher überwiegend bei natürlicher Herstellung durch Destillation des Naturstoffes entsteht, geht (-)-Campher vor allem aus synthetischer Herstellung hervor.

Weiterhin zeigen die Enantiomere eine unterschiedliche Wirkstärke für Intoxikationserscheinungen im Menschen. Hier liegt eine erhöhte Toleranz für (+)-Campher im Vergleich zu (-)-Campher oder einem Racemat der Enantiomere vor. Daher findet vor allem (+)-Campher in der Medizin Anwendung.^{1,55}

In den Versuchen war kein signifikanter Unterschied ($p > 0,1$) in der Wirkung von (+)- und (-)-Campher auf den glatten Muskel aller getesteten Gewebearten zu erkennen. Dementsprechend geht kein eindeutiges Eutomer aus den Versuchen hervor.

Die Toxizität von Campher konnte durch die durchgeführten Versuche am Gewebe nicht erfasst werden. Unter Berücksichtigung der aktuellen Studienlage und für die Vergleichbarkeit der Versuche mit der Literatur, in der hauptsächlich (+)-Campher untersucht wird, wurden die Experimente auf die Erforschung des Wirkungsmechanismus dieses Enantiomers fokussiert.

4.2.5 UNTERSCHIEDE DER HEMMUNG DES GLATTEN MUSKELS DURCH CAMPHER UND DURCH DIE HEMMUNG VON SCHRITTMACHERZELLEN

Die interstitiellen Cajalzellen (ICCs) spielen als Schrittmacherzellen der glatten Muskulatur des GI-Traktes eine wichtige Rolle in der Entstehung der phasischen Aktivität des glatten Muskels.^{17,24,25} Zusätzlich wird den ICCs eine konduktive Funktion zugeschrieben.¹⁷

Vor allem bestimmen ICCs bei glatter Muskulatur mit phasischer Aktivität die Frequenz der spontanen Kontraktion. Dementsprechend wird bei Hemmung der ICCs eine Verringerung der spontanaktiven Frequenz beobachtet.⁸⁶

Der Wirkungseinfluss von Campher auf den glatten Muskel zeigt hingegen keine Verringerung der spontanaktiven Frequenz, sondern eher der Durchschnittskraft. Dementsprechend ist die Art der Wirkung von Campher auf den glatten Muskel untypisch für eine Hemmung der ICCs und lässt auf einen direkten Einfluss auf die glatten Muskelzellen schließen.

4.2.6 VERGLEICH ZWISCHEN DER WIRKUNG VON CAMPHER UND KALIUMKANALÖFFNERN SOWIE L-TYP KALZIUMKANALBLOCKERN

Die Arbeit von Vatanparast et al. untersuchte mit der Patch-Clamp-Methode die Wirkung von Campher auf Neuronen *in vitro*. Um seinen epileptiformen Wirkmechanismus auf neuronaler Ebene zu verstehen, wurden die subösopharyngealen Ganglien einer Schnecke untersucht. Die Publikation postuliert, dass die epileptiforme Wirkung von Campher am wahrscheinlichsten auf einer Hemmung von Kaliumkanälen (delayed rectifier) beruht. Zusätzlich beschreibt sie eine Potenzierung dieses Wirkungseffekts durch einen erhöhten Einwärtsstrom an spannungsabhängigen Kalziumkanälen. Durch die Arbeit wurde der epileptiforme Wirkungseffekt von Campher zum ersten Mal auf Kanalebene nachgewiesen.⁶⁴

In dieser Arbeit wurde unter Verwendung der Organbadmethode ein hemmender Effekt auf den glatten Muskel gemessen. Dies steht im Gegensatz zu dem aktivierenden Effekt von Campher auf nervaler Ebene. Das gleiche Wirkungsprofil mit Hemmung der Durchschnittskraft und Maximalkraft des glatten Muskels mit geringerem Einfluss auf die Frequenz der Kontraktionen wird auch bei ATP-sensitiven Kaliumkanälen beschrieben.^{31,36,41,43} Daher wurden in einem K20-K80-Test die Wirkeigenschaften von Campher mit denen des K_{ATP} -Kanalöffners Levromakalim (BRL 38227) unter verschiedenen extrazellulären Kaliumkonzentrationen verglichen.

Durch eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration kann indirekt eine Membranpotentialverschiebung hervorgerufen werden, die die Offenwahrscheinlichkeit der Kalzium- und Kaliumkanäle des glatten Muskels sowie den Ein- und Ausstrom von Kationen

beeinflusst.⁵² K_{ATP} -Kanäle der Portalvene zeigen in Voltage-Clamp-Experimenten einen Einwärtsstrom von Kalium bei Membranpotentialen negativer als -20 mV. Der Einwärtsstrom führt zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran. Bei Membranpotentialen von 0 mV und höher ist ein Auswärtsstrom von Kalium zu messen.^{41,87} Campher zeigt bei Kaliumkonzentrationen von 20 mM und 80 mM (nach Goldman-Hodgkin-Katz ca. -41 mV bzw. ca. -10 mV, s. Tabelle 5) eine Hemmung der Kontraktionskraft der Portalvene.

Weiterhin wurde eine Hemmung der muskulären Aktivität durch Campher unter verschiedenen extrazellulären Kaliumkonzentrationen gemessen, um ein genaueres Wirkprofil der Hemmung der Portalvene durch Campher in Abhängigkeit des Membranpotentials erstellen zu können. Dabei ist zu berücksichtigen, dass eine Ermittlung des Membranpotentials mithilfe der vereinfachten Goldmann-Hodgkin-Katz-Gleichung als Annäherung gilt und als Methode ungenauer als die Patch-Clamp-Methode ist. Zusätzliche Einflüsse auf den glatten Muskel, beispielsweise auf humoraler Ebene, können bei einer Kaliumskalierung und Ermittlung des Membranpotentials durch die Goldmann-Hodgkin-Katz-Gleichung nicht ausgeschlossen werden.⁸⁸

Der Einfluss von Campher auf die Aktivität der Portalvene ist eine zur Kaliumkonzentration proportionale Hemmung der Durchschnittskraft des glatten Muskels mit einer maximalen Hemmung bei einer Konzentration von 40,3 mM (\triangleq -26 mV, s. Tabelle 5).

Da Campher in den Messungen bei starker Depolarisation einen hemmenden Effekt und somit ein nicht für K_{ATP} -Kanal-Öffner typisches Wirkprofil aufweist, wurde eine mögliche Ähnlichkeit zu L-Typ-Kalziumkanalblockern untersucht. Tatsächlich ähnelt das Wirkprofil dem der Wirkung von Kalziumkanalhemmern auf die Portalvene. Ein Beispiel hierfür bietet Cicletanin, in der Arbeit von Noack et al. mittels Patch-Clamp Methode gemessen (s. Abbildung 23, rechts).^{70,74}

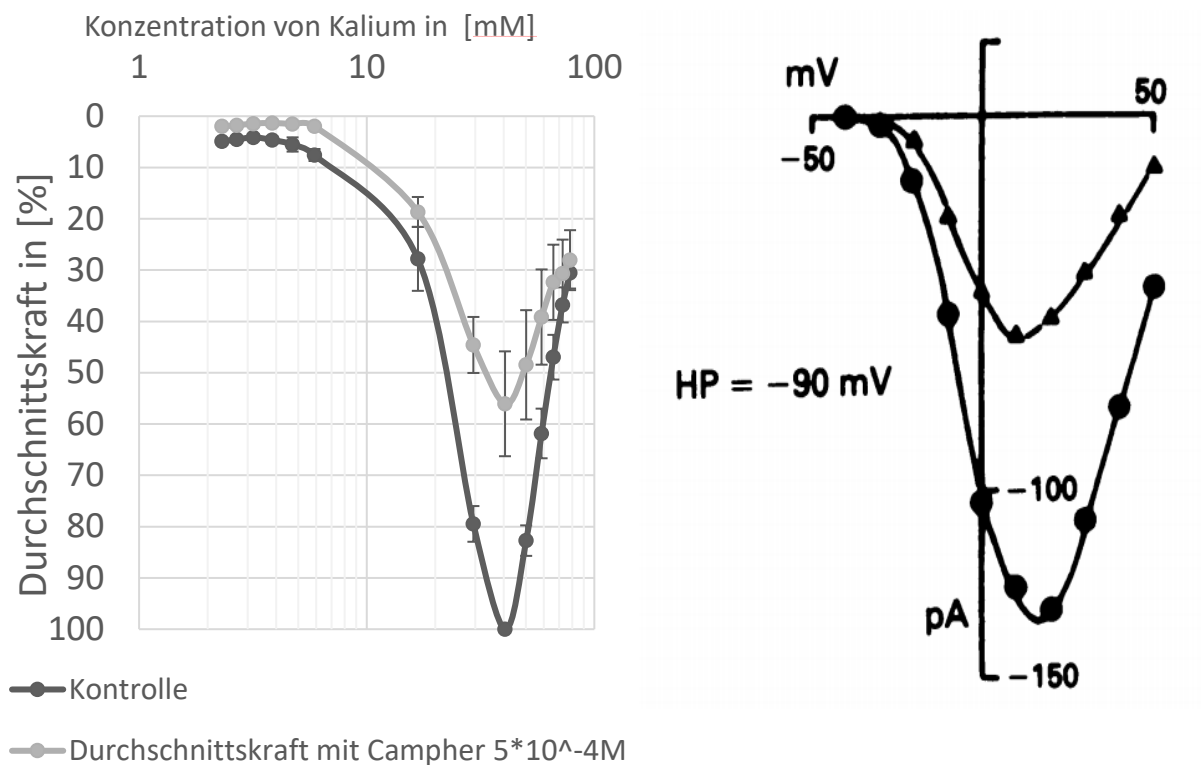


ABBILDUNG 24: VERGLEICH: INHIBITION DER L-TYP-KALZIUM-KANÄLE DURCH CICLETANIN⁷⁴
 Links: inverse Abbildung der Hemmung der Durchschnittskraft von Campher unter verschiedenen extrazellulären Kalziumkonzentrationen. Rechts: Abbildung des Kalziumeinstroms von L-Typ-Kalziumkanälen unter Einfluss von Cicletanin (Noack et al., 1993).⁷⁴

4.2.7 REVERSIBILITÄT DES WIRKEFFEKTES VON CAMPHER DURCH DIE TITRATION VON KALZIUM

Um den hemmenden Charakter von Campher weiter zu verstehen, wurde in anschließenden Versuchen nach Applikation des Naturstoffes Kalzium in das Organbad titriert. Wenn zu Beginn eine Kalziumkonzentration im physiologischen Bereich ($\text{Ca}^{2+} = 2,5 \text{ mM}$) gewählt wurde, wurden Wirkeffekte erst bei hohen Titrationswerten gemessen. Durch die Wahl einer anfänglich niedrigen Kalziumkonzentration ($\text{Ca}^{2+} = 1 \text{ mM}$) wurde die Aktivität des glatten Muskels zwar zunächst durch die verminderte Konzentration extrazellulären Kalziums gehemmt, konnte durch die nachfolgende Erhöhung aber schnell wiederhergestellt werden.⁷⁵ Dadurch wurde eine bessere Darstellung des Effektes von Campher ermöglicht.

Die Messungen zeigten bei Erhöhung der Kalziumkonzentration eine Reversibilität des hemmenden Effektes von Campher auf den glatten Muskel. Eine Erhöhung der

Kalziumkonzentration um 0,2 mM bewirkte bei der Portalvene zunächst eine Wiederherstellung der Durchschnittskraft auf ein mit der Kontrolle (bei $\text{Ca}^{2+} = 1 \text{ mM}$) vergleichbares Level. Beim gastrischen Antrum konnte der Camphereffekt im Vergleich zur anfänglichen Spontanaktivität der Kontrolle mit einer Erhöhung der Kalziumkonzentration um 0,4 mM ausgeglichen werden.

Nach weiterer Erhöhung der Kalziumkonzentration verlief die Aktivität des glatten Muskels von sowohl Magenantrum als auch Portalvene parallel zur Kontrolle mit einer Minderung der Aktivität um 20-40% der Aktivität der Kontrolle.

Diese Resultate weisen darauf hin, dass Campher einen Einfluss auf den Kalziumhaushalt des glatten Muskels hat. Die Reversibilität des hemmenden Effektes lässt auf eine kompetitive Hemmung eines extrazellulären Kalziumeinstroms in den glatten Muskel schließen. Diese kompetitive Hemmung ist dementsprechend durch Kalziumerhöhung reversibel. Nichtsdestotrotz sind starke Erhöhungen des extrazellulären Kalziums vonnöten, um eine Reversibilität des Effektes von Campher im physiologischen Milieu zu erzielen.

4.2.8 MESSUNG VON INTRAZELLULÄREN KALZIUMKONZENTRATIONEN MITHILFE DER FLUORESZENZMIKROSKOPIE

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine geeignete Methode zur Messung von intrazellulären Kalziumkonzentrationen des glatten Muskels.⁷⁸ Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Signalabschwächung des intrazellulären Kalziumsignals bei Applikation von Campher, wobei zusätzlich eine Abschwächung durch eine Ausbleichung des Signals durch den Laser berücksichtigt werden muss. Die beobachtete Verminderung der intrazellulären Kalziumkonzentration kann die in den vorherigen Experimenten festgestellte verminderte Kontraktionskraft des glatten Muskels erklären.

Bei der direkten Applikation von Campher in das Organbad bei erhöhter extrazellulärer Kaliumkonzentration ($\text{K}^+ = 20 \text{ mM}$) und entsprechender erhöhter Depolarisation wurde eine rasche Minderung des intrazellulären Kalziumsignals gemessen, was eine typische Eigenschaft von spannungsabhängigen Kalziumkanalblockern auf den glatten Muskel ist.⁸⁹⁻⁹² Aufgrund dieser Resultate kann die Hypothese unterstützt werden, dass die Hemmung der phasischen Aktivität durch Campher durch eine zytosolische Kalziumminderung und nicht durch eine Kalziumdesensibilisierung des glatten Muskels verursacht wird.

4.2.9 DIE ROLLE VON TRP-KANÄLEN BEI DER AKTIVITÄT DES GLATTEN MUSKELS

TRP-Kanäle und ihre Rolle im vaskulären und viszerale glatten Muskelgewebe sind noch nicht exakt erforscht worden, jedoch sind einige Funktionen bekannt.^{93,94} Da Effekte von Campher auf verschiedene TRP-Kanäle beschrieben sind, werden hier einige Aspekte der präsentierten Resultate im Hinblick auf den aktuellen Forschungsstand beurteilt.^{58,61,62,95}

Es ist beschrieben, dass TRP-Kanäle eine modellierende Wirkung auf den glatten Muskel ausüben können.^{21,50,96} In den Arbeiten von Xu et al. wurde die Wirkung von Campher auf verschiedene TRP-Kanäle, wie die Aktivierung und Desensitivierung von TRP-V1 sowie die Hemmung von TRP-A1, gründlich untersucht. Durch ihre Ergebnisse konnte die analgetische Eigenschaft von Campher in Salben und Cremes begründet werden.^{58,61} Insgesamt wurde der Einfluss von Campher auf die Kanäle TRP-V1, TRP-V3, TRP-M8 und TRP-A1 beobachtet.^{58,97}

Campher zeigt eine bimodale Wirkung auf TRP-A1-Kanäle, wobei geringere Konzentrationen (100 µM) zu einer Aktivierung und erhöhte Dosen (1 mM) zu einer Hemmung des Kanals führen.^{58,61} TRP-A1 ist besonders für seine Funktion in sensiblen Neuronen als Kältesensor und Chemorezeptor bekannt.^{98–100} Es wird vermutet, dass TRP-A1 im Endothel der Portalvene exprimiert wird. Zusätzlich stellt TRP-A1 durch Depolarisation über kalziumabhängige Kaliumkanäle eine vasodilatative Komponente in Arteriolen dar.^{45,101} An Zellen des glatten Muskels direkt wurden jedoch bis heute keine beweisenden Ergebnisse eines Einflusses von TRP-A1-Kanälen erbracht.⁴⁵

Eine Aktivierung von TRP-A1-Kanälen im GI-Trakt führt zur Ausschüttung von Serotonin aus enterochromaffinen Zellen der Mukosa. Da nur die äußere Muskelschicht des Magenantrum für die Versuche verwendet wurde, kann ein Einfluss der enterochromaffinen Zellen ausgeschlossen werden.¹⁰¹

Die Arbeit von Xu et al. beschreibt eine Aktivierung und Desensitivierung des TRP-V1-Kanals durch Campher. TRP-V1 zeigte vasokonstringierende Eigenschaften im vaskulären glatten Muskel und vasorelaxierende Effekte in mesenterischen Arterien⁴⁷. Jedoch wirkt der TRP-V1-Kanal im glatten Muskel eher modulativ, weshalb eine so starke Hemmung, wie sie in den Versuchen gemessen wurde, nicht allein durch einen Einfluss auf den TRP-V1-Kanal begründet werden kann.⁴⁷

Die Arbeit von Selescu et al. beschreibt eine Aktivierung des TRP-M8 Kanals durch Campher sowie eine Hemmung der aktivierenden Wirkung von Campher durch Menthol. Über die Funktion von TRP-M8 ist noch nicht viel bekannt, der Kanal wird jedoch in der vaskulären glatten Muskulatur exprimiert.²¹ Die Arbeiten von Zholos et al. zeigen, dass eine Aktivierung von TRP-M8-Kanälen zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt, was

gegen eine TRP-M8-vermittelte Wirkweise des Camphereffekts durch die Senkung der zytosolischen Kalziumkonzentration spricht.^{102–104}

Campher kann zur kompletten Hemmung der phasischen Aktivität des glatten Muskels führen. Einige TRP-Kanäle besitzen Eigenschaften, mit denen eine Hemmung der phasischen Aktivität möglich wäre, jedoch zeigen die TRP-Kanäle, die durch Campher beeinflusst werden, nach heutigem Kenntnisstand nicht die entsprechende Stärke und Art der Hemmung oder sogar gegensätzliche Effekte.^{58,94} Dementsprechend ist der Effekt von Campher auf die Aktivität des glatten Muskels durch einen Einfluss auf TRP-Kanäle alleine nach heutigem Kenntnisstand nicht wahrscheinlich. Vielmehr lässt dies darauf schließen, dass die hemmende Wirkung Camphers primär durch einen anderen Mechanismus, wie eine Blockade von L-Typ-Kalziumkanälen, realisiert wird.

4.3 KLINISCHE RELEVANZ

Campher spielt seit Jahrhunderten als Naturprodukt in der Medizin in verschiedenen Darreichungsformen eine Rolle. Heutzutage wird Campher vor allem in Form von Cremes und Salben verabreicht. Durch diese topische Anwendung ist die systemische Konzentration von Campher eher niedrig.

Untersuchungen zeigten, dass die tägliche therapeutische Dosis bei 1,43 mg/kgKG (kg Körpergewicht) liegt, was einer Konzentration von etwa 10^{-8} M Campher im Blut entspricht. Eine Dosis von (+)-Campher ab 450 mg/kgKG gilt bereits als toxisch ($\approx 3 \cdot 10^{-6}$ M). (-)-Campher und Racemate zeigen bereits bei niedrigeren Dosen Anzeichen von Toxizität.^{1,55}

Häufig treten Vergiftungen durch Campher bei Kindern auf, da campherhaltige Produkte frei verkäuflich sind und daher als ungefährlich gelten. Dementsprechend wird auf die vor Kindern sichere Aufbewahrung weniger Wert gelegt.

In den Experimenten wurden Konzentrationen von Campher von 10^{-6} M bis hin zu 10^{-3} M im Organbad verwendet. Dabei gilt schon die niedrigste Dosis für den Menschen als ansatzweise toxisch. Um eine entsprechende Wirkung von Campher genau definieren zu können, wurde der glatte Muskel zusätzlich aktiviert. Somit können die experimentell *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse nur bedingt auf den Menschen im therapeutischen Kontext übertragen werden. Campher wird als Darreichungsform heutzutage selten *per os* eingesetzt. Es sollte aber berücksichtigt werden, dass gerade die untersuchten Organe bei Ingestion von Campher einer erhöhten Konzentration des Wirkstoffes ausgesetzt sind, da der Wirkstoff zunächst konzentriert den GI-Trakt und die Pfortader passieren muss, um sich systemisch im Körper ausbreiten zu können. Zusätzlich sind der Gastrointestinaltrakt und das vaskuläre System von besonderem pharmakologischem Interesse. Hier werden häufig Motilitätsstörungen

beschrieben, die zu einer Vielzahl an Beschwerden wie Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoen, Schmerzen durch Spasmen, oder Ischämien und daraus resultierende teils letale Folgen, führen können. Eine Anwendung von Campher *per os* könnte eine Möglichkeit darstellen, solche Motilitätsstörungen unter Berücksichtigung der toxischen Dosis zu therapieren. Hierzu müssten jedoch weitere Versuche *in vivo* durchgeführt werden, um eine genaue Aussage zu dem therapeutischen Effekt Camphers im Gastrointestinaltrakt und in der Pfortader treffen zu können.

4.4 THESEN

1. Campher wirkt inhibitorisch auf die phasische Kontraktion glatter Muskel des Magenantrum und der Portalvene. Insbesondere wurde eine Hemmung der maximalen Kontraktionskraft und der Durchschnittskraft des glatten Muskels gemessen. Die Frequenz phasischer Kontraktionen wurde nur leicht verändert. Diese Hemmung der phasischen Muskulatur trat sowohl bei humoraler Aktivierung (Acetylcholin) als auch bei Aktivierung durch Depolarisation auf.
2. Es wurde kein Effekt von Campher auf die tonische (zeitinvariante) Kontraktion des Magenfundus beobachtet.
3. Der inhibitorische Wirkmechanismus von Campher liegt nicht in der Öffnung von K_{ATP} -Kanälen. Dieses konnte im Vergleich von Levromakalim, einem K_{ATP} -Kanal-Öffner, mit Campher gezeigt werden.
4. Bei indirekter Membranpotentialverschiebung durch Veränderung der extrazellulären Kaliumkonzentration steigt der Tonus bei zunehmender Depolarisation an. Campher zeigt auf diesen Tonus einen proportional inhibitorischen Effekt, was auf eine Hemmung der L-Typ-Kalziumkanäle schließen lässt.
5. Die hemmende Wirkung von Campher auf Magenantrum und Portalvene ist durch Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration zu kompensieren.
6. Durch Fluoreszenzmikroskopie und Markern des intrazellulär freien Kalziums wurde gezeigt, dass Campher eine Erniedrigung der zytosolischen Kalziumkonzentration bewirkt.
7. Aus den Ergebnissen wird geschlossen, dass die inhibitorische Wirkung von Campher auf den glatten Muskel auf einer Hemmung von L-Typ-Kalziumkanälen beruht. Die ED_{50} des Wirkstoffs liegt bei ungefähr $5 \cdot 10^{-4}$ M.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Campher wird seit Jahrhunderten in der Medizin in verschiedenen Formen angewendet. Einige Wirkeinflüsse von Campher auf den menschlichen Organismus sind bereits gründlich erforscht.^{59,64,105}

Da Campher starke systemische Einflüsse zeigt, wurde im Speziellen die Wirkung und der Wirkmechanismus von Campher auf den glatten Muskel des vaskulären und des gastrischen Systems untersucht. Dazu wurden Muskelpräparate des gastrischen Antrum, des Magenfundus und der Portalvene mit der konventionellen Organbadmethode untersucht. Weiterhin wurden Versuche an der Portalvene mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Anhand der Organbadmethode konnte ermittelt werden, dass Campher keinen Einfluss auf die tonische Muskulatur des Magenfundus hat. Auf die phasische Kontraktion des Magenantrum und der Portalvene hingegen wurde eine Inhibition der Maximalkraft und der Durchschnittskraft ermittelt. Mithilfe eines K20-K80-Tests wurde die Wirkung von Campher auf die Portalvene mit der Wirkung des K_{ATP} -Kanal-Öffners Levromakalim verglichen. Hier zeigte sich im Gegensatz zur Wirkung von Levromakalim keine Reversibilität der Wirkung von Campher bei Applikation des K_{ATP} -Kanal-Blockers Glibenclamid. Zusätzlich konnte selbst bei einer Kaliumkonzentration von $K^+ = 80 \text{ mM}$ eine Hemmung der Aktivität der Portalvene durch Campher gemessen werden. Mithilfe einer Kaliumskalierung der Portalvene wurde die hemmende Wirkung von Campher bei Membranpotentialverschiebung gemessen. Hier zeigte sich eine proportionale Hemmung des glatten Muskels bei stärkster Hemmung unter stärkster Aktivität des glatten Muskels. Durch eine Kalziumtitration wurde gezeigt, dass die Wirkung von Campher bei Erhöhung der Kalziumkonzentration reversibel ist. Darüber hinaus wurde mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie eine Verringerung der intrazellulären Kalziumkonzentration der Portalvene unter Einfluss von Campher gemessen.

Die erhobenen Daten deuten auf eine direkte Blockade von L-Typ-Kalziumkanälen durch Campher, mit Reversibilität des Effektes bei extrazellulärer Kalziumerhöhung, hin. Ein genaueres Zusammenspiel von Campher mit weiteren Einflüssen auf den glatten Muskel *in vivo* bleibt Gegenstand der Forschung.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Zuccarini P. Camphor: risks and benefits of a widely used natural product. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 2010;13(2):77-82. doi:10.4314/jasem.v13i2.55317
 2. Beuth J, van Leendert R, Pöhls U. Ergebnisse einer repräsentativen Erhebung zu Meinungen und Einstellung der Bevölkerung in Deutschland zur Naturmedizin. 2007. https://iwenv.de/download/studie_naturmedizin160407.pdf
 3. Liebelt E, Shannon M. Small doses, big problems: a selected review of highly toxic common medications. *Pediatric emergency care*. 1993;9(5):292—297. PMID: 8247936.
 4. Kotaka T, Kimura S, Kashiwayanagi M, Iwamoto J. Camphor induces cold and warm sensations with increases in skin and muscle blood flow in human. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(12):1913-1918. doi:10.1248/bpb.b14-00442.
 5. Reyes OR, Noack TK, Patejdl R, Rodríguez REG, Puig MEF, Sánchez NLA. Efecto del 4-Clorofenol sobre el músculo liso vascular arterial de ratas Wistar. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2021;20(4):3901.
 6. Reyes OR, Noack T, Patejdl R, Rodríguez REG, Camacho AAC. Efecto del Camphenol Plus sobre el músculo liso vascular de vena porta en ratas Wistar. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*. 2021;25(3):5007.
 7. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education*. 2003;27(1-4):201-206. doi:10.1152/advan.00025.2003
 8. Amberg G, Navedo M. Calcium dynamics in vascular smooth muscle. *Microcirculation*. 2013;20(4):281-289. doi:10.1111/micc.12046.Calcium
 9. Berridge MJ. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. 2008;21:5047-5061. doi:10.1113/jphysiol.2008.160440
 10. Somlyo AP, Somlyo A V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*. 1994;372(6503):231-236. doi:10.1038/372231a0
 11. Somlyo AP, Somlyo AV. Ultrastructure of Smooth Muscle. In: Daniel EE, Paton DM, eds. *Smooth Muscle*. Springer US; 1975:3-45. doi:10.1007/978-1-4684-2751-6_1
 12. Sanders KM, Kito Y, Hwang SJ, Ward SM. Regulation of Gastrointestinal Smooth Muscle Function by Interstitial Cells. 2016;(10):316-326. doi:10.1152/physiol.00006.2016
 13. Patejdl R, Noack T. Calcium movement in smooth muscle and evaluation of graded functional intercellular coupling. *Chaos*. 2018;28(10):106311. doi:10.1063/1.5035168
 14. Bozler E. Physiological evidence for the syncytial character of smooth muscle. *Science*. 1937;86(2238):476. doi:10.1126/science.86.2238.476
 15. Fisher SA. Vascular smooth muscle phenotypic diversity and function. *Physiological Genomics*. 2010;42A(3):169-187. doi:10.1152/physiolgenomics.00111.2010
-

16. Sanders KM. Signal Transduction in Smooth Muscle Invited Review: Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *Journal of Applied Physiology*. 2001;91:1438-1449. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.3.1438>
 17. Sanders KM, Ward SM. Interstitial cells of Cajal: a new perspective on smooth muscle function. *The Journal of Physiology*. 2006;576(3):721-726. doi:10.1113/jphysiol.2006.115279
 18. Burns AJ, Herbert TM, Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal in the guinea-pig gastrointestinal tract as revealed by c-Kit immunohistochemistry. *Cell Tissue Res* 1997; 290,11–20. <https://doi.org/10.1007/s004410050902>
 19. Igelbrink S. Untersuchung zur Erregungskopplung am glatten Gefäßmuskel der Portalvene mittels mehrdimensionaler korrelativer Netzwerkanalyse. Dissertation, Universität Rostock 2012. https://doi.org/10.18453/rosdok_id00001242
 20. Kankel A. Untersuchung zur Erregungskopplung im glattemuskulären Magenanstrum der Ratte mittels mehrdimensionaler korrelativer Netzwerkanalyse. Dissertation, Universität Rostock, 2014. https://doi.org/10.18453/rosdok_id00001619t
 21. Ghosh D, Syed AU, Prada MP, et al. Calcium Channels in Vascular Smooth Muscle. In: *Advances in Pharmacology*. Vol 78. Academic Press Inc.; 2017:49-87. doi:10.1016/bs.apha.2016.08.002
 22. Rüegg JC. Smooth muscle tone. *Physiological reviews*. 1971;51(1):201-248. doi:10.1152/physrev.1971.51.1.201
 23. Johansson B, Mellander S. Static and dynamic components in the vascular myogenic response to passive changes in length as revealed by electrical and mechanical recordings from the rat portal vein. *Circulation Research*. 1975;36(1):76-83. doi:10.1161/01.RES.36.1.76
 24. Thuneberg L. Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? *Adv Anat Embryo Cell Biol*. 1982;(71):1-130. ISBN: 978-3-540-11261-7
 25. Johannes J, Thuneberg L. Interstitial Cells of Cajal in Human. *Gastroenterology* 1991:1417-1431. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(91\)70033-T](https://doi.org/10.1016/0016-5085(91)70033-T)
 26. Reho JJ, Zheng X, Fisher SA. Smooth muscle contractile diversity in the control of regional circulations. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2014;306(2):H163-H172. doi:10.1152/ajpheart.00493.2013
 27. DiSanto ME, Cox RH, Wang Z, Chacko S. NH2-terminal-inserted myosin II heavy chain is expressed in smooth muscle of small muscular arteries. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1997;272(5):C1532-C1542. doi:10.1152/ajpcell.1997.272.5.C1532
 28. Holmes KC, Trentham DR, Simmons R, et al. Smooth muscle myosin: regulation and properties. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 2004;359(1452):1921-1930. doi:10.1098/rstb.2004.1562
 29. Gong MC, Cohen P, Kitazawa T, et al. Myosin light chain phosphatase activities and the effects of phosphatase inhibitors in tonic and phasic smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(21):14662-14668. doi:10.1016/S0021-9258(18)42092-3
-

30. Somlyo AV, Somlyo AP. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1968;159(1):129-145.
 31. Kuriyama H, Kitamura K, Itoh T, Inoue R. Physiological Features of Visceral Smooth Muscle Cells, With Special Reference to Receptors and Ion Channels. *Physiological Reviews*. 1998;78(3):811-920. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.3.811>
 32. Kharade SV, Sonkusare SK, Srivastava AK, et al. The β_3 Subunit Contributes to Vascular Calcium Channel Upregulation and Hypertension in Angiotensin II–Infused C57BL/6 Mice. *Hypertension*. 2013;61(1):137-142. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.197863
 33. Harraz OF, Brett SE, Welsh DG. Nitric oxide suppresses vascular voltage-gated T-type Ca^{2+} channels through cGMP/PKG signaling. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2014;306(2):H279-H285. doi:10.1152/ajpheart.00743.2013
 34. Harraz OF, Welsh DG. Protein kinase A regulation of T-type Ca^{2+} channels in rat cerebral arterial smooth muscle. *Journal of Cell Science*.:11.
 35. Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K^{+} channels in vascular smooth muscle cells. *Journal of Smooth Muscle Research*. 2008;44(2):65-81. doi:10.1540/jsmr.44.65
 36. Edwards G, Weston AH. Potassium channel openers and vascular smooth muscle relaxation. *Pharmacology & Therapeutics*. 1990;48(2):237-258. doi:10.1016/0163-7258(90)90082-d
 37. Ohya Y, Terada K, Kitamura K, Kuriyama H. Membrane currents recorded from a fragment of rabbit intestinal smooth muscle cell. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1986;251(3):C335-C346. doi:10.1152/ajpcell.1986.251.3.C335
 38. Amberg GC, Koh SD, Imaizumi Y, Ohya S, Sanders KM. A-type potassium currents in smooth muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2003;284(3):C583-C595. doi:10.1152/ajpcell.00301.2002
 39. Brayden J, Nelson M. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science*. 1992;256(5056):532-535. doi:10.1126/science.1373909
 40. Tanaka Y, Koike K, Toro L. MaxiK channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms. *Journal of Smooth Muscle Research*. 2004;40(4,5):125-153. doi:10.1540/jsmr.40.125
 41. Quayle JM, Nelson MT, Standen NB. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiological Reviews*. 1997;77(4):1165-1232. doi:10.1152/physrev.1997.77.4.1165
 42. Park, Won Sun et al. Acute hypoxia induces vasodilation and increases coronary blood flow by activating inward rectifier K^{+} channels. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*. 2007;454,6:1023-1030.
 43. Quast U. Potassium channel openers: pharmacological and clinical aspects. *Fundam Clin Pharmacol*. 1992;6(7):279-293. doi:10.1111/j.1472-8206.1992.tb00122.x
-

44. Scott Earley JEB. Transient receptor potential channels and vascular function. *Clinical Science*. 119(1):19-36. <https://doi.org/10.1042/CS20090641>
 45. Earley S. TRPA1 channels in the vasculature. *British Journal of Pharmacology*. 2012;167(1):13-22. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02018.x
 46. Nozawa K, Kawabata-shoda E, Doihara H, et al. TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *PNAS* 2009;1-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805323106>
 47. Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE. The functions of TRPA1 and TRPV1: Moving away from sensory nerves. *British Journal of Pharmacology*. 2012;166(2):510-521. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01851.x
 48. Venkatachalam K, Montell C. TRP Channels. *Annu Rev Biochem*. 2007;76(1):387-417. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819
 49. Johnson CD, Melanaphy D, Purse A, Stokesberry SA, Dickson P, Zholos AV. Transient receptor potential melastatin 8 channel involvement in the regulation of vascular tone. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2009;296(6):H1868-H1877. doi:10.1152/ajpheart.01112.2008
 50. Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B. TRP channels: An overview. *Cell Calcium*. 2005;38(3-4):233-252. doi:10.1016/j.ceca.2005.06.028
 51. Sanders KM. Regulation of smooth muscle excitation and contraction: E-C coupling in gastrointestinal smooth muscle. *Neurogastroenterology & Motility*. 2008;20:39-53. doi:10.1111/j.1365-2982.2008.01108.x
 52. Goldman DE. Potential, impedance, and rectification in membranes. *Journal of General Physiology*. 1943;27(1):37-60. doi:10.1085/jgp.27.1.37
 53. Lammel E, Deitmer P, Noack T. Suppression of steady membrane currents by acetylcholine in single smooth muscle cells of the guinea-pig gastric fundus. *The Journal of Physiology*. 1991;432(1):259-282. doi:10.1113/jphysiol.1991.sp018384
 54. GESTIS-Stoffdatenbank, IFA I. Campher. <https://gestis.dguv.de/data?name=510778>
 55. Chatterjje, N; Alexander G. Anticonvulsant properties of spirohydantoins derived from optical isomers of camphor. *Neurochemical Research*. 1986;11:1669-1676.
 56. Saratikov AS, Gorshkova VK. The cholinolytic action of Camphor. 1964:409-412. PMID: 4393370
 57. Inoue Y, Takeuchi S. Expectorant-like action of camphor derivatives. *Nihon Ika Daigaku zasshi*. 1969;36(4):351-354. PMID: 5353744
 58. Xu H. Camphor Activates and Strongly Desensitizes the Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 1 Channel in a Vanilloid-Independent Mechanism. *Journal of Neuroscience*. 2005;25(39):8924-8937. doi:10.1523/JNEUROSCI.2574-05.2005
 59. Moqrich A, Hwang SW, Earley TJ, et al. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science (New York, NY)*. 2005;307(5714):1468-1472. doi:10.1126/science.1108609
-

60. Burrow A, Eccles R, Jones AS. The Effects of Camphor, Eucalyptus and Menthol Vapour on Nasal Resistance to Airflow and Nasal Sensation. *Acta Oto-Laryngologica*. 1983;96(1-2):157-161. doi:10.3109/00016488309132886
 61. Alpizar YA, Gees M, Sanchez A, et al. Bimodal effects of cinnamaldehyde and camphor on mouse TRPA1. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. 2013;465(6):853-864. doi:10.1007/s00424-012-1204-x
 62. Selescu T, Ciobanu AC, Dobre C, Reid G, Babes A. Camphor activates and sensitizes transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) to cooling and icilin. *Chemical Senses*. 2013;38(7):563-575. doi:10.1093/chemse/bjt027
 63. Lis-Balchin M, Hart S. A preliminary study of the effect of essential oils on skeletal and smooth muscle in vitro. *Journal of ethnopharmacology*. 1997;58(97):183-187. doi:10.1016/S0378-8741(97)00103-7
 64. Vatanparast J, Andalib-Lari F. Camphor elicits epileptiform discharges in snail neurons: The role of ion channels modulation. *NeuroToxicology*. 2017;60:299-307. doi:10.1016/j.neuro.2015.12.012
 65. Golenhofen, K. "Untersuchungen am isolierten glatten Muskel." *Gastrointestinale Motilität-klinische Untersuchungsmethoden Edition Medizin Weinheim* (1983): 139-149.
 66. Sutter MC. The Mesenteric Portal Vein in Research. *Pharmacological Reviews*. 1990;Vol. 42, N:287-325.
 67. Karaki H, Ozaki H, Hori M, et al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacological reviews*. 1997;49(2):157-230.
 68. (R)-camphor (CHEBI:15396). Accessed April 3, 2021. <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:15396>
 69. (S)-camphor (CHEBI:15397). Accessed April 3, 2021. <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:15397>
 70. Deitmer P, Golenhofen K, Noack T. Comparison of the relaxing effects of cicletanine and cromakalim on vascular smooth muscle. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1992;20(1):35—42.
 71. Furchgott RF. The Pharmacology of Vascular Smooth Muscle. *Pharmacol Reviews*. 1955;7(2):183-265.
 72. Chromophores F, Mintaz A, Kao JPY, Tsieng RY. MintaA89JBC.pdf. 1989;264(14):8171-8178. doi:2498308
 73. DeLean A, Munson PJ, Rodbard D. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 1978;235(2):E97. doi:10.1152/ajpendo.1978.235.2.E97
 74. Noack T, Deitmer P. Effects of cicletanine on whole-cell currents of single smooth muscle cells from the guinea-pig portal vein. *British Journal of Pharmacology*. 1993;109(1):164-170. doi:10.1111/j.1476-5381.1993.tb13547.x
-

75. Axelsson J, Wahlström B, Johansson B, Jonsson O. Influence of the ionic environment on spontaneous electrical and mechanical activity of the rat portal vein. *Circulation research*. 1967;21:609-618. <https://doi.org/10.1161/01.RES.21.5.609>
76. Golenhofen K. Rhythmische Dehnung der glatten Muskulatur vom Blinddarm des Meerschweinchens. *Pflügers Archiv*. 1965;284(4):327-346. doi:10.1007/BF00363241
77. Golenhofen K, Loh D v. Elektrophysiologische Untersuchungen zur normalen Spontanaktivität der isolierten Taenia coli des Meerschweinchens. *Pflügers Archiv*. 1970;314(4):312-328. doi:10.1007/BF00592289
78. Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman B. Measurement of Intracellular Calcium. *Physiological Reviews*. 1999;79(4):1089-1125. doi:10.1152/physrev.1999.79.4.1089
79. Green BG. Sensory Characteristics of Camphor. *Journal of Investigative Dermatology*. 1990;94(5):662-666. doi:<https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12876242>
80. Saratikov AS, Poltavchenko YuA. Pharmacological activity of camphanes. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 1982;16(12):896-898. doi:10.1007/BF00767847
81. Belz GG, Loew D. Dose-response related efficacy in orthostatic hypotension of a fixed combination of D-camphor and an extract from fresh Crataegus Berries and the contribution of the single components. *Phytomedicine*. 2003;10:61-67. doi:<https://doi.org/10.1078/1433-187X-00303>
82. Filipponi K, Golenhofen K, Hofstetter V, Hohnsbein J, Lammel E, Lukanow J. Tonic contraction of canine gastric muscle during long-lasting calcium removal and its dependence on magnesium. *The Journal of Physiology*. 1987;393(1):375-397. doi:10.1113/jphysiol.1987.sp016828
83. Hillemeier C, Bitar KN, Marshall JM, Biancani P. Intracellular pathways for contraction in gastroesophageal smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1991;260(5):G770-G775. doi:10.1152/ajpgi.1991.260.5.G770
84. Golenhofen K, Weiser HF, Siewert R. Phasic and tonic types of smooth muscle activity in lower oesophageal sphincter and stomach of the dog. *Acta hepato-gastroenterologica*. 1979;26(3):227-234.
85. Moosmang S, Schulla V, Welling A, et al. Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *The EMBO Journal*. 2003;22(22):6027-6034. doi:<https://doi.org/10.1093/emboj/cdg583>
86. Beckett EAH, McGeough CA, Sanders KM, Ward SM. Pacing of interstitial cells of Cajal in the murine gastric antrum: Neurally mediated and direct stimulation. *Journal of Physiology*. 2003;553(2):545-559. doi:10.1113/jphysiol.2003.050419
87. Zhang HL, Bolton TB. Two types of ATP-sensitive potassium channels in rat portal vein smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology*. 1996;118(1):105-114. doi:10.1111/j.1476-5381.1996.tb15372.x
88. Golenhofen K, Hermstein N, Lammel E. Membrane potential and contraction of vascular smooth muscle (portal vein) during application of noradrenaline and high potassium, and

- selective inhibitory effects of iproveratril (verapamil). *Microvascular Research*. 1973;5(1):73-80. doi:10.1016/S0026-2862(73)80007-X
89. Karaki H, Ozaki H, Hori M, et al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacological Reviews*. 1997;49(2):157-230.
90. DeFeo TT, Morgan KG. Calcium-force coupling mechanisms during vasodilator-induced relaxation of ferret aorta. *The Journal of Physiology*. 1989;412(1):123-133. doi:10.1113/jphysiol.1989.sp017607
91. Karaki H, Sato K, Ozaki H, Murakami K. Effects of sodium nitroprusside on cytosolic calcium level in vascular smooth muscle. *European Journal of Pharmacology*. 1988;156(2):259-266. doi:10.1016/0014-2999(88)90329-9
92. Takeuchi K, Abe K, Yasujima M, et al. Difference between the effects of atrial natriuretic peptide and calcium antagonist on cytosolic free calcium in cultured vascular smooth muscle cells. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1989;13 Suppl 6:S13-6. PMID: 2473340
93. Martinsen A, Dessy C, Morel N. Regulation of calcium channels in smooth muscle : New insights into the role of myosin light chain kinase. *Channels* 2014;8:5, 402-413. <https://doi.org/10.4161/19336950.2014.950537>
94. Boesmans W, Owsianik G, Tack J, Voets T. TRP channels in neurogastroenterology : opportunities for. *British Journal of Pharmacology*. 2011;162:18-37. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01009.x
95. Capasso R, Aviello G, Romano B, et al. Modulation of mouse gastrointestinal motility by allyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables (Brassicaceae): Evidence for TRPA1-independent effects. *British Journal of Pharmacology*. 2012;165(6):1966-1977. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01703.x
96. Beech DJ. Emerging functions of 10 types of TRP cationic channel in vascular smooth muscle. *Clinical and experimental pharmacology and physiology* 2005;32(8):597-603. doi:10.1111/j.1440-1681.2005.04251.x
97. Jordt SE, Julius D. Molecular basis for species-specific sensitivity to “hot” chili peppers. *Cell*. 2002;108(3):421-430. doi:10.1016/S0092-8674(02)00637-2
98. Nilius B, Appendino G, Owsianik G. The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2012;464(5):425-458. doi:10.1007/s00424-012-1158-z
99. Sawada Y, Hosokawa H, Hori A, Matsumura K, Kobayashi S. Cold sensitivity of recombinant TRPA1 channels. *Brain Research*. 2007;1160:39-46. doi:<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.05.047>
100. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, et al. ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. *Cell*. 2003;112(6):819-829. doi:[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00158-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00158-2)
101. Nozawa K, Kawabata-Shoda E, Doihara H, et al. TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(9):3408-3413. doi:10.1073/pnas.0805323106
-

102. Zholos A. Pharmacology of transient receptor potential melastatin channels in the vasculature. *British Journal of Pharmacology*. 2010;159(8):1559-1571. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00649.x>
103. Vanden Abeele F, Zholos A, Bidaux G, et al. Ca²⁺-independent phospholipase A₂-dependent gating of TRPM8 by lysophospholipids. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(52):40174-40182. doi:10.1074/jbc.M605779200
104. Zholos A, Johnson C, Burdyga T, Melanaphy D. TRPM Channels in the Vasculature. In: Islam MdS, ed. *Transient Receptor Potential Channels*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer Netherlands; 2011:707-729. doi:10.1007/978-94-007-0265-3_37
105. Xu H. Camphor Activates and Strongly Desensitizes the Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 1 Channel in a Vanilloid-Independent Mechanism. *Journal of Neuroscience*. 2005;25(39):8924-8937. doi:10.1523/JNEUROSCI.2574-05.2005

7 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)