

AUS DEM OSCAR LANGENDORFF INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE DER UNIVERSITÄT ROSTOCK

DIREKTOR: PROF. DR. MED. RÜDIGER KÖHLING

ROLLE VON RHO-KINASE UND PROTEIN-KINASE-C BEI DER KONTRAKTION DER DARMLÄNGSMUSKULATUR

INAUGURALDISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER ZAHNMEDIZIN
DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON

FREYA KUGEL | GEB. AM 07.01.1994 IN RATZEBURG

AUS HAMBURG

HAMBURG | 23.04.2025

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005761

ERSTGUTACHTER: PROF. DR. MED. TIMO KIRSCHSTEIN

EINRICHTUNG: OSCAR LANGENDORFF INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE DER UNIVERSITÄT ROSTOCK

ZWEITGUTACHTER: PROF. DR. STEFAN OSWALD

EINRICHTUNG: INSTITUT FÜR PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE DER UNIVERSITÄT ROSTOCK

DRITTGUTACHTER: PROF. DR. JÖRG PETERS

EINRICHTUNG: INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN GREIFSWALD

DATUM DER EINREICHUNG: 23.04.2025

DATUM DER VERTEIDIGUNG: 20.01.2026

INHALTSVERZEICHNIS.....	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VII
TABELLENVERZEICHNIS	X
I. EINLEITUNG.....	1
1.1 AUFBAU UND FUNKTION UNTERER GASTROINTESTINALTRAKT	1
1.2 MOTILITÄT DES UNTEREN GASTROINTESTINALTRAKTS	3
1.3 STEUERUNG DER GASTROINTESTINALEN MOTILITÄT	6
1.4 KONTRAKTION DER GLATTEN MUSKELZELLE.....	9
1.5 REGULATION DES MYOZELLULÄREN Ca^{2+} -GEHALTS UND DES MUSKELTONUS	10
1.5.1 ELEKTROMECHANISCHE KOPPLUNG	10
1.5.2 PHARMAKOMECHANISCHE KOPPLUNG	10
1.5.2.1 Ca^{2+} -ABHÄNGIGER SIGNALWEG	10
1.5.2.2 Ca^{2+} -SENSITIVIERUNG	11
1.5.2.3 ROCK UND PKC IN DER GLATTEN MUSKULATUR	13
1.6 FRAGESTELLUNG UND METHODISCHER ANSATZ	14
II. MATERIAL UND METHODEN.....	15
2.1 MATERIAL	15
2.1.1 GERÄTE	15
2.1.2 CHEMIKALIEN, PHARMAKA.....	15
2.1.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	16
2.1.4 SOFTWARE	16
2.1.5 VERSUCHSTIERE	17
2.1.6 SONSTIGES	17
2.2 METHODEN.....	17
2.2.1 HERSTELLUNG UND ZUSAMMENSETZUNG DER LÖSUNGEN.....	17
2.2.1.1 ORGANBADLÖSUNG	17
2.2.1.2 PRÄPARIERLÖSUNG	18
2.2.2 ORGANBAD	19
2.2.2.1 PRÄPARATION DER WISTAR-RATTE.....	19

2.2.2.2	AUFBAU ORGANBAD.....	20
2.2.2.3	ABLAUF	21
2.2.2.4	MESSABLAUF DER CARBACHOL DOSISTITRATIONSKURVE	22
2.2.2.5	MESSABLAUF DER CARBACHOL INDUZIERTEN KONTRAKTION UND REDUKTION DURCH PKC- UND ROCK-INHIBITOREN	24
2.2.3	AUSWERTUNG UND DARSTELLUNG DER MESSERGEBNISSE	26
2.2.4	STATISTIK	28
III.	ERGEBNISSE.....	29
3.1	DOSISWIRKUNGSKURVE CARBACHOL	29
3.2	REPETITION VON CARBACHOL	31
3.3	PKC- UND ROCK-INHIBITOREN	34
3.3.1	VORVERSUCHE.....	34
3.3.2	VERSUCHSREIHE MIT CHELERYTHRIN.....	35
3.3.3	VERSUCHSREIHE MIT H-7	38
3.3.4	VERSUCHSREIHE MIT Y-27632	40
3.3.5	VERSUCH KOMPLEX.....	44
IV.	DISKUSSION	45
4.1	WIRKUNG VON CARBACHOL IM GLATTEN MUSKEL.....	45
4.2	EFFEKTE EINER BLOCKADE DER ROCK AUF DIE KONTRAKTILITÄT DER GLATTEN MUSKULATUR DES UNTEREN GASTROINTESTINALTRAKTS	46
4.2.1	STUDIEN ZUR GLATTEN MUSKULATUR	47
4.2.2	STUDIEN ZUR GLATTEN MUSKULATUR IM ORGANBAD	48
4.2.3	POTENZIELLE ZUKÜNFTIGE ROLLE VON ROCK	52
4.3	EFFEKT EINER BLOCKADE DER PKC AUF DIE KONTRAKTILITÄT DER GLATTEN MUSKULATUR DES UNTEREN GASTROINTESTINALTRAKTS	52
4.3.1	STUDIEN ZUR GLATTEN MUSKULATUR IM ORGANBAD	53
4.3.2	POTENZIELLE ZUKÜNFTIGE ROLLE VON PKC	58
4.4	EFFEKT EINER BLOCKADE DER ROCK UND PKC AUF DIE KONTRAKTILITÄT DER GLATTEN MUSKULATUR DES UNTEREN GASTROINTESTINALTRAKTS	58
4.5	LIMITATIONEN	60
V.	ZUSAMMENFASSUNG	63
VI.	THESEN.....	64
	LITERATURVERZEICHNIS	65

ANHANG	81
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	86
DANKSAGUNG	87

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACh	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmodulin
CaM-(Ca ²⁺) ₄	Calcium-Calmodulin-Komplex
Carbachol	(2-Carbamoyloxyethyl)-trimethylammoniumchlorid
Chelerythrin	1,2-Dimethoxy-12-methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-c]phenanthridinium
CO ₂	Kohlendioxid
CPI-17	Proteinphosphatase 1-regulatorische Untereinheit 14A, auch als PP1R14A bezeichnet
DAG	Diacylglycerol
DMT	Dexmedetomidin
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration (engl. effective concentration)
ED ₅₀	Mittlere effektive Dosis (engl. effective dose)
EFS	Elektrische Feldstimulation
ET-1	Endothelin-1
G ₁₁	spezifische α-Untereinheit von G-Proteinen
G _{12/13}	spezifische α-Untereinheiten von G-Proteinen
GEFs	Guaninnucleotid-Austauschfaktoren (engl. guanine nucleotide exchange factors)
GFX	2-[1-(3-Dimethylaminopropyl)indol-3-yl]-3-(indol-3-yl) maleimide
G _q	spezifische α-Untereinheit von G-Proteinen
GTP	Guanosintriphosphat
H-7	1-(5-Isochinolinylsulfonyl)-2-methyl-piperazin-dihydrochlorid
IC ₅₀	Mittlere Inhibitorische Konzentration (engl. inhibitory concentration)

ICC	Interstitielle Zellen von Cajal (engl. interstitial cells of Cajal)
ICC-DMP	Interstitielle Zellen von Cajal am Dünndarm (engl. deep muscular plexus)
ICC-IM	Intramuskuläre Interstitielle Zellen von Cajal
ICC-MY	Interstitielle Zellen von Cajal am myenterischen Plexus
ICC-SMP	Interstitielle Zellen von Cajal am Dickdarm (engl. submuscular border of the human colon)
IP ₃	Inositoltriphosphat
K ⁺	Kalium
KCL	Kaliumchlorid
KCL _{post}	Hinzugabe Kaliumchlorid am Ende des Experiments
KCL _{pre}	Hinzugabe Kaliumchlorid am Anfang des Experiments
M ₂ KO	ohne M ₂ -Rezeptor (engl. M ₂ -receptor-knock-out)
M ₂ -Rezeptor	membranständiger Acetylcholinrezeptor
M ₃ KO	ohne M ₃ -Rezeptor (engl. M ₃ -receptor-knock-out)
M ₃ -Rezeptor	metabotroper Acetylcholinrezeptor
MLC	Myosin-Leichte-Ketten (engl. myosin light chain)
MLCK	Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (engl. myosin light chain kinase)
MYPT-1	Myosin-Phosphatase-Zieluntereinheit (engl. myosin phosphatase target subunit)
O ₂	Sauerstoff
PIP ₂	Phosphoinositoldiphosphat
PKC	Protein-Kinase C
PLC	Phospholipase C
PP1c	Proteinphosphatase 1, katalytische Untereinheit
RhoA	GTPase-Protein der Rho-Familie
ROCK	Rho-assoziierte Protein-Kinase (engl. rho-associated protein kinase)
ROCs	Rezeptor-gesteuerte Ionenkanäle (engl. receptor-operated channels)

RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (engl. reverse transcriptase-polymerase chain reaction)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (engl. sodium dodecyl sulfate – polyacrylamid gel electrophoresis)
VOCs	spannungsabhängige Ionenkanäle (engl. voltage-operated channels)
Y-27632	(1 <i>R</i> ,4 <i>r</i>)-4-[(<i>R</i>)-1-Aminoethyl]- <i>N</i> -(pyridin-4-yl)cyclohexancarboxamid

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABB. 1 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VOM AUFBAU DER DARMWAND	2
ABB. 2 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG WICHTIGER MOTILITÄTSMUSTER DES DICK- UND DÜNNDARMS SOWIE IHRE FUNKTION	5
ABB. 3 POSTGANGLIONÄRE PARASYMPATHISCHE SIGNALÜBERTRAGUNG AN MUSKARINERGE ACETYLCHOLIN-REZEPTOREN IN VIVO UND IN VITRO ZUR KONTRAKTION DER GLATTEN MUSKELZELLE	8
ABB. 4 SCHEMA DER ZWEI WESENTLICHEN SIGNALWEGE ZUR Ca^{2+} -SENSITIVIERUNG IN DER GLATTEN MUSKULATUR.....	12
ABB. 5 LOKALISATION DER ENTNAHMESTELLEN DER ZU UNTERSUCHENDEN DARMSEGMENTE	19
ABB. 6 SCHEMATISCHER AUFBAU EINER ORGANBADKAMMER.....	21
ABB. 7 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VERSUCHSABLAUFS DER CARBACHOL DOSISTITRATIONSKURVE	23
ABB. 8 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER CARBACHOL INDUZIERTEN KONTRAKTION UND REDUKTION DURCH PKC- UND ROCK-INHIBITOREN.....	25
ABB. 9 WIRKUNG VON CARBACHOL IN UNTERSCHIEDLICHEN DOSEN (0,01 BIS 100 μ MOL/L) AN DARMSEGMENTEN DER WISTAR-RATTE	30
ABB. 10 KRAFTVERÄNDERUNG BEI WIEDERHOLTER ZUGABE VON CARBACHOL (10 μ MOL/L) AN DUODENUM-SEGMENTEN	32
ABB. 11 KRAFTVERÄNDERUNG BEI WIEDERHOLTER ZUGABE VON CARBACHOL (10 μ MOL/L) AN ILEUM-SEGMENTEN	33
ABB. 12 KRAFTVERÄNDERUNG BEI WIEDERHOLTER ZUGABE VON CARBACHOL (10 μ MOL/L) AN COLON-SEGMENTEN.....	33

ABB. 13 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS CHELERYTHRIN (10 µMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 µMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN DUODENUM-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE.	35
ABB. 14 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS CHELERYTHRIN (10 µMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 µMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AM ILEUM DER WISTAR-RATTE.....	36
ABB. 15 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS CHELERYTHRIN (10 µMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 µMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AM COLON DER WISTAR-RATTE.....	37
ABB. 16 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS H-7 (5 µMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 µMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN DUODENUM-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE.	38
ABB. 17 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS H-7 (5 µMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 µMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN ILEUM-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE.....	39
ABB. 18 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS H-7 (5 µMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 µMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN COLON-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE.	40
ABB. 19 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN RHO-KINASE-INHIBITORS Y-27632 (5 µMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 µMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN DUODENUM-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE.	41
ABB. 20 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN RHO-KINASE-INHIBITORS Y-27632 (5 µMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 µMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN ILEUM-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE.....	42
ABB. 21 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN RHO-KINASE-INHIBITORS Y-27632 (5 µMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 µMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN COLON-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE.	43
ABB. 22 WIRKUNG VON 3 INHIBITOREN: CHELERYTHRIN (10 µMOL/L), H-7 (5 µMOL/L), Y-27632 (5 µMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 µMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN COLON-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE.	44
ABB. 23 SIGNALWEGE DER Ca^{2+} -SENSITIVIERUNG IN DER GLATTEN MUSKULATUR.....	60

ABB. 24 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS CHELERYTHRIN (10 μ MOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 μ MOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN DUODENUM-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE.	81
ABB. 25 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS H-7 (5 μ MOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 μ MOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN DUODENUM-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE.	81
ABB. 26 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN RHO-KINASE-INHIBITORS Y-27632 (5 μ MOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 μ MOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN DUODENUM-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE.	82
ABB. 27 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS CHELERYTHRIN (10 μ MOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 μ MOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AM COLON DER WISTAR-RATTE.	82
ABB. 28 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS H-7 (5 μ MOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 μ MOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN COLON-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE.	83
ABB. 29 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN RHO-KINASE-INHIBITORS Y-27632 (5 μ MOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 μ MOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN COLON-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE.	83
ABB. 30 WIRKUNG VON 3 INHIBITOREN: CHELERYTHRIN (10 μ MOL/L), H-7 (5 μ MOL/L), Y-27632 (5 μ MOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 μ MOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN COLON-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE.	84
ABB. 31 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS CHELERYTHRIN (10 μ MOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 μ MOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AM ILEUM DER WISTAR-RATTE.	84
ABB. 32 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS H-7 (5 μ MOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 μ MOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN ILEUM-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE.	85
ABB. 33 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN RHO-KINASE-INHIBITORS Y-27632 (5 μ MOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 μ MOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN ILEUM-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE.	85

TABELLENVERZEICHNIS

TAB. 1 ÜBERSICHT GERÄTE	15
TAB. 2 ÜBERSICHT CHEMIKALIEN, PHARMAKA	15
TAB. 3 ÜBERSICHT VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	16
TAB. 4 ÜBERSICHT SOFTWARE.....	16
TAB. 5 ÜBERSICHT SONSTIGE MATERIALIEN	17
TAB. 6 CHEMIKALIEN ZUR ANFERTIGUNG DER ORGANBADLÖSUNG	18
TAB. 7 CHEMIKALIEN ZUR ANFERTIGUNG DER PRÄPARIERLÖSUNG	18
TAB. 8 VERWENDETE CHEMIKALIEN UND AUFLISTUNG DER KONZENTRATIONEN MIT RESULTIERENDEN KONZENTRATIONEN IM ORGANBAD	22
TAB. 9 ÜBERSICHT INTERVENTIONEN DES HAUPTEXPERIMENTES	26
TAB. 10 STUDIEN ZUR GLATTEN MUSKULATUR.....	48
TAB. 11 STUDIEN ZUR GLATTEN MUSKULATUR IM ORGANBAD	51
TAB. 12 STUDIEN ZUR GLATTEN MUSKULATUR BEI DER VERWENDUNG VON PKC-INHIBITOREN IM ORGANBAD	57

I. EINLEITUNG

Als kontraktile Apparat erfüllt die glatte Muskulatur in verschiedenen Organen vielfältige mechanische Aufgaben. Sie ermöglicht es dem Gastrointestinaltrakt, durch komplexe aufeinander abgestimmte Kontraktionen und Relaxationen, den Darminhalt fortzubewegen. Die Motilität des unteren Gastrointestinaltraktes kann von diversen Faktoren beeinflusst und durch unterschiedliche Wege ausgelöst werden. Kommt es zu einer erhöhten, reduzierten oder auch fehlenden gastrointestinalen Motilität, besteht die Gefahr einer Dysfunktion.

1.1 AUFBAU UND FUNKTION UNTERER GASTROINTESTINALTRAKT

Der Verdauungstrakt, welcher sich als Muskelschlauch von der Mundhöhle bis zum After hin erstreckt, kann in verschiedene Abschnitte unterteilt werden. Er kann anhand der spezifischen Aufgaben der jeweiligen Organe, in den oberen und unteren Gastrointestinaltrakt gegliedert werden. Zum oberen Gastrointestinaltrakt zählen die Mundhöhle, der Rachen, die Speiseröhre und der Magen. Schlussfolgernd bilden der Dünn- sowie Dickdarm den unteren Gastrointestinaltrakt. Histologisch gesehen weisen diese Organe eine vergleichbare Wandstruktur auf, die je nach Abschnitt und Funktion angepasst ist. Sie bestehen aus der Tunica mucosa, der Tela submucosa, der Tunica muscularis und der Tunica Serosa (bei intraperitonealen Organen) bzw. der Tunica adventitia bei extra- und retroperitonealen Organen (Liao et al. 2009). Die Tunica mucosa besteht aus drei Schichten: der Lamina epithelialis mucosae (Schleimhautepithel), der Lamina propria mucosae (Schleimhautbindegewebe) sowie der Lamina muscularis mucosae (Schleimhautmuskelschicht). Die daran angrenzende Tela submucosa besteht aus einer Bindegewebsschicht mit Blut- und Lymphgefäßen sowie Nervenfasern des Plexus submucosus (Meissner-Plexus). Die dritte Wandschicht ist die Tunica muscularis, welche meist aus einer inneren Ringmuskelschicht (Stratum circulare) und äußeren Längsmuskelschicht (Stratum longitudinale) besteht. Diese Muskelschichten haben die Funktion den Speisebrei zu durchmischen und weiterzutransportieren. Zwischen diesen beiden Muskelschichten befindet sich der Plexus myentericus (Auerbach Plexus), der die Darmmotilität reguliert. In die Muskulatur des unteren Gastrointestinaltraktes sind außerdem spindel- und sternförmige Zellen mit Zellkern eingebettet, welche als interstitiellen Zellen von Cajal (ICC) bezeichnet werden. Diese sind über Gap Junctions untereinander und mit den angrenzenden glatten Muskelzellen der jeweiligen Lokalisation, wie in *Abb. 1* beschrieben, verbunden. Des Weiteren bilden sie synapsenartige Verbindungen mit Varikositäten der enterischen Nervenzellen. Auf die Funktion der ICC wird in *Kapitel 1.3* näher eingegangen. Die äußere Wandschicht besteht aus Tunica adventitia oder Tunica Serosa. Letzteres

überzieht eine Bindegewebsschicht (Tela subserosa), die sich durch arterielle und venöse Gefäßnetze charakterisiert. (Kirsch et al. 2024; Vaupel und Jänig 2019; Liao et al. 2009)

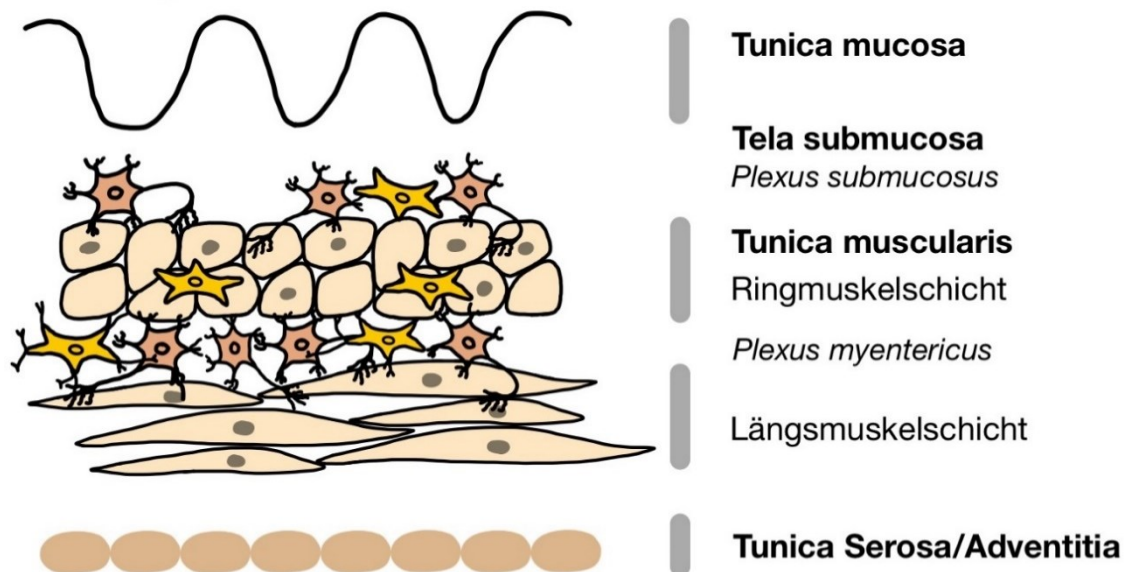


ABB. 1 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VOM AUFBAU DER DARMWAND Der vereinfachte Längsschnitt durch die Darmwand zeigt die typischen Schichten von Dünndarm und Dickdarm. Die Tunica mucosa bildet die innere Begrenzung zum Darmlumen. Darunter liegt die Tela submucosa, eine Bindegewebsschicht, die den Plexus submucosus sowie spezifische interstitielle Zellen von Cajal (ICC-SMP im Dickdarm, ICC-DMP im Dünndarm) enthält (gelb dargestellt). Die Tunica muscularis besteht aus einer inneren Ringmuskelschicht (Stratum circulare) und einer äußeren Längsmuskelschicht (Stratum longitudinale). Zwischen diesen beiden Muskelschichten liegt der Plexus myentericus, in dessen Bereich auch die ICC-MY angesiedelt sind. Innerhalb der Muskelschichten befinden sich zusätzlich intramuskuläre ICC (ICC-IM). Die enterischen Nervenzellen (braun dargestellt) sind im Plexus submucosus und Plexus myentericus organisiert und lassen sich in exzitatorische und inhibitorische Motoneurone, Interneurone sowie sensorische Neurone unterteilen. Die äußere Begrenzung der Darmwand bildet entweder die Tunica serosa (bei intraperitonealen Abschnitten) oder die Tunica adventitia (bei retroperitonealen Abschnitten). (Sanders et al. 2014; Burns et al. 1997; Ward und Sanders 2001; Liao et al. 2009)

Obwohl Dün- und Dickdarm gemeinsame histologische Merkmale aufweisen, unterscheiden sie sich in ihrem anatomischen Aufbau und ihrer Funktion. Der Dünndarm hat eine Länge von etwa 3 bis 5 m und wird von oral nach aboral in das Duodenum, Ileum und Jejunum unterteilt. Das Duodenum neutralisiert zunächst den sauren Speisebrei aus dem Magen, bevor die enthaltenen Nährstoffe mithilfe von Verdauungsenzymen weiter abgebaut und teilweise resorbiert werden. Dieser Prozess wird durch Gallenflüssigkeit, Verdauungsenzyme und Hydrogencarbonat des Pankreas sowie der Brunner-Drüsen unterstützt. Das Duodenum ist ca. 25 cm lang, erstreckt sich c-förmig um das Pankreas herum und lässt sich von oral nach aboral in die Pars superior, Pars descendens, Pars horizontalis und Pars ascendens unterteilen. Durch die Vorwölbung der Tunica mucosa und Tela submucosa entstehen die für den Dünndarm typischen Ringfalten (Plicae circulares). Im Anschluss an das Duodenum erstrecken sich das Jejunum und Ileum auf einer Länge von etwa 3 bis 5 m. Ihre Funktion liegt

in der enzymatischen Spaltung der Nahrungsbestandteile und Durchmischung des Speisebreis. Das ca. 3 m lange Ileum befindet sich vor allem in der rechten unteren Bauchhöhle und im großen Becken, wo es an der Valva ileocaecalis (Bauhin-Klappe) in das Colon übergeht. Unterhalb der Bauhin-Klappe erstreckt sich der Blinddarm (Caecum) und bildet den ersten Abschnitt des Dickdarms. Allgemein lässt sich der Dickdarm in das Caecum mit der Appendix vermiformis, das Colon, das Rectum und den Canalis analis unterteilen, wobei sich das Colon wiederum in das Colon ascendens, Colon transversum, Colon descendens und das s-förmige Colon sigmoideum gliedert. Mit einer Gesamtlänge von 1,5 m legt sich das Colon wie ein Rahmen um die Dünndarmschlingen. Seine Funktion liegt in der Resorption von Wasser und Elektrolyten aus dem Speisebrei, wodurch dieser eingedickt und durch den Enddarm als Faeces ausgeschieden wird. Charakteristisch für das Caecum und das Colon sind Tännien, Haustren (lokale Einschnürungen der Ringmuskulatur) und Appendices epiploicae (Fettanhängsel). Als Tännien werden drei kräftig ausgebildete Längsstreifen der Tunica muskularis bezeichnet, die aus der äußeren Längsmuskelschicht (Stratum longitudinale) hervorgehen, dort zu schmalen Bündeln verdichtet sind und in Abhängigkeit ihrer Verwachsung benannt werden. (Kirsch et al. 2024; Vaupel und Jänig 2019)

Der Gastrointestinaltrakt ist ein wichtiges Ausscheidungsorgan und übernimmt eine entscheidende Rolle bei der Ausscheidung unverdaulicher Nahrungsmittelbestandteile sowie potenziell schädlicher Stoffe, wobei die Peristaltik letztlich für den Abtransport von Erregern und deren Ausleitung mit dem Stuhl verantwortlich ist.

1.2 MOTILITÄT DES UNTEREN GASTROINTESTINALTRAKTS

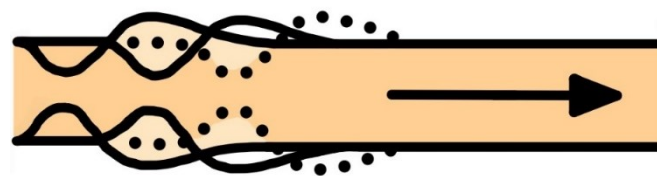
In der Regel dauert es ca. ein bis drei Tage die aufgenommene Nahrung wieder auszuscheiden. Die zugeführte Kost wird auf ihrem Weg durch den Verdauungstrakt mechanisch zerkleinert, mit den Verdauungssekreten durchmengt und weiter Richtung aboral befördert. Diese Vorgänge werden mit Hilfe der gastrointestinalen Motilität ermöglicht (Leipziger 2017), wobei die Kontraktion der glatten Muskulatur entweder als tonisch oder phasisch klassifiziert werden kann (Reho et al. 2014; Fisher 2010). Die tonische Kontraktion bezeichnet eine anhaltende, lang andauernde Muskelkontraktion, wie sie beispielsweise in den inneren Sphinkteren des Gastrointestinaltrakts vorkommt. Im Gegensatz dazu sind phasische Kontraktionen kurz andauernde, rhythmische Muskelaktivitäten, die maßgeblich zur Peristaltik des Gastrointestinaltrakts beitragen und den Transport des Speisebreis entlang des Verdauungstrakts ermöglichen (Pfitzer 2022). Grundsätzlich lässt sich die gastrointestinale Motilität in zwei Phasen unterteilen, die digestive und die interdigestive Motilität (Gekle 2023).

Charakteristisch für die interdigestive Phase oder Nüchternmotilität ist ein immer wiederkehrendes Motilitätsmuster, das als „Migrating Motor Complex“ (MMC) bezeichnet wird und dessen Aufgabe es ist, unverdauliche Nahrungsreste und Verdauungssekrete durch kräftige peristaltische Wellen abzutransportieren, wodurch die Bakterienvermehrung im Dünndarm unter Kontrolle gehalten wird. Dabei handelt es sich um motorische Wellen, die alle 30 bis 120 min vom unteren Ösophagussphinkter bis in das terminale Ileum wandern können (Kellow et al. 1986). Der MMC zeichnet sich durch drei zyklisch wiederkehrende Phasen aus: In der Phase I findet eine einstündige Ruhepause mit wenig bis keine Kontraktionen statt. Daraufhin treten in Phase II für ca. 30 bis 45 min vereinzelnde Kontraktionen mit einer wechselnden Stärke und Frequenz auf. Dazu zählen unregelmäßige Segmentationsbewegungen und irreguläre, nicht weitergeleitete oder über kurze Strecken fortgeleitete Kontraktionen. In Phase III verlaufen regelmäßige, propulsive peristaltische Wellen mit maximaler Intensität für ca. 5 bis 15 min. Die Aktivitätsfront wandert dabei langsam vom Magen bis ins terminale Ileum mit einer Fortleitungsgeschwindigkeit von 2 bis 4 cm/min. Die Kontraktionsfrequenz entspricht der Slow-Wave-Aktivität der jeweiligen Organregion, da nahezu alle Slow Waves in dieser Phase durch Spike-Potenziale in tatsächliche Muskelkontraktionen überführt werden. Bei einem gesunden Menschen bedeutet das etwa 3 Kontraktionen/min im distalen Magen, 11 bis 12 Kontraktionen/min im proximalen Dünndarm und etwa 8 bis 9 Kontraktionen/min im distalen Dünndarm. (Allescher 2020; Herbert und Holzer 2009). Hierbei kann eine höhere Aktivität in der Nacht als am Tag festgestellt werden. Der Phase III folgt immer eine Phase I, womit der Zyklus erneut beginnt. (Leipziger 2017; Gekle 2023; Deloose et al. 2012; Kellow et al. 1986)

Nach der Nahrungsaufnahme wird das interdigestive Motilitätsmuster durch ein intensives, kontinuierliches und höherfrequentes Kontraktionsmuster ersetzt, das unterschiedliche Amplituden aufweist (Staumont et al. 1992). Nach dem Nüchternzustand weist die gastrointestinale Motilität unterschiedliche Aktivitätsmuster auf. Zu den postprandialen Motilitätsmustern des Dünndarms zählen die propulsive und nicht-propulsive Peristaltik mit Segmentationen sowie Pendelbewegungen (Vaupel 2010; Gekle 2023).

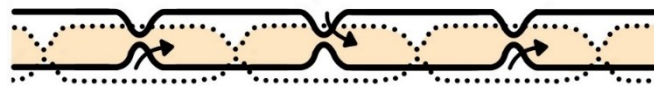
Mit Hilfe der propulsiven Peristaltik findet der oral-aborale Transport statt, welcher durch den Wechsel von Kontraktion und Relaxation der Ringmuskulatur wellenförmig über das Darmrohr wandert (Vaupel 2010; Waterman et al. 1994). Die Durchmischung des Darminhalts wird durch nicht-propulsive Peristaltik, bei der es zur Kontraktion der Ringmuskulatur über kurze Strecken kommt, sowie durch Segmentation, die durch lokale, zirkuläre Kontraktion der Ringmuskulatur entsteht, hervorgerufen. Durch die nicht-propulsive Peristaltik kann auch der Darminhalt langsam nach distal transportiert werden, da eine Frequenzabnahme von oral nach aboral

vorliegt (Vaupel 2010; Vaupel und Jänig 2019). Unterstützt wird die Durchmischung durch Pendelbewegungen, die durch lokal begrenzte rhythmische Kontraktionen der Längsmuskulatur ausgelöst werden, wodurch eine Längsverschiebung der Darmwand über den Darminhalt und dadurch indirekt ein Weitertransport des Chymus erreicht wird (Gekle 2023; Vaupel 2010).



Peristaltik

*propulsiv führt zum Transport,
nicht propulsiv führt zur
Durchmischung des Darminhalts*



Rhythmische Segmentation

Durchmischung des Darminhalts

ABB. 2 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG WICHTIGER MOTILITÄTSMUSTER DES DICK- UND DÜNNDARMS SOWIE IHRE FUNKTION Propulsive Peristaltik führt durch eine koordinierte Kontraktion und Erschlaffung der Ring- und Längsmuskulatur zum oral-aboralem Transport. Die Durchmischung des Darminhalts erfolgt durch die nicht propulsive Peristaltik, die sich über lokale Kontraktionen der Ringmuskulatur über eine kurze Strecke fortpflanzt, sowie durch Segmentationsbewegungen. Typisch für die Segmentationsbewegungen sind gleichzeitige Kontraktionen der Ringmuskulatur eng benachbarter und wechselnder Abschnitte der Darmwand. Die Durchmischung bewirkt zugleich einen langsamen Weitertransport des Darminhalts, da die Kontraktionsfrequenz von oral nach aboral stetig abnimmt. (Stehle und Ellinger 2024; Leipziger 2017; Vaupel und Jänig 2019)

Im Gegensatz zum Dünndarm, der zwischen digestiver und interdigestiver Phase unterscheidet, kann die Motilität des Colons in zwei funktionelle Phasen, gerichtete (propulsiv) und ungerichtete (nicht-propulsiv) Bewegungen, unterteilt werden. Die Dickdarmmotorik zeichnet sich dabei besonders durch die nicht-propulsive Peristaltik mit Segmentationen, Pendelbewegungen und retrograder Peristaltik aus. Von der Hauptschrittmacherzone, welche das Colon transversum bildet, breiten sich die Kontraktionen der Ringmuskulatur nach oral (retrograde Peristaltik) und aboral aus. Die retrograde Peristaltik fördert die Durchmischung des Darminhalts sowie die Wasserresorption. Aufgrund dessen erfolgt die Speicherung der Fäzes überwiegend im Caecum, Colon ascendens und Rektum. Dort passt sich der Durchmesser des Darmlumens durch Akkommodation („adaptive Relaxation“) an (Herbert und

Holzer 2009). Die Längsmuskelschicht des Colons weist einen ständig erhöhten Tonus auf, wodurch der Dickdarm verkürzt wird. In Kombination mit den Segmentationsbewegungen der Ringmuskulatur führt dies zur Bildung der typischen Haustren (Leipziger 2017; Gekle 2023).

Gerichtete Bewegungen umfassen insbesondere die peristaltischen Kontraktionen, die zwei- bis dreimal täglich auftreten und den Darminhalt durch Massenbewegung ca. 20 bis 30 cm in Richtung Rektosigmoid befördern (Sarna 2010). Diese können durch den sog. „gastrokolischen Reflex“ (Nahrungsaufnahme) gefördert werden und damit zum Stuhlgang führen (Körber und Hoffmann 2022). Durch distale Massenbewegungen wird das normalerweise leere Rektum mit Fäzes gefüllt, wodurch eine Dehnung des Rektums erfolgt. Diese Dehnung initiiert wiederum den Defäkationsreflex. Die Dickdarmmotorik zeichnet sich außerdem durch eine zirkadiane Rhythmik mit geringerer Aktivität in der Nacht und hoher Aktivität am Vormittag aus (Leipziger 2017; Gekle 2023).

1.3 STEUERUNG DER GASTROINTESTINALEN MOTILITÄT

Die Steuerung des Gastrointestinaltrakts findet mit Hilfe von neuronalen, hormonellen und myogenen Mechanismen unwillkürlich statt. Die neuronale Steuerung umfasst das enterische Nervensystem, welches als „Gehirn des Darms“ bezeichnet und dessen Aktivität von Sympathikus und Parasympathikus moduliert wird. Es besteht aus dem Plexus myentericus („Auerbach“), der an der Regulation von Motilität und Durchblutung beteiligt ist, sowie dem Plexus submucosus („Meissner“), dessen Hauptaufgabe in der Steuerung der Sekretion des Epithels liegt (Chanpong et al. 2022; Leipziger 2017; Schneider et al. 2019). Über lokale Reflexbögen können komplexe Bewegungsmuster, wie die Peristaltik, ausgeführt werden. Wird ein Darmsegment durch einen Bolus gedehnt, aktivieren sensorische Neurone hemmende Interneurone, die eine Relaxation der Längsmuskulatur im aufsteigenden Bereich bewirken. Gleichzeitig wird die Ringmuskulatur in diesem Abschnitt enthemmt, sodass eine Kontraktion erfolgt. Analwärts kommt es zur umgekehrten Reaktion: Hemmende Interneurone werden deaktiviert, wodurch die Ringmuskulatur erschlafft, während die Längsmuskulatur kontrahiert und das Darmsegment verkürzt. Dieses koordinierte Zusammenspiel der Muskelaktivität ermöglicht die gerichtete Bewegung des Speisebreis entlang des Verdauungstrakts. (Gekle 2023). Außerdem nehmen viszerale Afferenzen Einfluss auf die Regulation der Darmmotorik. Die sensorischen Nervenendigungen dieser Afferenzen befinden sich in der Organwand und fungieren als Mechanorezeptoren, Chemorezeptoren und Nozizeptoren, die mechanische Dehnung, chemische Reize oder andere Stimuli wahrnehmen und entsprechende Reflexantworten vermitteln. (Gekle 2023; Leipziger 2017)

Eine weitere wichtige Rolle für die Darmmotilität nehmen die Schrittmacherzellen, auch als interstitielle Cajal-Zellen bezeichnet, ein (Sanders et al. 2023). Im Gastrointestinaltrakt finden sich u.a. ICC-MY, diese kommen in hoher Dichte im Dünndarm vor und gelten dort als primäre Schrittmacher (Blair et al. 2014). Dagegen können die ICC-MY im Colon eher als „konditionale Schrittmacherzellen“ bezeichnet werden, da sie keine autonome Schrittmacheraktivitäten aufweisen, sondern diese nur unter bestimmten Bedingungen entfalten (Baker et al. 2025). Die ICC-MY befinden sich zwischen der Ringmuskelschicht und der Längsmuskelschicht und lösen spontane rhythmische Depolarisationen aus (Sanders et al. 2014; Sanders et al. 2023). Da es sich bei der Darmmuskulatur um den Single-Unit-Typ handelt, bei dem benachbarte Zellen über Gap Junctions verbunden sind, können langsame, spontan aktive Potenzialwellen („Slow Waves“) über die glatte Muskulatur ausgebreitet werden, ohne eine Kontraktion auszulösen (Sanders et al. 2014). Die Frequenz der spontan auftretenden Slow Waves beträgt im Duodenum ca. 12/min, im Ileum 8-10/min (Erickson et al. 2009) und im Colon ca. 4-6/min (Rae et al. 1998). Kommt es bei den Depolarisationen zur Überschreitung des Schwellenpotentials, durch die Einwirkung von Hormonen, Transmitter (ACh) oder einer Wanddehnung, führen Ca^{2+} -Aktionspotenziale zur phasischen Kontraktion. Sogenannte Spike-Salven entstehen, wenn nur eine geringe Anzahl an Aktionspotentialen ausgelöst werden, bei zeitweiligem Überschreiten des Schwellenpotentials. Mehrerer solcher aufeinanderfolgender phasischer Kontraktionen führen zur Segmentation oder Peristaltik (Sanders et al. 2006).

Die extrinsische Aktivierung der Darmmotilität erfolgt über das vegetative Nervensystem. Dabei übt der Sympathikus durch Noradrenalin einen hemmenden Einfluss aus, während der Parasympathikus durch Acetylcholin (ACh) eine fördernde Wirkung auf die Darmmotilität hat.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Segmente des Dünndarms und des proximalen Dickdarms werden von parasympathischen Fasern aus der Medulla oblongata über den N. vagus innerviert (Huppelsberg und Walter 2013; Leipziger 2017). Bei der Umschaltung präganglionäre Neurone auf postganglionäre Neurone wird ACh freigesetzt. Die präganglionären parasympathischen Fasern des N. vagus bilden erregende Synapsen mit Neuronen des Auerbach-Plexus, die als postganglionäre parasympathische Neurone agieren. Durch die Aktivierung dieses enterischen Netzwerks kann die Vagusaktivität in eine gesteigerte Darmmotilität und Sekretion umgesetzt werden (Behrends 2021).

Die Transmitter der postganglionären Neuronen vermitteln ihre Wirkung parasympathisch über muskarinerge ACh-Rezeptoren. Die Bindung von ACh an den Rezeptor setzt einen G-Protein beteiligten Signalprozess in Gang (McCorry 2007). Die Rezeptoren lassen sich in fünf

Subtypen („M₁“ bis „M₅“) einteilen (Lenzi und Tuscano 2004), wobei vor allem der M₃-Rezeptor in der glatten Muskulatur (Roffel 1990) des Magen-Darm-Trakts exprimiert ist.

in vivo

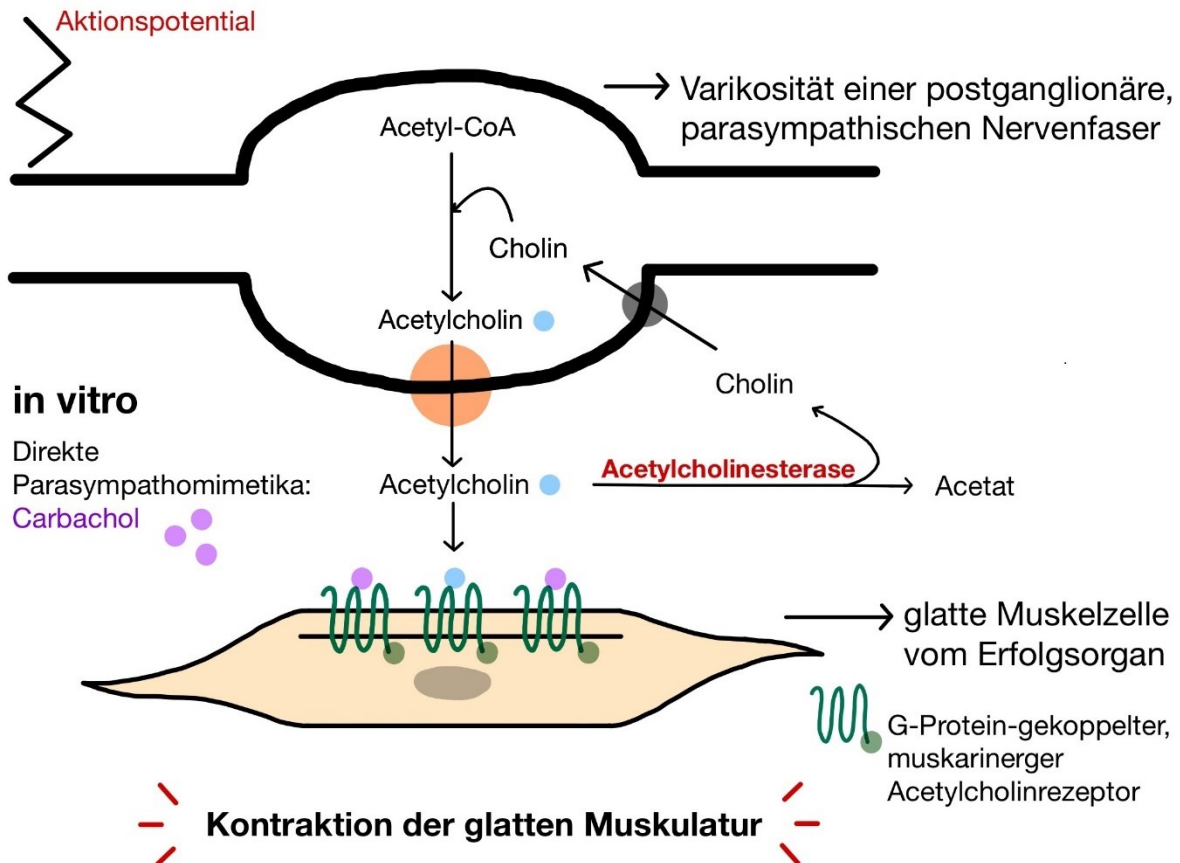


ABB. 3 POSTGANGLIONÄRE PARASYMPATHISCHE SIGNALÜBERTRAGUNG AN MUSKARINERGE ACETYLCHOLIN-REZEPTOREN IN VIVO UND IN VITRO ZUR KONTRAKTION DER GLATTEN MUSKELZELLE Die postganglionäre parasympathische Signalübertragung erfolgt in vivo durch die Freisetzung von Acetylcholin (ACh) aus Varikositäten der Nervenfasern. Ein ankommendes Aktionspotential öffnet spannungsgesteuerte Calciumkanäle, wodurch Calcium in die Varikosität einströmt und die Exozytose von ACh-haltigen Vesikeln auslöst. Das freigesetzte ACh bindet an G-Protein gekoppelte muskarinerge M₃-Rezeptoren, was zur Freisetzung von intrazellulärem Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum führt. In vitro wird das direkte Parasympathomimetikum Carbachol verwendet, um die Wirkung von ACh zu imitieren. Da es nicht durch Acetylcholinesterase abgebaut wird, ermöglicht es eine langanhaltende Aktivierung der muskarinergen Rezeptoren. Der Anstieg der Calciumkonzentration bewirkt die Kontraktion der glatten Muskelzellen. Dieser Mechanismus ist sowohl in vivo als auch in vitro nachweisbar und spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Darmmotilität durch das parasympathische Nervensystem. (Mutschler et al. 2020; McCorry 2007)

In der Forschung wird für die Aktivierung des Parasympathikus und somit auch die Kontraktion der glatten Muskulatur, der Neurotransmitter ACh notwendig. Dieser kann aufgrund der sehr schnellen Inaktivierung, in weniger als einer Millisekunde, durch die Acetylcholinesterase in vitro nicht verwendet werden (McCorry 2007). Aufgrund dessen wird ein Agonist verwendet, welcher in vitro die Wirkung von ACh am muskarinergen Cholinorezeptor imitiert. In der

vorliegenden Arbeit wurde daher das direkte Parasympathomimetikum Carbachol verwendet, welches von der Acetylcholinesterase nicht oder nur sehr langsam gespalten wird (Hein und Fischer 2020) und somit eine längere Wirksamkeit besitzt (Lüllmann et al. 2016).

1.4 KONTRAKTION DER GLATTEN MUSKELZELLE

Die Gleitfilament-Theorie von Huxley (1957) bildet die Grundlage der Kontraktion der glatten Muskelzelle und erklärt, dass die Muskelkontraktion durch das aktive Gleiten von Aktin- und Myosinfilamenten erfolgt.

Der Hauptmechanismus beruht auf der Phosphorylierung der Myosin-Leichte-Kette (MLC) am Serin 19 durch die Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK) bzw. der Dephosphorylierung durch die MLC-Phosphatase (MLCP) (Lee et al. 1997). Durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf etwa $1 \mu\text{mol/L}$ kommt es zur Aktivierung des Querbrückenzyklus und somit zur Bildung eines Calcium-Calmodulin-Komplex ($\text{CaM}-(\text{Ca}^{2+})_4$) (Akata 2007). Der $\text{CaM}-(\text{Ca}^{2+})_4$ bildet ein Holoenzym mit der MLCK, wodurch diese Kinase und andere abhängige Kinasen aktiviert werden. Diese Kinasen phosphorylieren die hemmenden Proteine Calponin und Caldesmon, wodurch die Blockade der Myosin-ATPase-Aktivität und Blockade der Myosin-Bindungsstellen aufgehoben wird. Die aktivierte MLCK ist in der Lage die regulatorische MLC zu phosphorylieren, wodurch sich der Myosinkopf hochaffin an das Aktinfilament lagern kann. Dadurch erfolgt eine Konformationsänderung, wobei durch den Kraftschlag des Myosinköpfchens, das Aktinfilament schrittweise gezogen wird. Durch die Freisetzung von Phosphat und im Anschluss ADP am Myosinkopf, kann die Bindung und Hydrolysierung eines neuen ATP-Moleküls erfolgen und der Querbrückenzyklus wird erneut durchlaufen. (Somlyo und Somlyo 2003; Kraft und Brenner 2023; Ikebe et al. 1987)

Durch das Absinken der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf etwa $0,1 \mu\text{mol/L}$ folgt eine Auflösung des $\text{CaM}-(\text{Ca}^{2+})_4$ und somit die Inaktivierung der MLCK (Akata 2007). Dadurch überwiegt die Aktivität der MLCP, welche die regulatorische MLC dephosphoryliert und somit den Querbrückenzyklus stoppt, woraus die Relaxation der glatten Muskelzelle resultiert. Die phosphorylierungsabhängige Regulation ist der dominante, aber nicht der ausschließliche Mechanismus (Kraft und Brenner 2023). Eine Besonderheit der glatten Muskulatur ist der sogenannte „Latch“-Mechanismus, welcher durch eine reduzierte Querbrücken-Zyklus-Frequenz und einer verringerten Ablösungsrate der Querbrücken ermöglicht, bei langanhaltenden tonischen Kontraktionen Energie einzusparen (Murphy und Rembold 2005). Dies wirkt sich bedeutend auf die Ausdauerfähigkeit der glatten Muskulatur aus.

1.5 REGULATION DES MYOZELLULÄREN Ca^{2+} -GEHALTS UND DES MUSKELTONUS

Die Mechanismen zur Auslösung von Kontraktion und Relaxation im glatten Muskel werden primär durch Änderung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration reguliert. Für die Regulation ist neben der elektromechanischen noch die pharmakomechanische Kopplung bekannt.

1.5.1 ELEKTROMECHANISCHE KOPPLUNG

Durch die Depolarisation der Zellmembran, welche ein Ruhemembranpotential von - 40 bis - 80 mV im Gastrointestinaltrakt aufweist (Heidt et al. 1997), werden spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle geöffnet und ermöglichen das Einströmen von extrazellulärem Ca^{2+} in das Sarkoplasma (Bolton et al. 1999). Somit kommt es zu einer Erhöhung der intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und zusätzlich zu einer Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (Bolton et al. 1999). In der Forschung wird diese Depolarisation durch eine Erhöhung der extrazellulären KCL-Konzentration erzielt (Ratz et al. 2005). In der glatten Muskulatur des unteren Gastrointestinaltrakt werden durch Cajal-Zellen spontane rhythmische Depolarisationen erzeugt. Die durch Schrittmacherzellen ausgelösten Membranpotentialschwankungen breiten sich als Slow Waves aus und führen erst bei Überschreitung des Schwellenpotentials zur Kontraktion. (Sanders et al. 2014)

1.5.2 PHARMAKOMECHANISCHE KOPPLUNG

Das Prinzip der pharmakomechanischen Kopplung basiert auf der Bindung von Agonisten an membranständige Rezeptoren und führt zur Kontraktion ohne zwingende Änderung des Membranpotentials (Rembold 1992). Zu den Agonisten zählen Neurotransmitter (z.B. Acetylcholin, Noradrenalin), Hormone (z.B. Angiotensin II) sowie lokale Mediatoren (z.B. Endothelin, Histamin) (Beech 1997). Im Vergleich zur elektromechanischen Kopplung wird bei der pharmakomechanischen Kopplung weniger Ca^{2+} im Zytoplasma freigesetzt, dennoch ist die Intensität der Kontraktion vergleichbar, oder sogar stärker. Dieser Effekt lässt sich durch die Aktivierung von Signalkaskaden erklären, die zur Ca^{2+} -Sensitivierung führen (Perrino 2016).

1.5.2.1 Ca^{2+} -ABHÄNGIGER SIGNALWEG

Durch den Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration wird eine Kontraktion der glatten Muskulatur ausgelöst. Ca^{2+} kann dabei durch den Extrazellulärraum in das Zytopsol der Zelle gelangen

oder aus dem sarkoplasmatischen Retikulum zum Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führen (Berridge et al. 1998; McDaniel et al. 2001; Berridge et al. 2003). Hormonelle Agonisten wie Acetylcholin binden an muskarinerge Rezeptoren der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltrakts und aktivieren über das $\text{G}_{q/11}$ -Protein die Phospholipase C (PLC) (Tanahashi et al. 2021), die das Membranlipid Phosphoinositoldiphosphat (PIP_2) zu Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert (Xia et al. 2001). IP_3 bindet als Botenstoff an die IP_3 -Rezeptoren des sarkoplasmatischen Retikulums, wodurch eine Öffnung der Ca^{2+} -Kanäle erfolgt und die zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration steigt (Bootman et al. 2002; Hisatsune et al. 2005). Durch die Bindung von Neurotransmittern an der Zellmembran kann es durch ROCs („receptor-operated channels“) zu einer indirekten Depolarisation der Zellmembran kommen und nachfolgend zur Öffnung von spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle („voltage-operated channels“; VOCs) (Heinrich et al. 2022). Diese Mechanismen führen zum Zufluss von Ca^{2+} (Berridge et al. 1998). Schlussendlich erfolgt durch die Bindung eines $\text{CaM}-(\text{Ca}^{2+})_4$ an die regulatorische MLC die Phosphorylierung und somit die Aktivierung der selbigen (Martinsen et al. 2014).

1.5.2.2 Ca^{2+} -SENSITIVIERUNG

Ein weiterer Mechanismus führt ohne Steigung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels zur Kontraktion der glatten Muskulatur, stattdessen wird die Empfindlichkeit des kontraktile Apparates gegenüber Ca^{2+} erhöht, was zu einer verstärkten Muskelkontraktion führen kann. Dieses Phänomen wird als Ca^{2+} -Sensitivierung bezeichnet (Perrino 2016; Webb 2003). Der Phosphorylierungsgrad der regulatorischen leichten Ketten wird durch die Aktivität der MLCP reguliert. Diese steuert die Relaxation der glatten Muskulatur durch die Abspaltung der Phosphatgruppe von der MLC (Lee et al. 1997). Der Muskeltonus steigt, sobald die relative Aktivität der MLCP sinkt, da mehr Myosin phosphoryliert wird. Dieser Signalweg setzt eine Hemmung der MLCP voraus (Somlyo und Somlyo 2003). Die MLCP ist ein Holoenzym, das sich aus insgesamt drei Untereinheiten zusammensetzt. Dazu zählen eine 38 kDa schwere katalytische Untereinheit (PP1c), eine 110 kDa schwere regulatorische Untereinheit (MYPT-1) sowie eine 20 kDa große regulatorische Untereinheit (Kitazawa et al. 2003). Die Aktivitätsminderung der MLCP erfolgt im Wesentlichen über zwei Mechanismen. Zum einen wird die Aktivierung der Rho-Kinase (ROCK) durch die Bindung von Agonisten an $\text{G}_{12/13}$ oder G_q gekoppelte Rezeptoren der Zellmembran ausgelöst. Hierbei werden Guaninnucleotid-Austauschfaktoren (GEFs) für die monomere GTPase RhoA aktiviert. Dies führt dazu, dass RhoA von der inaktiven GDP-gebundenen Form in die aktive GTP-gebundene Form überführt wird, zur Zellmembran transloziert und dort die ROCK aktiviert. Die ROCK vermindert die

Aktivität der MLCP durch Phosphorylierung ihrer regulatorischen Untereinheit MYPT1. Daraus resultiert eine Erhöhung des Phosphorylierungsgrades der MLC und eine Verstärkung der Kontraktion (Webb 2003; Perrino 2016).

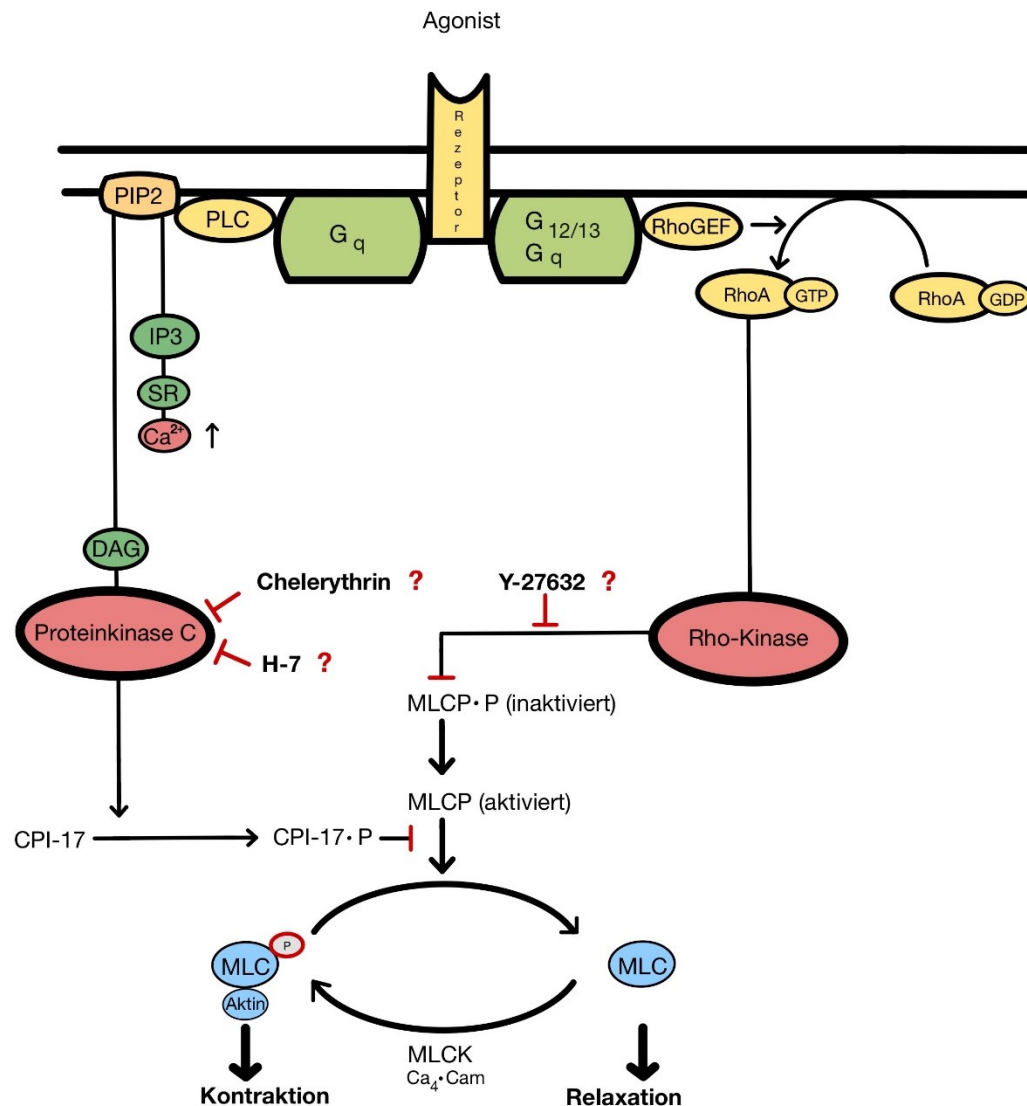


ABB. 4 SCHEMA DER ZWEI WESENTLICHEN SIGNALWEGE ZUR Ca²⁺-SENSITIVIERUNG IN DER GLATTEN MUSKULATUR. Die Ca²⁺-Sensitivierung wird durch zwei konvergierende Signalwege gesteuert: Agonisten binden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und aktivieren G_q und G_{12/13}-Proteine. Die aktivierte PLC spaltet PIP₂ zu IP₃ und DAG. IP₃ führt zum Ca²⁺-Anstieg. DAG und Ca²⁺ aktivieren die PKC, die CPI-17 phosphoryliert und MLCP hemmt. Die Aktivierung von RhoGEF führt zur Stimulation der RhoA-GTPase. Der RhoA-GTP-Komplex aktiviert die ROCK, wodurch die MLCP gehemmt wird.

Des Weiteren kann die ROCK unter anderem durch Arachidonsäure aktiviert werden und somit eine Tonus-Zunahme erzeugen (Somlyo und Somlyo 2003). Außerdem haben Experimente gezeigt, dass Arachidonsäure zur Inhibition von MLCP führt, indem die katalytische von der regulatorischen Untereinheit der MLCP abdissoziiert (Xiao et al. 2005). Der zweite Mechanismus führt beispielsweise durch die Bindung des Neurotransmitters Acetylcholin an

den M_3 -Rezeptor, zur Aktivierung des PLC-PKC-Signalwegs (Tanahashi et al. 2021). Durch die G_q aktivierte PLC (Somlyo und Somlyo 2003; Borysova et al. 2011) erfolgt die Spaltung von PIP_2 in DAG und IP_3 . DAG aktiviert zusammen mit freigesetztem Ca^{2+} die PKC (Tanahashi et al. 2021). Die PKC phosphoryliert das Inhibitorprotein CPI-17, wodurch die MLCP gehemmt wird (Kitazawa et al. 2003). Demnach korreliert eine Steigerung der Phosphorylierung der regulatorischen leichten Ketten mit einer Tonuszunahme der glatten Muskulatur. Dieser, von ROCK unabhängige Mechanismus, nimmt jedoch nur eine untergeordnete Rolle im G-Protein gekoppelten Ablauf der Ca^{2+} -Sensitivierung ein (Somlyo und Somlyo 2000).

1.5.2.3 ROCK UND PKC IN DER GLATTEN MUSKULATUR

Die ROCK und PKC sind zentrale Signalproteine, die über komplexe Signalwege die Aktivität der glatten Muskulatur beeinflussen (s. *Kapitel 1.5.2.2*). Aufgrund dessen wird eine besondere Bedeutung dieser Proteine für die Regulation der Motilität im unteren Gastrointestinaltrakt vermutet. Inwiefern der PKC- als auch ROCK-Signalweg die Ca^{2+} -Sensibilisierung im unteren Gastrointestinaltrakt vermitteln, wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Inhibitoren gezielt an drei Darmsegmenten, die sich in ihrer Lokalisation differenzieren, untersucht.

Die PKC ist eine Serin/Threonin Kinase (Bynagari-Settipalli et al. 2010) und wird basierend auf ihrer Abhängigkeit von Ca^{2+} und anderen Faktoren in drei Hauptgruppen eingeteilt: konventionelle PKC (cPKC), nicht-konventionelle PKC (nPKC) sowie der atypischen PKC (aPKC). Die cPKC-Isozyme ($PKC\alpha$, βI , βII und γ) sind Ca^{2+} -abhängig, wobei in der glatten Muskulatur ausschließlich $PKC\alpha$ und $PKC\beta$ exprimiert werden. Zur nPKC-Familie gehören die Ca^{2+} -unabhängigen Isozyme $PKC\delta$, ϵ , ζ und η , wobei in der glatten Muskulatur ausschließlich $PKC\epsilon$ vorkommt (Ohno et al. 1991; Andrea und Walsh 1992; Liu und Heckman 1998). Die Studie von Ali und Sarna (2002) bestätigte außerdem, dass die ACh-induzierte Kontraktion durch $PKC\alpha$, $PKC\beta$ und $PKC\epsilon$ in der glatten Muskulatur des Dickdarms vermittelt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die Blockade der PKC mit Hilfe eines unspezifischen (H-7) (Clarke und Dodson 2007) und eines hochspezifischen Inhibitors (Chelerythrin) (Herbert et al. 1990) durchgeführt.

Auch bei der ROCK handelt es sich um eine Serin/Threonin Kinase (Amano et al. 2010). Diese verfügt über zwei Isoformen: ROCK I und ROCK II, wobei die ROCK II-Expression in Muskel- sowie Hirngewebe besonders ausgeprägt ist, was auf eine besondere Bedeutung des Proteins in diesen Geweben hinweist (Riento und Ridley 2003). Mit Hilfe des ROCK-Inhibitors Y-27632 wurde in den vorliegenden Experimenten die Blockade der ROCK ausgelöst, wobei dieser in der Lage ist, beide Isoformen zu inhibieren (Narumiya et al. 2000; Wei et al. 2016).

1.6 FRAGESTELLUNG UND METHODISCHER ANSATZ

Die Motilität des unteren Gastrointestinaltraktes erzeugt durch die phasisch-rhythmische Kontraktion eine gesteuerte Peristaltik zur Durchmischung und Beförderung des Darminhalts von oral nach aboral. Daraus ergibt sich eine besondere Bedeutung der Forschung über die Darmmotilität, um die genauen Signalwege in unterschiedlichen Darmabschnitten zur Auslösung der Peristaltik zu verstehen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der gastrointestinalen Motilität, mit besonderem Augenmerk auf die PKC und ROCK, welchen Einfluss auf die Kontraktion der glatten Muskulatur nehmen. Dabei sollen, mittels unterschiedlicher Inhibitoren, gezielt entweder die PKC oder ROCK inhibiert und damit die Verringerung der durch Carbachol induzierten Kontraktionskraft gemessen und analysiert werden. Die Unterschiede der Kontraktionsmechanismen in einzelnen Darmabschnitten sind in der Literatur eher allgemein beschrieben, wodurch sich die Frage ergibt, ob Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen einzelnen Darmabschnitten des unteren Gastrointestinaltrakts vorliegen.

Daraus ergeben sich folgende konkrete Fragestellungen:

1. Welche Rolle spielen die Enzyme PKC und ROCK bei der Carbachol induzierten Kontraktion?
2. Welche Unterschiede bestehen in der PKC und ROCK sensitiven Beeinflussung der Carbachol induzierten Kontraktion im Duodenum, distalen Ileum und proximalen Colon?

II. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 GERÄTE

TAB. 1 ÜBERSICHT GERÄTE

Gerät	Hersteller
Analysenwaage MC1	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Bench	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Guillotine small animal decapitator	WPI, Sarasota, Florida
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer RH Basic 2	IKA, Staufen, Deutschland
Osmomat 3000	Gonotec, Berlin, Deutschland
Panlab Messwandler MLT0201	ADInstruments, Oxford, Großbritannien
Panlab Organ Bath System	ADInstruments, Oxford, Großbritannien
Panlab Thermostat LE 13206	ADInstruments, Oxford, Großbritannien
PH-Meter CG 840	Schott, Mainz, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Powerlab 8/30	ADInstruments, Oxford, Großbritannien
Purelab Flex	ELGA, Celle, Deutschland
Quad Bridge Amp	ADInstruments, Oxford, Großbritannien
Vibrationsschüttler	neoLab, Heidelberg, Deutschland

2.1.2 CHEMIKALIEN, PHARMAKA

TAB. 2 ÜBERSICHT CHEMIKALIEN, PHARMAKA

Substanz	Hersteller
Akasolv water bath protection	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Aqua dest.	ELGA, Celle, Deutschland
Calciumchlorid Dihydrat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze, Deutschland
Carbamoylcholin chlorid	Tocris, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Chelerythrin chlorid	Tocris, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
D-(+)-Glucose – wasserfrei	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze, Deutschland
Diethylether	J.T. Baker, Deventer, Niederlande

Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
H-7 dihydrochlorid	Tocris, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
HEPES	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze, Deutschland
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze, Deutschland
Magnesiumsulfat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze, Deutschland
Natriumbicarbonat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze, Deutschland
Natriumpyruvat	Fluka, Buchs, Schweiz
Y-27632 dihydrochlorid	Tocris, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

2.1.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN

TAB. 3 ÜBERSICHT VERBRAUCHSMATERIALIEN

Material	Hersteller
Dermafil Polyester 3 2/0 Nahtmaterial	SMI, St. Vith, Belgien
Einmal-Küvetten	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Falcon Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Labor-Schutzhandschuhe	Kimberly Clark, Koblenz, Deutschland
Lagerbox	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

2.1.4 SOFTWARE

TAB. 4 ÜBERSICHT SOFTWARE

Software	Hersteller
Citavi 6.0	Lumivero, Denver, USA
CorelDRAW Graphics Suite 2024	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
Good Notes 6	Goodnotes Limited, London, Großbritannien
LabChart 7	ADInstruments, Dunedin, Neuseeland
Office 365	Microsoft Corporation, Redmond, USA
SigmaPlot 13.0	Systat Software Inc., San José, USA

2.1.5 VERSUCHSTIERE

Die Experimente wurden am tierischen Gewebe durchgeführt, welches von unbehandelten, gesunden männlichen und weiblichen Wistar Ratten stammt.

2.1.6 SONSTIGES

TAB. 5 ÜBERSICHT SONSTIGE MATERIALIEN

Material	Hersteller
Bechergläser	Rasotherm
Chirurgische Schere	Geuder, Heidelberg, Deutschland
Griffinbecher	vitalab, Grossostheim, Deutschland
Pinzette	Geuder, Heidelberg, Deutschland
Präparathaken	ADInstruments, Oxford, Großbritannien
Präparathalterung	ADInstruments, Oxford, Großbritannien
Präparierschale	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Schlauchsystem	ADInstruments, Oxford, Großbritannien
Weithalskanister mit Ablasshahn	Hünersdorf GmbH, Ludwigsburg, Deutschland

2.2 METHODEN

2.2.1 HERSTELLUNG UND ZUSAMMENSETZUNG DER LÖSUNGEN

Für die Durchführung der Versuche waren sowohl eine Organbadlösung als auch eine Präparierlösung erforderlich.

2.2.1.1 ORGANBADLÖSUNG

In Vorbereitung auf die Experimente wurden 5 Liter destilliertes Wasser aus einer Reinstwasseranlage in einen Griffinbecher abgefüllt. Anschließend wurde ein Rührmagnet in den Griffinbecher gelegt und auf einem Magnetrührer platziert, um eine homogene Durchmischung der Lösung zu gewährleisten. Im nächsten Schritt wurden die in *Tab. 6* dargestellten Chemikalien sorgfältig abgewogen und nacheinander in den Griffinbecher hinzugegeben. Diese Chemikalien dienten dazu, die gewünschte Zielkonzentration in der Organbadlösung zu erreichen. Anschließend wurde die so vorbereitete Lösung mit Carbogen begast, um sie mit dem nötigen Gasgemisch zu sättigen, was für die Aufrechterhaltung der

physiologischen Bedingungen in der Organbadlösung notwendig ist. Nachdem sich alle Substanzen vollständig aufgelöst hatten, wurden sowohl die Osmolarität als auch der pH-Wert der Lösung gemessen. Diese Messungen ergaben Werte, die auf 0,290 bis 0,300 osmol/kg für die Osmolarität und 7,37 bis 7,4 für den pH-Wert eingestellt wurden, um optimale Bedingungen für die Versuche zu gewährleisten. Nach der Einstellung und Überprüfung der genannten Parameter wurden das pH-Wert-Messgerät sowie der Rührmagnet aus der Lösung entfernt. Damit war die Organbadlösung fertiggestellt und einsatzbereit für die geplanten Experimente.

TAB. 6 CHEMIKALIEN ZUR ANFERTIGUNG DER ORGANBADLÖSUNG

Chemikalie	Zielkonzentration (in mmol/L)
Calciumchlorid Dihydrat	2,5
D-(+)-Glucose – wasserfrei	5,5
Ethylendiamintetraessigsäure	0,5
Kaliumchlorid	4,7
Magnesiumchlorid	1,2
Natriumbicarbonat	30,0
Natriumchlorid	120,0
Natriumpyruvat	2,0

2.2.1.2 PRÄPARIERLÖSUNG

Die Präparierlösung, die für die Präparation der Wistar-Ratte benötigt wird, wurde von den technischen Mitarbeitern des Instituts sorgfältig hergestellt. Im Anschluss erfolgte die Lagerung der Lösung bei einer Temperatur von 4°C im Kühlschrank.

TAB. 7 CHEMIKALIEN ZUR ANFERTIGUNG DER PRÄPARIERLÖSUNG

Chemikalie	Zielkonzentration (in mmol/L)
Calcium Dihydrat	0,1
Ethylendiamintetraessigsäure	0,025
HEPES	5,0
Kaliumchlorid	4,5
Magnesiumsulfat	1,0
Natriumchlorid	145,0
Natriumhydrogenphosphat	1,2

2.2.2 ORGANBAD

Das Organbad ist eine in-vitro-Methode, die zur direkten Messung der Kontraktionskräfte von Muskelgewebe verwendet wird. In die Organbadkammern, welche mit einer Pufferlösung befüllt sind und somit ein physiologisches Milieu darstellen, werden medizinische Prüfsubstanzen hinzugegeben, wodurch Effekte dieser Substanzen auf das Muskelgewebe direkt ermittelt werden können. Im Rahmen der Experimente dieser Arbeit wurde mittels des Organbads die Wirkung unterschiedlicher Carbachol-Konzentrationen sowie der Inhibitoren Chelerythrin, Y-27632 und H-7 auf die glatte Muskulatur der Darmabschnitte Duodenum, Ileum und Colon gemessen. Diese Methode ermöglicht es, die Reaktionen des Muskelgewebes präzise zu beobachten und zu quantifizieren.

2.2.2.1 PRÄPARATION DER WISTAR-RATTE

Die Dekapitation gesunder weiblicher und männlicher Wistar-Ratten, im Alter von 31 bis 312 Tagen, erfolgte durch technische Mitarbeiter des Instituts. Dabei hielten sie das Tierschutzgesetz gemäß § 4 strikt ein. Das Versuchstier wurde zunächst mit Diethylether narkotisiert und anschließend mit einer Guillotine dekapitiert.

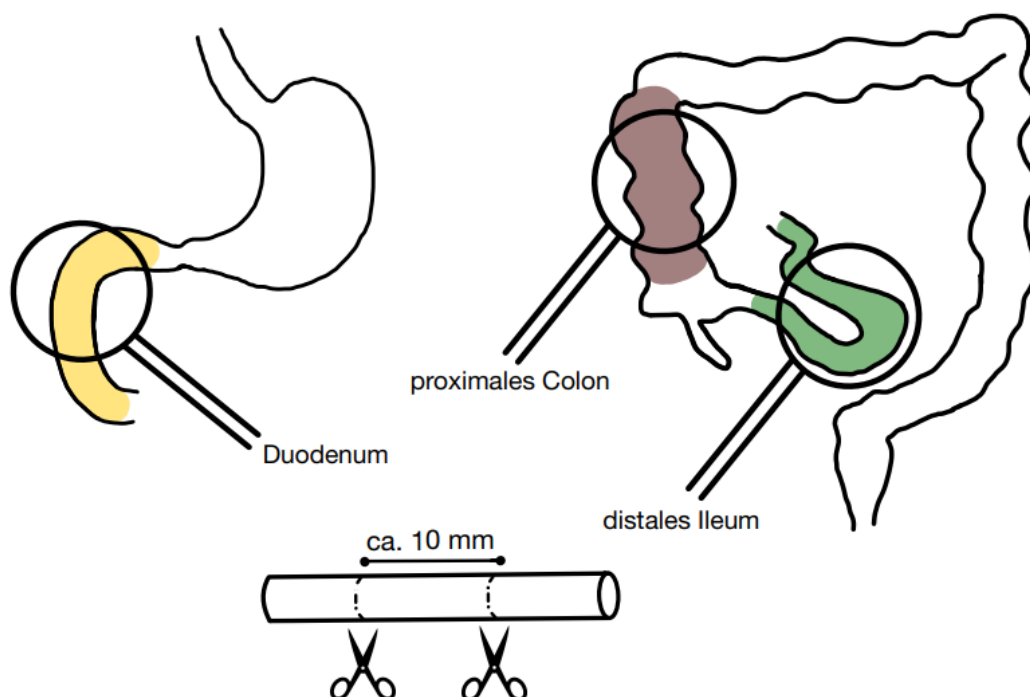


ABB. 5 LOKALISATION DER ENTNAHMESTELLEN DER ZU UNTERSUCHENDEN DARMSEGMENTE (Färbung der Darmsegmente: Gelb = Duodenum; Grün = distales Ileum; Braun = proximales Colon)

Das Abdomen der Wistar-Ratte wurde mit Hilfe von chirurgischen Instrumenten eröffnet und das Duodenum (beginnend ab dem Magen), das distale Ileum (bis zum Appendix) sowie das proximale Colon (beginnend ab dem Appendix) entnommen (siehe *Abb. 5*). Diese drei Darmabschnitte wurden in ein Becherglas überführt, welches mit einer gekühlten Präparierlösung (4°C) gefüllt war, um die physiologischen Eigenschaften des Gewebes aufrechtzuerhalten. Anschließend wurde das zu untersuchende Gewebe in eine mit Silikon beschichtete Petrischale, ebenfalls mit gekühlter Präparierlösung befüllt, gegeben und mit Kanülen vertikal an den oberen und unteren Enden des Präparats aufgespannt. Im weiteren Verlauf wurde das Gewebe von Fett- und Bindegewebe frei präpariert und der Darminhalt vorsichtig entfernt. Anschließend wurden ca. 1 cm große Segmente der Längsmuskulatur aus den jeweiligen Darmabschnitten zugeschnitten und für die Fixierung im Organbad vorbereitet.

2.2.2.2 AUFBAU ORGANBAD

Die Experimente an der glatten Muskulatur führte die Autorin dieser Arbeit im Organbad durch, wobei die differenzierten Wirkungen der zu untersuchenden Substanzen gemessen wurden. Das Organbad besteht aus vier Organbadkammern, welche von destilliertem Wasser und darin enthaltenem Schimmelschutzmittel umgeben sind. Diese Organbadkammern sind mit einer Pufferlösung gefüllt und werden mit Carbogen, einem Gasgemisch aus 95 % O₂ und 5 % CO₂, begast. Die darin fixierten Darmsegmente werden auf diese Weise mit Sauerstoff versorgt und der PH-Wert von 7,4 in der Lösung gehalten. Jede Kammer hat ein Fassungsvermögen von 25 ml und kann mittels eines Ventilschalters befüllt und entleert werden. Auf diese Weise kann die bereits genutzte Kammerlösung abgelassen und frische Lösung aus einem Vorratsbehälter nachgefüllt werden. Die Pufferlösung befindet sich in einem extern gelagerten Behälter und wird durch ein Schlauchsystems in die Organbadkammern befördert und über Einlassventile reguliert. Ein zweiter extern gelagerter Behälter fängt die abgelassene Pufferlösung zur Entsorgung auf. Das Organbad wird konstant auf 37°C beheizt, wobei ein Thermostat zur Temperaturregelung verwendet wird.

Jedes Darmsegment wurde mit einem dünnen Nylonfaden an beiden Enden mit einem Doppelknoten und einer Schlaufe verschlossen. Die untere Schlaufe wurde über den Fixierhaken in die Präparathalterung eingespannt, während die obere Schlaufe am Ende des Fadens in den mechanoelektrischen Messwandler eingehängt wurde. Dieser Messwandler misst die isometrische Kraftänderung und setzt sie in elektrische Spannungen um. Die Präparate wurden durch einen Manipulator mit einer Manipulatorschraube geringfügig über die in-situ-Länge hinaus vorgespannt. Die durch Kontraktion und Relaxation verursachten Spannungsänderungen wurden durch einen Quad Bridge Amplifier verstärkt.

Spannungsänderungen in Millivolt (mV) wurden anhand von Eichgeraden in Millinewton (mN) umgewandelt. Ein damit verbundener Laptop zeichnet die Spannungsänderungen mittels der Software LabChart 7 auf und stellte diese in mN dar.

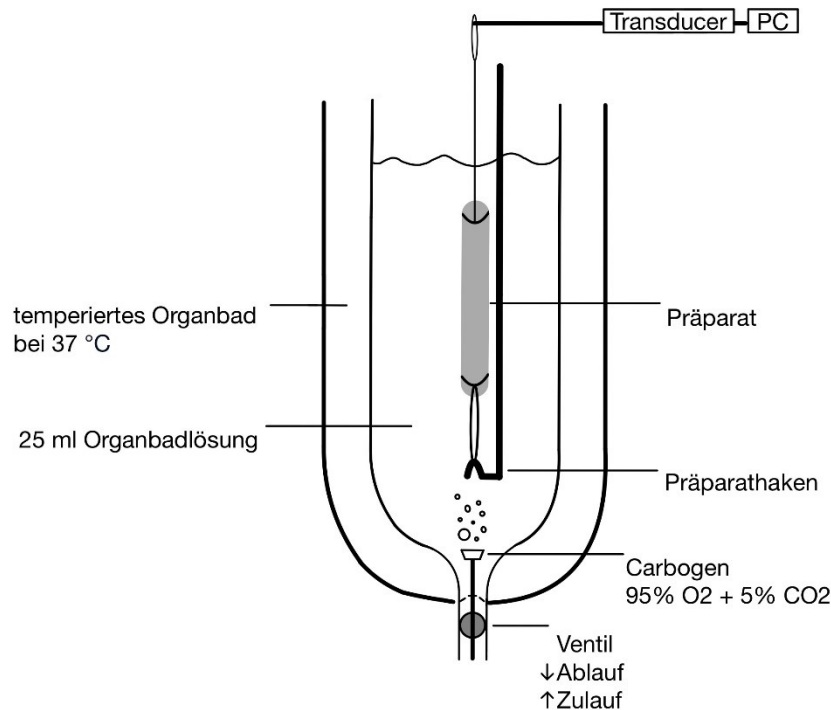


ABB. 6 SCHEMATISCHER AUFBAU EINER ORGANBADKAMMER

2.2.2.3 ABLAUF

Zuerst erfolgte die Kalibrierung des mechanoelektrischen Messwandlers (Transducer) mit einem Gewicht von 1,79 g, um gleiche Voraussetzungen in allen vier Messkammern herzustellen. Anschließend wurden die Präparate in den Organbadkammern fixiert und mit 25 ml Organbadlösung bedeckt, um ein physiologisches extrazelluläres Milieu herzustellen.

Nach dem Einhängen der Organe erfolgte die ersten 5 min keine Manipulation der Vorspannung, um eine spontane Muskelaktivität abzuwarten. Während der 40-minütigen Adaptionsphase wurden die Muskelpräparate, falls notwendig, nachgespannt, um eine optimale Aktivierbarkeit des Muskels zu erzielen. Die Vorspannung betrug dabei 3 bis 4 mN. In dieser Zeit wurden die Organbadkammern alle 10 min gespült und mit frischer Pufferlösung befüllt. Im Anschluss daran konnte eine konstante Baseline mit gleichbleibendem Ruhetonus der jeweiligen Muskelsegmente des Darms nach 20 min erreicht werden. Währenddessen erfolgte keine manuelle Veränderung der Vorspannung mehr.

Zu Beginn jedes pharmakologischen Experiments wurde 1 ml KCL mit einer Konzentration von 1,5 mol/L hinzugefügt, um die Funktionsfähigkeit der Darmsegmente zu überprüfen. Die Endkonzentration von KCL betrug somit 60 mmol/L in der Organbadkammer mit einem Volumen von 25 ml. Nach einer Einwirkzeit von 10 min und einer kräftigen Kontraktion der Darmsegmente konnten diese für die nachfolgenden Schritte des Experiments verwendet werden. Zeigten die Segmente keine ausreichende Kontraktion, wurden sie entsorgt.

Die KCL-Antwort der Darmsegmente wurde später in der Auswertung als Normierungsgröße verwendet, um mögliche Längenunterschiede der Segmente auszugleichen. Um das Kaliumchlorid zu entfernen und einen konstanten Ruhetonus wiederherzustellen, wurde die Pufferlösung dreimal im Abstand von jeweils 5 min gegen frische, neue Lösung ausgetauscht. Nach insgesamt 15 min wurde ein konstanter Ruhetonus erneut eingestellt.

2.2.2.4 MESSABLAUF DER CARBACHOL DOSISTITRATIONSKURVE

Nach der Vitalitätskontrolle durch KCL wie im *Abschnitt 2.2.2.3* beschrieben, erfolgte die permutierende Gabe von fünf unterschiedlichen Carbachol-Konzentrationen. Nacheinander wurden jeweils 100 µl der Carbachol-Lösung mit unterschiedlichen Konzentrationen in die Organbadkammer gegeben. Dies führte zu unterschiedlich stark ausgeprägten maximalen Kontraktionen, da es sich bei Carbachol um ein Parasympathomimetikum handelt, welches an die muscarinergen ACh-Rezeptoren bindet. Jede Konzentration wirkte jeweils 10 min ein und wurde anschließend dreimal im Abstand von 5 min ausgewaschen.

TAB. 8 VERWENDETE CHEMIKALIEN UND AUFLISTUNG DER KONZENTRATIONEN MIT RESULTIERENDEN KONZENTRATIONEN IM ORGANBAD

Konzentration der Stammlösung	Zugegebene Menge	Konzentration im Organbad
Carbachol		
0,0025 mmol/L	100 µl	0,01 µmol/L
0,025 mmol/L	100 µl	0,1 µmol/L
0,25 mmol/L	100 µl	1 µmol/L
2,5 mmol/L	100 µl	10 µmol/L
25 mmol/L	100 µl	100 µmol/L
Chelerythrin		
2,5 mmol/L	100 µl	10 µmol/L

H-7		
1,25 mmol/L	50 µl	5 µmol/L
Kaliumchlorid		
1,5 mol/L	1000 µl	60 mmol/L
Y 27632		
1,25 mmol/L	50 µl	5 µmol/L

Der Ruhetonus wurde nach 15 min wieder erreicht. Dadurch ergaben sich 5 unterschiedliche Endkonzentrationen im Organbad: 0,01 mmol/L, 0,1 mmol/L, 1 mmol/L, 10 mmol/L und 100 mmol/L. Am Ende jedes Experiments erfolgte eine erneute Gabe von KCL. Die jeweils zugegebenen Konzentrationen der Stammlösung und deren daraus resultierenden Endkonzentrationen im Organbad können der *Tab. 8* entnommen werden. Da teilweise zwei Organbäder zur Verfügung standen, konnten bis zu acht Organbadkammern bestückt werden.

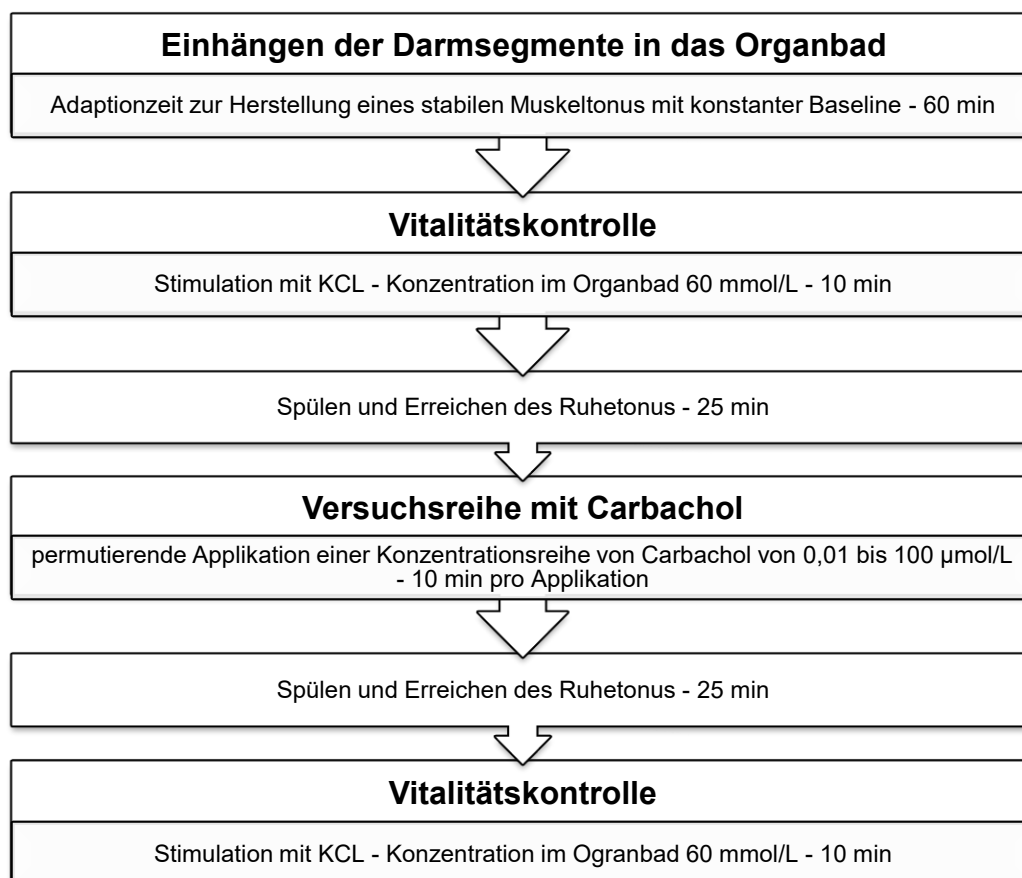


ABB. 7 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VERSUCHSABLAUFS DER CARBACHOL DOSISTITRATIONSKURVE

2.2.2.5 MESSABLAUF DER CARBACHOL INDUZIERTEN KONTRAKTION UND REDUKTION DURCH PKC- UND ROCK-INHIBITOREN

Im Anschluss an die zuvor beschriebenen Vorgänge (*Kapitel 2.2.2.3*), erfolgte die Applikation von Carbachol mit einer Endkonzentration von 0,1 mmol/L. Nach 10-minütiger Wirkung wurde die Organbadkammer im Abstand von 5 Minuten ausgewaschen und der Ruhetonus nach 15 min erreicht. Nun folgte die Gabe des Rho-Kinase-Inhibitors (Y-27632) oder einer der beiden PKC-Inhibitoren (Chelerythrin, H-7), welche die Hauptrolle in der nachfolgenden Arbeit darstellen.

Y- 27632 ist ein spezifischer Inhibitor der Rho-assoziierten Proteinkinasen und kann zu einer messbaren Verringerung der Kontraktionskraft führen (Ishizaki et al. 2000). Chelerythrin und H-7 sind in der Lage den Signaltransduktionsablauf über die Proteinkinase C (PKC) (Herbert et al. 1990) zu hemmen und können somit ebenfalls zu einer verminderten Kontraktionskraft beitragen.

Um die Wirkung der Inhibitoren zu ermitteln, erfolgte nach einer 10-minütigen Einwirkzeit die erneute Gabe von Carbachol in der Konzentration von 0,1 mmol/L. Diese Lösung verblieb für 10 min in den Organbadkammern und wurde daraufhin dreimal im Abstand von 5 min ausgewaschen. Nach einer Ruhezeit von 15 min erfolgte eine abschließende Carbachol-Gabe, um später vergleichende Messwerte vor und nach der Inhibitorgabe zu berücksichtigen. Auch diese Lösung wurde 3-mal gespült, 15 min zum Erreichen des Ruhetonus abgewartet und eine abschließende KCL-Gabe durchgeführt.

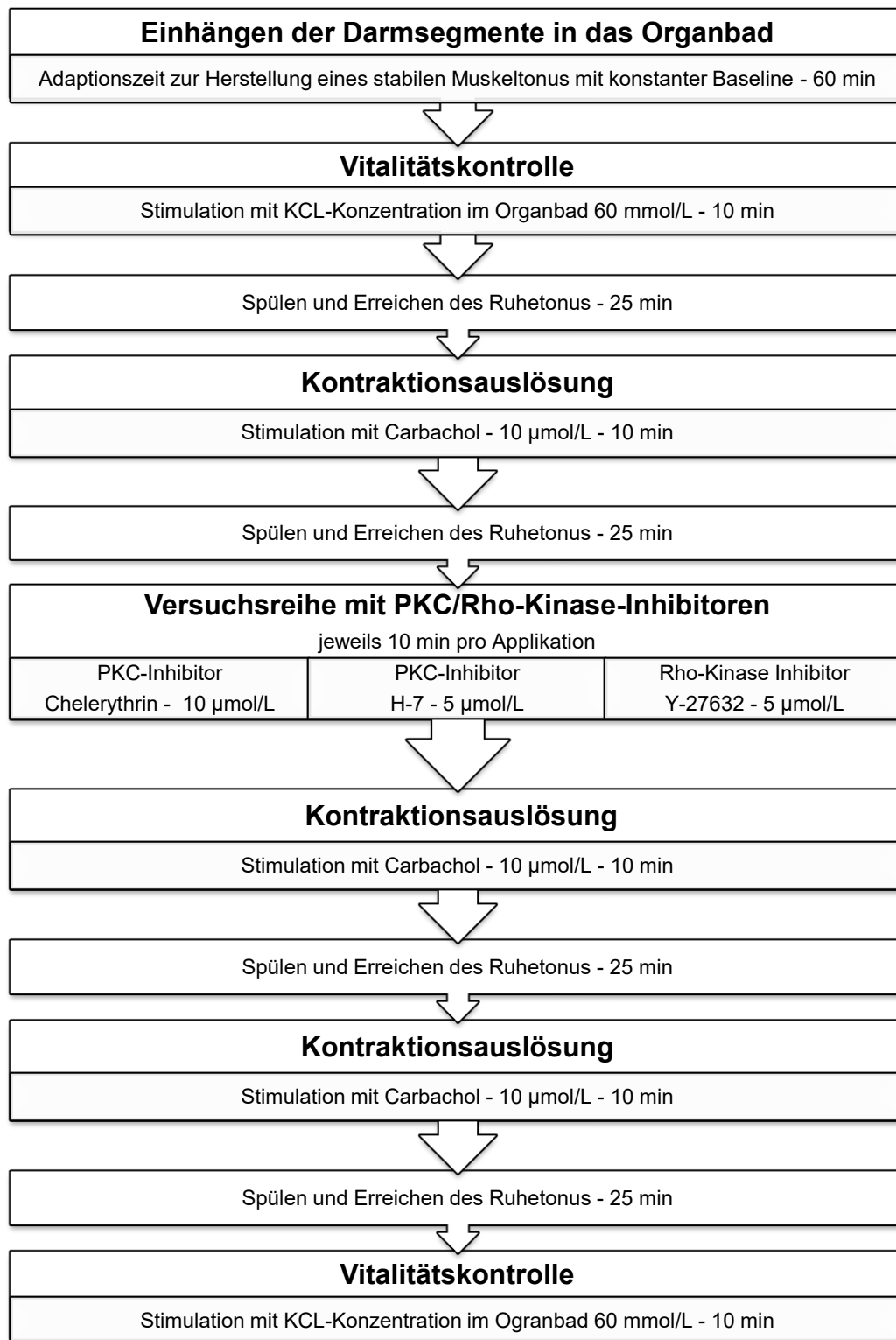


ABB. 8 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER CARBACHOL INDUZIERTEN KONTRAKTION UND REDUKTION DURCH PKC- UND ROCK-INHIBITOREN

2.2.3 AUSWERTUNG UND DARSTELLUNG DER MESSERGEBNISSE

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe von LabChart Reader 7 aufgezeichnet. Um diese Daten auswerten zu können, wurden zeitliche Abschnitte (ca. 1,5 min vor einer sowie bis zur nächsten Intervention) kopiert und in eine Exceldatei übertragen. Diese Exceldatei wurde vom Oscar Langendorff Institut für Physiologie der Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung gestellt. Die Datei ermöglichte es, die maximale oder minimale Kontraktionskraft aus dem gewählten Zeitabschnitt aus der LabChart-Aufzeichnung zu ermitteln. Für die durchgeführten Experimente war insbesondere die maximal erreichte Kraft relevant.

Im Vorexperiment wurde zur Ermittlung der Carbachol Dosistitrationskurve die maximale Kontraktionskraft nach Gabe der fünf unterschiedlichen Carbachol-Konzentrationen aufgelistet und anschließend der Mittelwert sowie der dazugehörige Standardfehler mittels Excel gebildet. Außerdem erfolgte die relative Bezugnahme der maximalen Kontraktionskraft auf die jeweils erste durch Kaliumchlorid verursachte Kontraktion, aus der ebenfalls arithmetische Mittelwerte sowie Standardfehler abgeleitet wurden. Kaliumchlorid diente dabei als Normierungsgröße der erhobenen Messdaten. Die Ergebnisse wurden anschließend mittels SigmaPlot als Liniendiagramm mit Datenpunkten und Fehlerbalken dargestellt.

Im Hauptexperiment wurde die absolute isometrische Kraft (in mN) durch Gabe von Kaliumchlorid und Carbachol zuerst am Anfang und dann am Ende des Experiments betrachtet sowie die durch Vorinkubation der ROCK- bzw. PKC-Inhibitoren reduzierte Kontraktionskraft des Carbachols ermittelt. Daraus resultierten somit insgesamt 5 Interventionsschritte (siehe *Tab. 9*), die es zu betrachten galt.

TAB. 9 ÜBERSICHT INTERVENTIONEN DES HAUPTEXPERIMENTES

Intervention Nr.	Bezeichnung	Beschreibung
Intervention 1	KCL _{pre}	Hinzugabe Kaliumchlorid am Anfang des Experimentes
Intervention 2	CCh	Hinzugabe Carbachol
Intervention 3	CCh + Inhibitor	Vorinkubation Inhibitor + Hinzugabe Carbachol
Intervention 4	CCh	Hinzugabe Carbachol
Intervention 5	KCL _{post}	Hinzugabe Kaliumchlorid am Ende des Experimentes

Innerhalb dieser Interventionen wurden, zur weiteren Betrachtung, die Mittelwerte aus den Maximalkräften gebildet. Der Standardfehler der Mittelwerte (SEM) wurde ebenfalls berechnet.

Für die deskriptive Darstellung der gemessenen Daten erfolgte die Berechnung vom arithmetischen Mittelwert, der Standardabweichung, dem Standardfehler des Mittelwertes sowie des Medians mit folgenden Formeln:

Arithmetisches Mittel
$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Standardabweichung
$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Standardfehler des Mittelwertes
$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Median (N = ungerade Anzahl)
$$x_{med} = x_{(\frac{n+1}{2})}$$

Median (N = gerade Anzahl)
$$x_{med} = \frac{x_{(\frac{n}{2})} + x_{(\frac{n}{2}+1)}}{2}$$

In einer weiteren Darstellung erfolgte außerdem die Betrachtung der relativen isometrischen Kraft (in %) in Bezug auf die Kaliumchlorid-Antwort vor und nach dem Experiment. Hierfür wurden zuerst drei Kaliumnormwerte gebildet, bei denen eine lineare Abnahme der Kontraktionskraft angenommen wurde. Die hierfür verwendeten Formeln lauten

$$K - \text{Normwert 1} = [F_{max}(\text{Anfang}) - F_{max}(\text{Ende})] \times (-0,25) + F_{max}(\text{Anfang})$$

$$K - \text{Normwert 2} = [F_{max}(\text{Anfang}) - F_{max}(\text{Ende})] \times (-0,50) + F_{max}(\text{Anfang})$$

$$K - \text{Normwert 3} = [F_{max}(\text{Anfang}) - F_{max}(\text{Ende})] \times (-0,75) + F_{max}(\text{Anfang})$$

Die Messergebnisse der Carbachol-Antwort der Interventionen 2, 3 und 4 wurden durch den vorab berechneten Kaliumnormwert dividiert. Eventuell abweichende Segmentlängen von 1 cm und daraus resultierende unterschiedliche Kontraktionskräfte sowie ein natürlicher abfallender Tonus der glatten Muskelpräparate konnten somit berücksichtigt werden.

Die Ergebnisse der jeweiligen Interventionsschritte wurden sowohl bei der relativen sowie absoluten Bezugnahme der maximalen Kontraktionskraft mit Hilfe von SigmaPlot 13.0 in Form von Boxplots dargestellt und mittels CorelDRAW Graphics suite 2024 weiterbearbeitet. Um die

Lesbarkeit der Arbeit zu unterstützen, wurden für die Darstellung der jeweiligen Darmsegmente stets dieselben Farben verwendet. Für das Duodenum wurde die Farbe Gelb, für das Ileum Grün und das Colon Braun gewählt.

Zusätzlich wurden die Mittelwerte ($\bar{x}$) $\pm$ Standardfehler (*SEM*) der Messwerte dieser Arbeit im Text beschrieben und interpretiert. Zur optischen Überprüfung der Signifikanzen wurden Punkte-Paar-Diagramme der Hauptexperimente im *Anhang* bereitgestellt.

2.2.4 STATISTIK

Bereits im Vorexperiment wurde die Carbachol-Gabe der insgesamt 5 unterschiedlichen Konzentrationen permutierend durchgeführt, um auszuschließen, dass eine vorherige Carbachol-Gabe einen Einfluss auf die Kontraktionskraft des jeweiligen Darmsegments haben könnte. Damit sollte sichergestellt werden unverfälschte Daten zu erhalten.

Die statistische Auswertung der experimentell gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe von SigmaPlot 13.0. Aufgrund der Zugabe von Carbachol in den Interventionen 2 und 4 (siehe *Tab. 8*, S. 22) lagen immer Vorher- und Nachher-Bedingungen vor. Somit handelte es sich bei dem Hauptexperiment dieser Arbeit um verbundene Stichproben, bei einer gleichbleibenden Stichprobenmenge (N).

Als erstes wurde auf das Vorliegen einer Normalverteilung getestet (Shapiro-Wilk-Test), insofern die Normalverteilung gegeben war, wurde der gepaarte T-Test angewandt. Für den Fall, dass keine Normalverteilung vorlag, wurde der Wilcoxon Test genutzt. Die Normalverteilung lag während des Experiments nur in einem einzigen Fall nicht vor. Das Signifikanzniveau der Ergebnisse wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

III. ERGEBNISSE

Die vorliegende Arbeit wurde mit einem Vorexperiment, der Dosiswirkungskurve von Carbachol, begonnen. Dieses diente dazu, sich mit dem Präparieren der drei Darmabschnitte des unteren Gastrointestinaltraktes vertraut zu machen, den Versuchsaufbau des Organbads zu beherrschen und eine geeignete Konzentration von Carbachol für die darauffolgenden Experimente mit den ausgewählten Inhibitoren zu ermitteln. Des Weiteren wurden Versuche mit einer wiederholten Carbachol-Gabe ohne Manipulation durch einen Inhibitor durchgeführt. Damit sollte die über den Versuchszeitraum natürliche Kraftabnahme der glatten Muskelsegmente nachgewiesen werden.

Schlussendlich erfolgte im Hauptexperiment eine Analyse der durch Carbachol induzierten und anschließend durch die PKC-Inhibitoren Chelerythrin, H-7 sowie dem ROCK-Inhibitor Y-27632 unterdrückten Kontraktion. Die Darmsegmente wurden mit Hilfe eines Präparathakens unmittelbar am Kraftwandler befestigt, wodurch keine objektive Verkürzungsmöglichkeit bestand. Bei der Stimulation mit medizinischen Prüfsubstanzen ist somit eine Kraftänderung ohne Längenänderung des glatten Muskels zu erwarten, welche als isometrische Kontraktion bezeichnet wird.

3.1 DOSISWIRKUNGSKURVE CARBACHOL

Im Vorexperiment der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des ACh-Agonisten Carbachol auf die glatte Muskulatur des Duodenums, des terminalen Ileums und des proximalen Colons untersucht. Dazu wurde eine Dosiswirkungskurve von Carbachol erstellt.

Nach dem Einhängen der jeweiligen Präparate, in die mit Organbadlösung befüllte und carbogenbegaste Organbadkammer, stellte sich bei einer gleichbleibenden Temperatur von 37°C ein Ruhetonus (Baseline) der glatten Muskulatur ein. Nach der Vitalitätskontrolle durch KCL und den anschließenden Spülvorgängen, erfolgte die permutierende Gabe unterschiedlicher Carbachol-Konzentrationen (siehe *Tab. 8*, S. 22). Abschließend wurde eine letzte Vitalitätskontrolle mittels KCL-Gabe durchgeführt. Der Versuchsablauf dauerte insgesamt ca. 4,5 h. Währenddessen stellte sich nach jeder eingeleiteten Auswaschphase der Ruhetonus wiederholt ein.

Nach dem Einbringen der Darmsegmente in das Organbad und Einpendeln des Ruhetonus konnten rhythmischen Spontankontraktionen im Duodenum ca. 30 bis 40, im Ileum ca. 20 bis 30 und im Colon ca. 3 bis 6 Kontraktionen pro Minute beobachtet werden. Die Darmsegmente

zeigten durchschnittliche Amplituden von bis zu 3 mN, wobei das Colon einen weniger geordneten Grundrhythmus mit teilweise geringeren Amplituden aufwies. Nach der Zugabe von 60 mmol/L KCL und 1; 10 und 100 $\mu\text{mol/L}$ Carbachol zeigte sich ein schnell einsetzender Anstieg des Tonus und eine überschießende tonische Kontraktion (siehe Abb. 9 (A)). Die maximal erreichte Kontraktionskraft reduzierte sich dosisabhängig. Im Anschluss konnte kein gleichmäßiger Grundtonus des jeweiligen Muskelsegments beobachtet werden. Dieser stellte sich erst nach mehrfachem Ausspülen von Carbachol, in einer Zeitspanne von 10 bis 15 min, wieder ein und zeigt vergleichbare Frequenzen wie zu Beginn des Experiments. Bei der Verwendung von 0,1 $\mu\text{mol/L}$ Carbachol stieg der Grundtonus lediglich auf ein mäßig höheres Niveau. Die Zugabe von 0,01 $\mu\text{mol/L}$ führte zu keiner auswertbaren Kraftänderung des Ruhetonus.

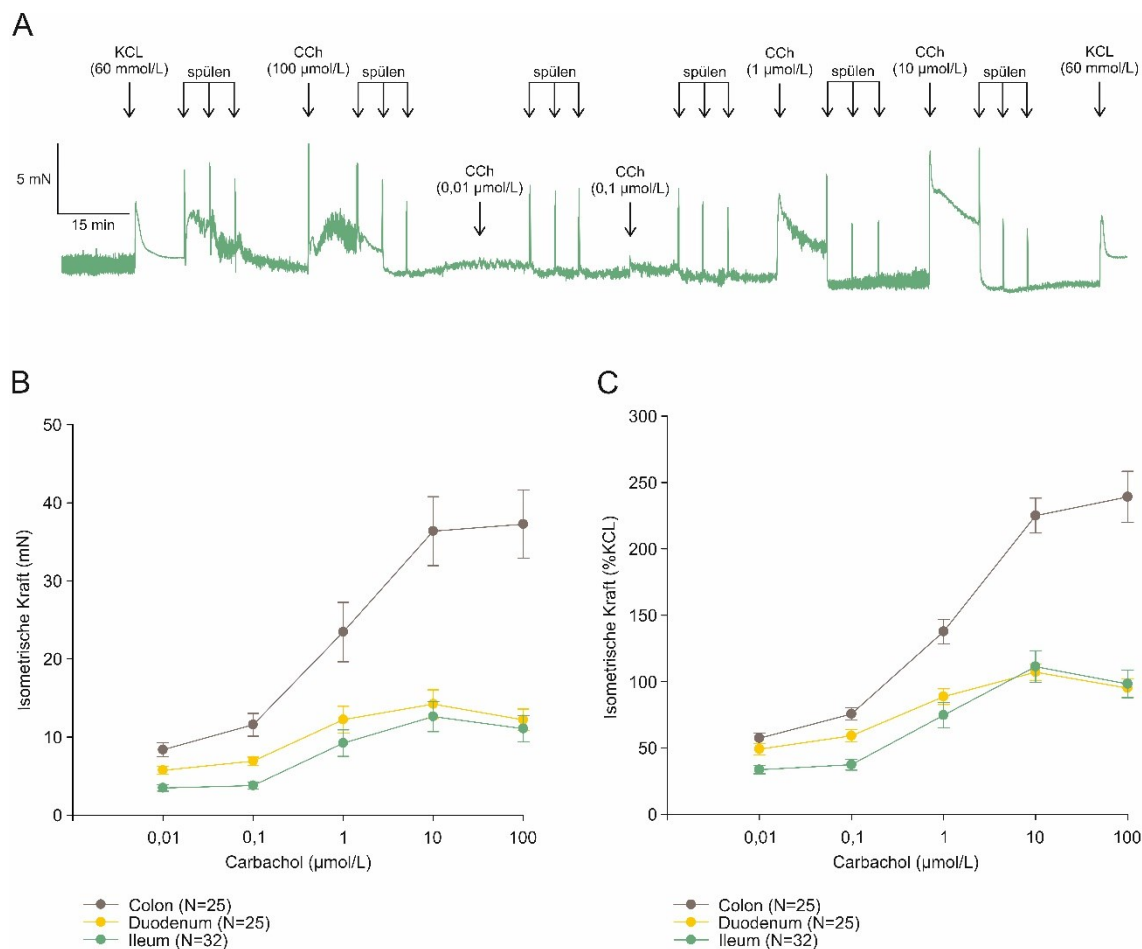


ABB. 9 WIRKUNG VON CARBACHOL IN UNTERSCHIEDLICHEN DOSEN (0,01 BIS 100 $\mu\text{MOL/L}$) AN DARMSEGMENTEN DER WISTAR-RATTE (A) Beispielspur einer Labchart-Aufzeichnung des zeitlichen Verlaufs einer durch Carbachol induzierten Kontraktion beim Ileum der Wistar-Ratte. Der graphische Verlauf beschreibt die positive bzw. negative Kraftänderung in mN des Tonus sowie der phasischen Kontraktionen in Form von Amplituden in mN. (B) Dosiswirkungskurve der absoluten Kontraktionskraft in mN (C) Dosiswirkungskurve der relativen Kontraktionskraft zum Kaliumnormwert in %.

Die Ergebnisse der an der Wistar-Ratte durchgeführten Versuchsreihen (Colon N=24; Duodenum N=25 und Ileum N=32) wurden in *Abb. 9 (B) und (C)* dargestellt:

Das Colon erreichte bei der Zugabe von Carbachol mit einer Konzentration von 0,01 $\mu\text{mol/L}$ seine minimale absolute Kontraktionskraft von $8,4 \pm 0,9$ mN bzw. einen relativen Wert von 57 ± 4 %. Die absolute maximale Kontraktionskraft ($37,3 \pm 4,4$ mN) wurde bei der Zugabe von 100 $\mu\text{mol/L}$ Carbachol erreicht. Relativ betrachtet konnten hier 239 ± 19 % bestimmt werden.

Bei den Untersuchungen des Duodenums sowie des Ileums konnten die niedrigsten Kräfte bei einer Zugabe von 0,01 $\mu\text{mol/L}$ Carbachol festgestellt werden. Das Duodenum erreichte hier absolut gemessen $5,7 \pm 0,5$ mN bzw. relativ betrachtet 49 ± 4 %. Beim Ileum konnten $3,5 \pm 0,4$ mN gemessen bzw. 34 ± 3 % ermittelt werden. Die maximalen Kräfte dieser beiden Segmente wurden bereits bei der Zugabe von 10 $\mu\text{mol/L}$ Carbachol gemessen. Hier wurden beim Duodenum $14,5 \pm 1,9$ mN bzw. 107 ± 6 % und beim Ileum $12,6 \pm 1,9$ mN und 111 ± 12 % dokumentiert. Die Messergebnisse der Colon-Versuchsreihe fielen hier eindeutig höher aus als bei den Versuchen mit den Segmenten des Duodenums und Ileums.

Insgesamt konnte bei allen drei Darmsegmenten ab einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/L}$ kein relevanter Kraftanstieg mehr beobachtet werden. Folglich wird davon ausgegangen, dass auch bei weiterer Erhöhung der Carbachol-Dosis keine weitere Kraftzunahme erzielt werden kann. Daraus ergibt sich in der Darstellung ein annähernd sigmoidaler Verlauf der Mittelwerte. Gleichzeitig verhalten sich die Ergebnisse der absoluten und der relativen Betrachtung annähernd identisch und weisen keinen qualitativen Unterschied auf.

Der Wendepunkt des sigmoidalen Verlaufs aller drei Graphen lässt sich bei einer Carbachol-Gabe von 1 $\mu\text{mol/L}$ ablesen. Somit kann bei der Carbachol-Konzentration von 1 $\mu\text{mol/L}$ von der halbmaximalen Wirkungsstärke (ED 50) ausgegangen werden. Mit Hilfe des Vorexperiments, des Dosis-Titrationsversuchs, konnte die Carbachol-Konzentration von 10 $\mu\text{mol/L}$, bei der eine maximale Kontraktionskraft der Darmsegmente zu erwarten ist, bestimmt werden. Diese wurde anschließend für die Hauptexperimente genutzt, um einen ausreichend großen Spielraum für die Wirkung der PKC- und ROCK-Inhibitoren zu erreichen.

3.2 REPETITION VON CARBACHOL

In dieser Versuchsreihe erfolgten drei aufeinanderfolgende Gaben von Carbachol ohne weitere Manipulation durch Inhibitoren. Wie bei jedem Experiment wurden die Präparate zu Beginn und zum Ende auf die Vitalität mittels KCL getestet. Der detaillierte Versuchsablauf kann der *Abb. 8 (S. 25)* entnommen werden. Hier gilt es jedoch zu beachten, dass anstelle

des Inhibitors eine Vehikellösung (destilliertes Wasser) verwendet wurde, um den vollständigen Versuchsablauf zu simulieren. Die Stichprobengröße (N) umfasste jeweils 8 Versuchsreihen. Mit diesen Zeitkontrollversuchen wurde, durch mehrfache Auslösung der maximalen Kontraktionskraft über den Experimentzeitraum von 4,5 h, die Segmentermüdung der glatten Muskulatur ermittelt. Zu den hierbei ermittelten Ergebnissen konnte im Hauptexperiment Bezug genommen und eine nachlassende Kontraktionskraft mit einbezogen werden. In den nachfolgenden Abbildungen wurden die erhobenen Daten als Boxplots dargestellt.

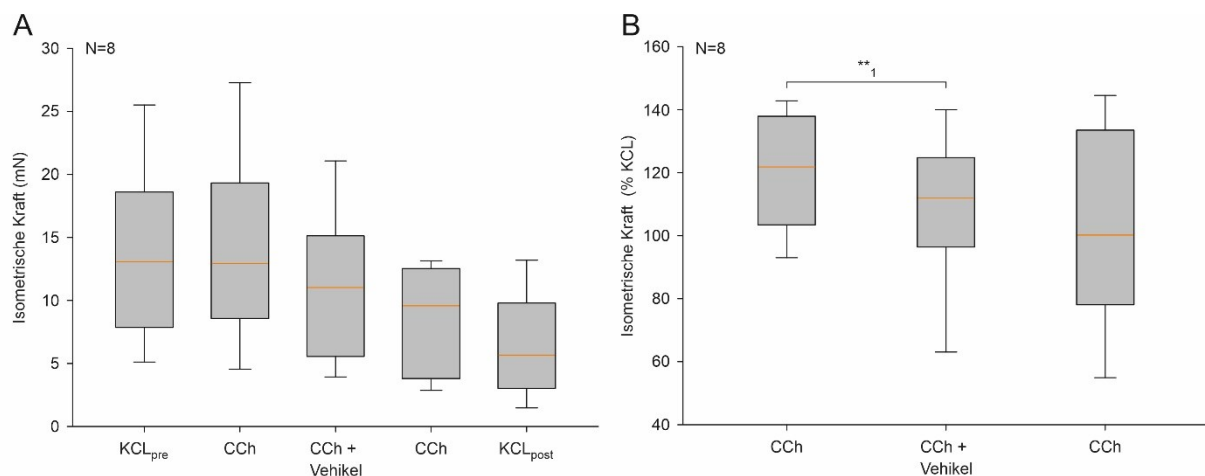


ABB. 10 KRAFTVERÄNDERUNG BEI WIEDERHOLTER ZUGABE VON CARBACHOL (10 μ MOL/L) AN DUODENUM-SEGMENTEN (A) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN (B) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %. (** $p < 0,01$; ₁ = gepaarter T-Test)

Im Verlauf des Experiments wurde bei den Duodenum-Segmenten ein stetiger Abfall der isometrischen Kräfte erkennbar. Mit der Gabe von KCL_{pre} konnte die Kontraktionskraft mit $13,6 \pm 2,4$ mN gemessen werden. Nachdem KCL_{post} in die Organbadkammer appliziert wurde, erreichte dieses Darmsegment nur noch $6,4 \pm 1,4$ mN in seiner maximalen Kontraktion. Auf die Applikation von Carbachol reagierte das Duodenum-Segment mit einer Kontraktionskraft von $14,3 \pm 2,6$ mN (120 ± 6 %). Nach drittmaliger Zugabe von Carbachol reduzierte sich die absolut gemessene Kontraktionskraft auf $8,4 \pm 1,5$ mN und die relativ ermittelte Bewertung auf 105 ± 11 %. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) in den relativen Messwerten bestand jedoch nur zwischen der ersten und zweiten Carbachol-Antwort.

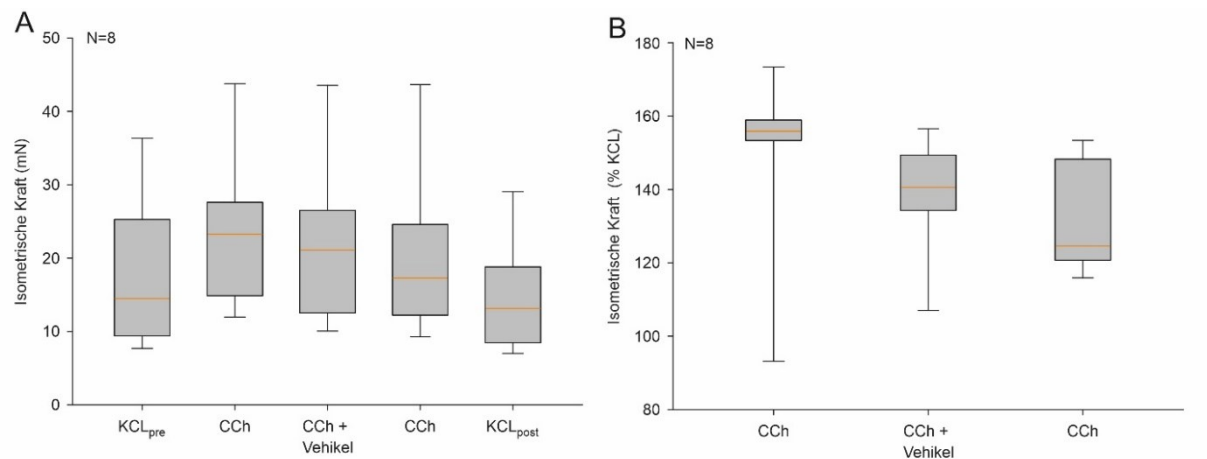


ABB. 11 KRAFTVERÄNDERUNG BEI WIEDERHOLTER ZUGABE VON CARBACHOL (10 µMOL/L) AN ILEUM-SEGMENTEN (A) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN (B) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %.

Der Verlauf der isometrischen Kräfte der Ileum-Segmente verhielten sich analog zu dem der Duodenum-Segmente. Es war ebenfalls eine Abnahme bei der Kraftreaktion nach der Gabe von KCL_{pre} ($17,3 \pm 3,5$ mN) und KCL_{post} ($14,5 \pm 2,6$ mN) festzustellen. Das Hinzugeben von Carbachol führte von der ersten relativen (150 ± 8 %) bis zur letzten relativen Antwort (134 ± 5 %) zu einer Kraftreduktion um $16\% \pm 3$ %. Statistisch konnte keine Signifikanz der relativen Messergebnisse nachgewiesen werden.

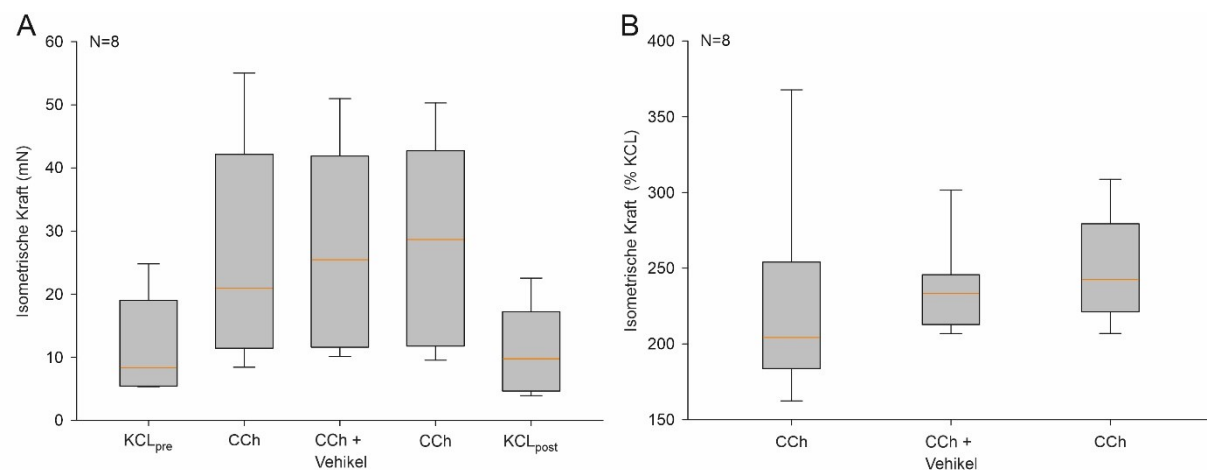


ABB. 12 KRAFTVERÄNDERUNG BEI WIEDERHOLTER ZUGABE VON CARBACHOL (10 µMOL/L) AN COLON-SEGMENTEN (A) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN (B) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %.

Die Colon-Segmente zeigten ebenfalls eine minimale Verringerung des Kraftpotentials von KCL_{pre} ($11,6 \pm 2,7$ mN) zu KCL_{post} ($11,0 \pm 2,4$ mN). Hingegen nahmen die Reaktionskräfte von der ersten relativen (225 ± 23 %) zu der letzten relativen Antwort (250 ± 13 %) nach

Carbachol-Gabe geringfügig zu. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der relativen Ergebnisse bestimmt werden.

3.3 PKC- UND ROCK-INHIBITOREN

Der Hauptteil der vorliegenden Arbeit untersucht die Rolle der PKC-Inhibitoren Chelerythrin und H-7 sowie des ROCK-Inhibitors Y-27632 bei der Reduktion der Carbachol induzierten Kontraktion. Die Messergebnisse wurden in Boxplots mit den bekannten Farben, zugehörig zum jeweiligen Darmabschnitt, dargestellt. Zusätzlich stellt der farblich markierte Boxplot die Intervention der jeweiligen Inhibitor-Zugabe dar.

3.3.1 VORVERSUCHE

Zu Beginn der Experimente fanden Vorversuche statt, um die Konzentrationen der Inhibitoren zu bestimmen. Diese Vorversuche zeigten, dass erst bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/L}$ Chelerythrin in der Organbadkammer eine messbare Reduktion der maximalen Kontraktionskraft erzielt werden konnte. Bei einer Intensität von 5 $\mu\text{mol/L}$ Chelerythrin konnte weder bei den Duodenum-, Ileum- oder Colon-Segmenten eine deutliche Wirkung ermittelt werden. Da die Vorversuche keinen Effekt gezeigt haben, entschied sich die Autorin der vorliegenden Arbeit die Versuchsreihe mit einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol/L}$ Chelerythrin zu beenden und fokussierte sich auf Versuche mit 10 $\mu\text{mol/L}$.

Die Konzentration des Inhibitors Y-27632 zeigte schon bei der Verwendung von 5 $\mu\text{mol/L}$ eine Inhibierung der maximalen Kontraktionskraft bei den Duodenum-, Ileum- und Colon-Segmenten. Auch bei der Verwendung von 5 $\mu\text{mol/L}$ H-7 konnte dieser Effekt an Segmenten von Duodenum und Ileum aufgezeichnet werden. Im Gegensatz dazu, zeigten die Vorversuche an den Colon-Präparaten keine Reaktion auf 5 $\mu\text{mol/L}$ des Inhibitors H-7. Allerdings konnte bei diesem Darmsegment unter der Verwendung von 10 $\mu\text{mol/L}$ H-7 eine deutliche Abnahme der Kraft festgestellt werden. Diese Versuchsreihe wurde dennoch beendet, um die Wirkung des Inhibitors H-7 mit den anderen Darmsegmenten zu vergleichen und somit gleiche Voraussetzungen zu schaffen.

Durch die zuvor beschriebenen Ergebnisse auf die unterschiedlichen Konzentrationen, wurde im anschließenden Experiment an den Duodenum-, Ileum- und Colon-Segmenten die folgenden Konzentrationen verwendet: 10 $\mu\text{mol/L}$ Chelerythrin, 5 $\mu\text{mol/L}$ H-7 und 5 $\mu\text{mol/L}$

Y-27632. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Darmsegmenten herzustellen, wurden einheitlich dieselben Konzentrationen verwendet.

3.3.2 VERSUCHSREIHE MIT CHELERYTHRIN

Die folgend dargestellten Daten ergaben sich aus den Versuchsreihen mit dem Inhibitor Chelerythrin. Dieser wurde zur Inhibierung des PKC-Wegs bei der Kontraktion der glatten Muskulatur angewandt. In diesem Experiment wurde an den Segmenten vom Duodenum, Ileum und Colon jeweils 10 $\mu\text{mol/L}$ Chelerythrin verwendet und die Reduktion der maximalen Kontraktionskraft, anhand der Carbachol-Antwort, ermittelt.

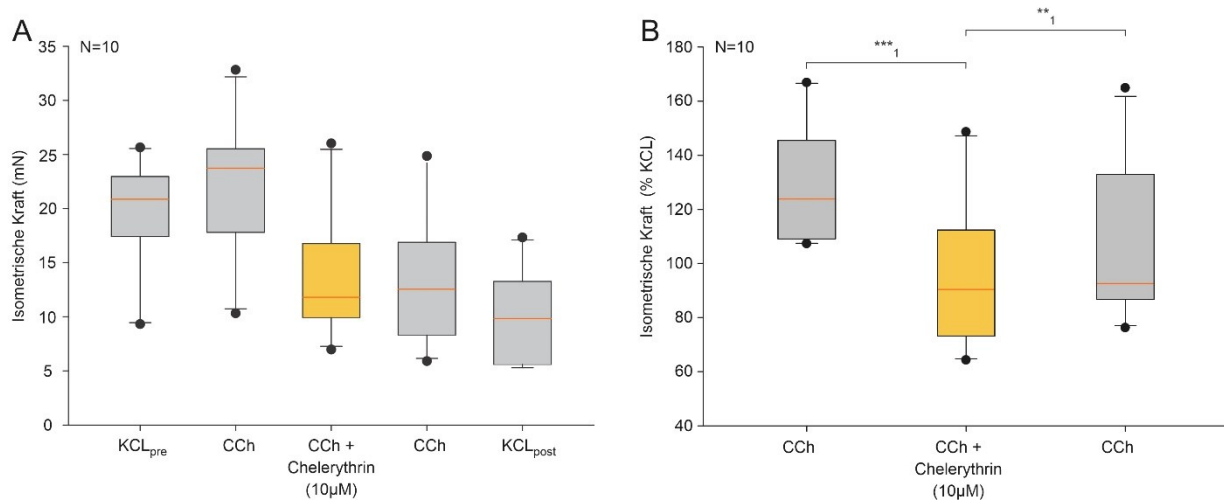


ABB. 13 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS CHELERYTHRIN (10 $\mu\text{mol/L}$) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 $\mu\text{mol/L}$) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN DUODENUM-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE. (A) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN, (B) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ₁ = gepaarter T-Test; Gelber Boxplot = Chelerythrin enthalten)

Die Versuchsreihe an den Duodenum-Segmenten ergab, dass die erste durch Carbachol induzierte Kontraktion mit $21,8 \pm 2,0$ mN bzw. 129 ± 7 % durch den Inhibitor Chelerythrin (10 $\mu\text{mol/L}$) auf $13,9 \pm 1,8$ mN bzw. 96 ± 9 % reduziert wurde. Nach dem anschließenden Spülvorgang blieb die Kontraktionskraft bei erneuter Zugabe von Carbachol bei $13,4 \pm 1,8$ mN bzw. 109 ± 9 %. Der Median weist eine ähnliche Tendenz auf wie die zuvor dargestellten Mittelwerte. Konkret beträgt der Median vor der Zugabe des Inhibitors 124 % und nach der Inhibitorzugabe 90 % und bestätigen die beobachtete Reduktion.

In Bezug zum Kalium-Normwert ließ sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) bei der isolierten Carbachol-Gabe im Vergleich zur Vorinkubation mit Chelerythrin (10 $\mu\text{mol/L}$) feststellen. Die letzte Zugabe von Carbachol führte zu einem signifikanten relativen Kraftanstieg ($p < 0,01$). Durch die Applikation von Chelerythrin (10 $\mu\text{mol/L}$) wurde demnach

eine deutliche Reduktion, sowohl in der absoluten Messung als auch in der relativen Betrachtung der Carbachol induzierten Kontraktion hervorgerufen.

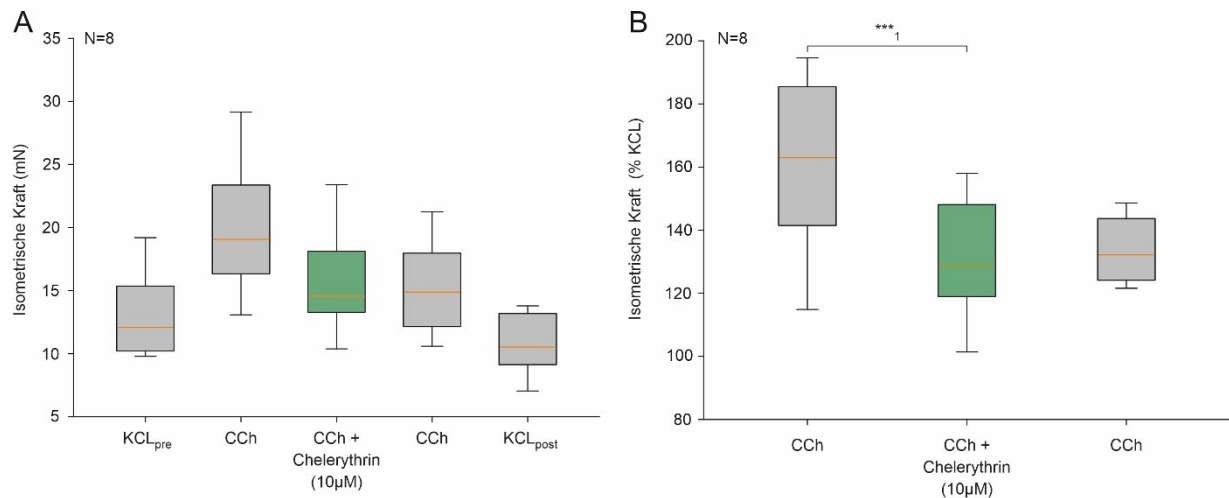


ABB. 14 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS CHELERYTHRIN (10 μMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 μMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AM ILEUM DER WISTAR-RATTE. (A) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN, (B) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %. (***) $p < 0,001$; 1 = gepaarter T-Test; grüner Boxplot = Chelerythrin enthalten)

Auch die Ergebnisse aus der Versuchsreihe mit insgesamt 8 Ileum-Segmenten zeigten nach Hinzugabe des PKC-Inhibitors Chelerythrin eine deutliche Reduktion der Kraft von $19,9 \pm 1,7$ mN auf $15,5 \pm 1,4$ mN. Die unterdrückte Carbachol-Antwort von $15,5 \pm 1,4$ mN blieb nach dem Auswaschen des Inhibitors annähernd gleich $15,2 \pm 1,2$ mN. In Relation zum Kalium-Normwert zeigten die Ergebnisse denselben Verlauf. Die relativen Mittelwerte der ersten maximalen Kraftmessung nach der Carbachol-Gabe ergaben 161 ± 9 % und wurden signifikant ($p < 0,001$) auf 131 ± 7 % reduziert. Auch die Medianwerte bestätigten diesen Effekt, mit einer Abnahme von 163 % vor der Applikation von Chelerythrin auf 129 % nach der Inhibitorzugabe. Bei der dritten und somit letzten Carbachol-Applikation (134 ± 4 %) wurde kein signifikanter Unterschied ermittelt.

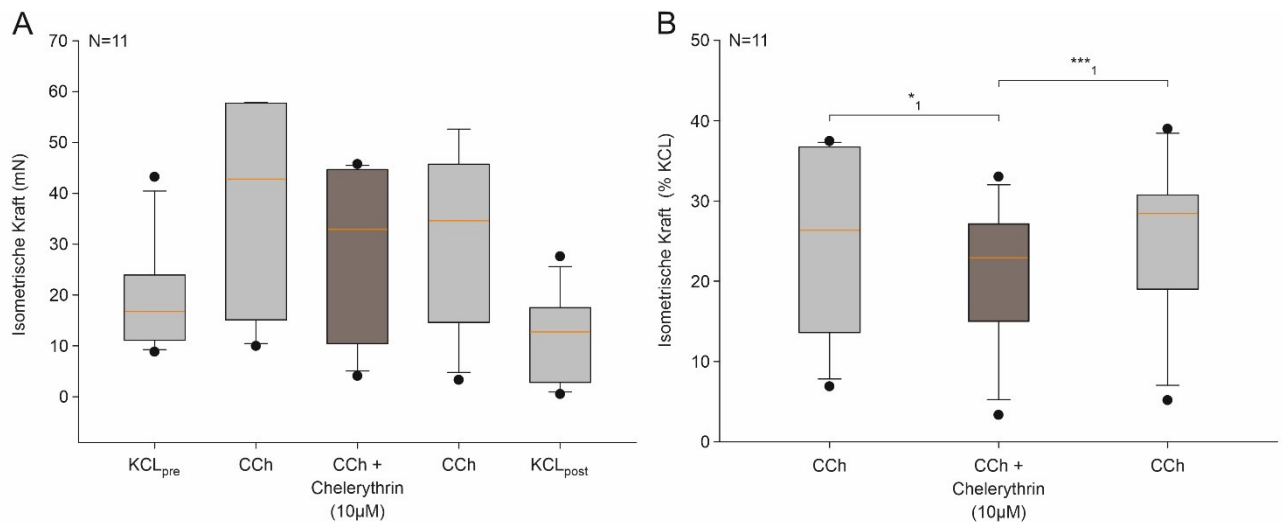


ABB. 15 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS CHELERYTHRIN (10 µMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 µMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AM COLON DER WISTAR-RATTE. (A) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN, (B) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; ₁ = gepaarter T-Test; Brauner Boxplot = Chelerythrin enthalten)

An den Colon-Segmenten wurde die Tonus-Kontraktion nach der isolierten Zugabe von Carbachol von $38,5 \pm 5,9$ mN auf $29,6 \pm 4,7$ mN durch Vorinkubation mit Chelerythrin (10 µmol/L) reduziert. Die daraus resultierende Kraftabnahme betrug $8,9 \pm 1,2$ mN. Zuletzt, nach Entfernen des Inhibitors, konnte eine Carbachol-Antwort von $32,1 \pm 5,2$ mN gemessen werden. Die relativen Messergebnisse sanken nach PKC-Inhibitor-Vorinkubation von 236 ± 33 % auf 203 ± 26 %. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) konnte hierbei festgestellt werden. Auch die Medianwerte zeigten eine entsprechende Abnahme und reduzierten sich von 264 % vor auf 229 % nach der Inhibitorapplikation. Weiterhin lag eine signifikante Zunahme ($p < 0,001$) der maximalen Kontraktionskraft (262 ± 30 %) bei der letzten Carbachol-Antwort vor.

3.3.3 VERSUCHSREIHE MIT H-7

Um die Wirkung eines weiteren PKC-Inhibitors zu untersuchen, erfolgten neue Versuchsreihen an Präparaten von Duodenum-, Ileum- und Colon-Segmenten. Hierfür wurde der Inhibitor H-7 mit einer Konzentration von 5 µmol/L verwendet.

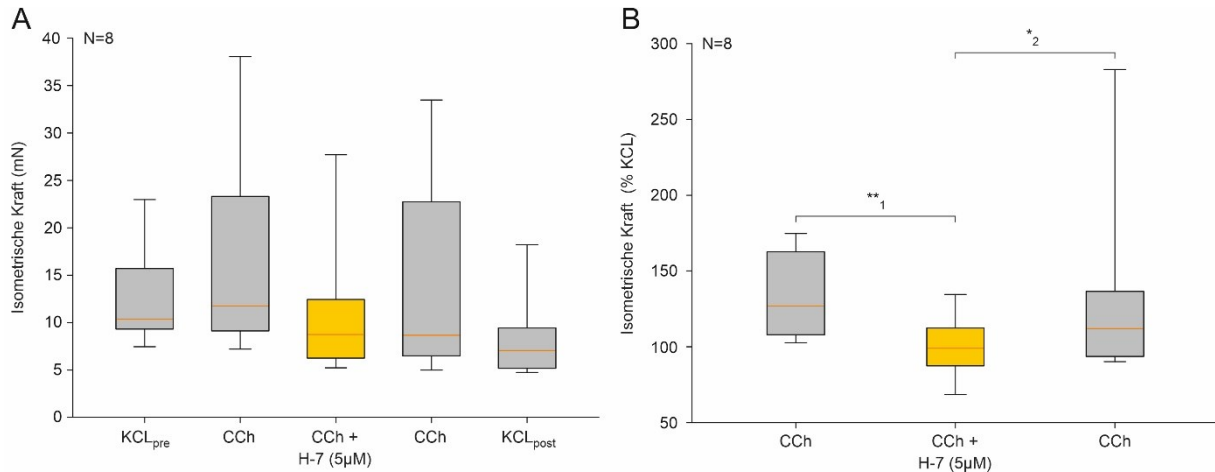


ABB. 16 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS H-7 (5 µMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 µMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN DUODENUM-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE. (A) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN, (B) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ₁ = gepaarter T-Test; ₂ = Wilcoxon Rangsummentest; Gelber Boxplot = H-7 enthalten)

Die Experimente am Duodenum umfassten 8 Versuche. Es konnte nach erster Carbachol-Inkubation im Mittel eine maximale Kontraktionskraft von $15,9 \pm 3,8$ mN bzw. 132 ± 10 % aufgezeichnet werden. Durch die Vorinkubation des Inhibitors H-7 und einer anschließenden Carbachol-Gabe in die Organbadkammer, reduzierte sich die absolute Kontraktionskraft des Duodenums auf $10,8 \pm 2,6$ mN und die relative Kraft auf 100 ± 7 % (statistische Signifikanz, $p < 0,01$). Mit der darauffolgenden Carbachol-Gabe erreichte das Segment eine absolute Kraft von $13,2 \pm 3,8$ mN. Im relativen Ergebnis konnten hier 132 ± 22 % im Bezug zum Kaliumnormwert errechnet werden, wodurch sich ein statistischer Unterschied ($p < 0,05$) ergab. Die Medianwerte verringerten sich entsprechend von 127 % auf 90 %.

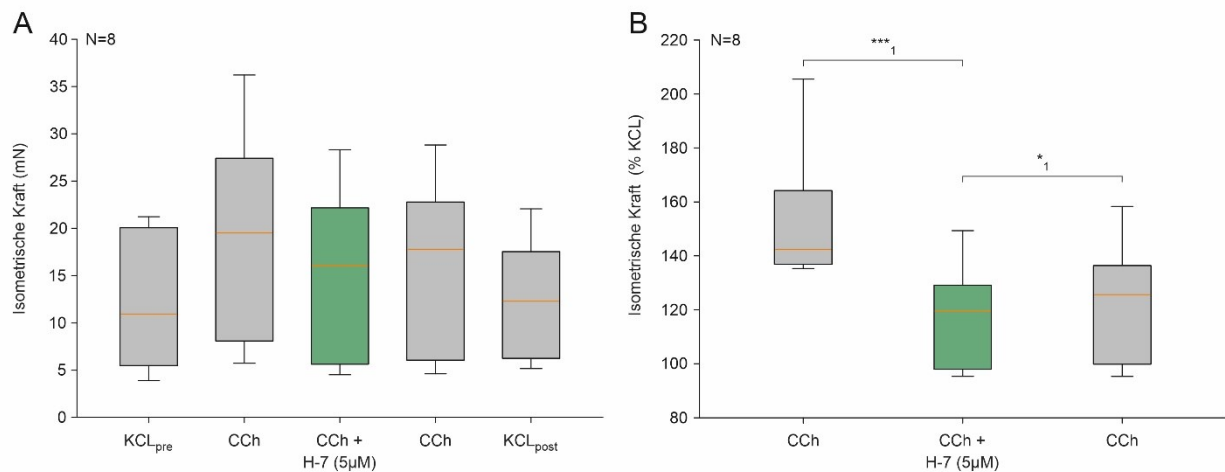


ABB. 17 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS H-7 (5 μ MOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 μ MOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN ILEUM-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE. (A) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN, (B) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %. (* $p < 0,05$; * $p < 0,001$; ₁ = gepaarter T-Test; grüner Boxplot = H-7 enthalten)**

Wie in Abb. 17 dargestellt, wurde bei den Segmenten vom Ileum eine deutliche Reduktion der Kontraktionskraft, durch das Beifügen des Inhibitors H-7 hervorgerufen. Die Verringerung der isometrischen Kontraktion betrug $4 \pm 0,7$ mN und fiel somit von $19,1 \pm 4$ mN auf $15,1 \pm 3,2$ mN. Nach mehrfachem Auswaschen von H-7 stieg die gemessene Kraftgröße nur gering auf $15,9 \pm 3,3$ mN. Analog dazu verhielten sich die relativen Messwerte. Die Carbachol-Antwort, mit einem Wert von 152 ± 8 %, wurde durch Manipulation des Inhibitors H-7 signifikant ($p < 0,001$) auf 117 ± 7 % gedrosselt. Auch die Betrachtung der Medianwerte bestätigte die Reduktion mit einer Abnahme von 142 % auf 119 % der relativen isometrischen Kraft. Eine signifikante Zunahme der Kraft ($p < 0,05$) konnte bei der letzten relativen Carbachol-Antwort von 122 ± 8 % festgestellt werden.

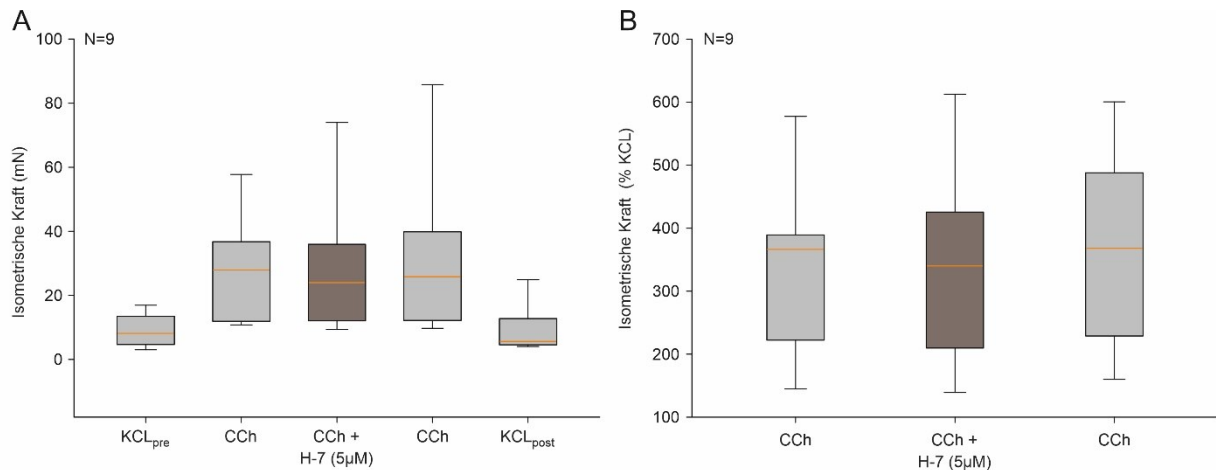


ABB. 18 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS H-7 (5 μMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 μMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN COLON-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE. (A) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN, (B) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %. (brauner Boxplot = H-7 enthalten)

Für die Experimente an den Colon-Segmenten wurden insgesamt 9 Versuchsreihen untersucht. Im Mittel ergaben die absoluten Werte der Carbachol-Antwort eine Kontraktionskraft von $27,6 \pm 5,1$ mN. Anders als bei den Segmenten vom Duodenum und Ileum konnte, durch Vorinkubation des PKC-Inhibitors H-7 (5 μmol/L) im Organbad, keine Manipulation der Kontraktionskraft festgestellt werden. Die gemessene Kraft blieb annähernd gleich bei $28,4 \pm 6,7$ mN und stieg nach dem Auswaschen des Inhibitors weiter auf $30,8 \pm 7,9$ mN an. Die relativen isometrischen Kräfte in Bezug zum Kalium-Normwert zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den 3 Carbachol-Antworten (Abb. 18). Die Medianwerte zeigten in dieser Versuchsreihe ebenfalls eine geringfügige Reduktion von 366 % auf 340 %.

3.3.4 VERSUCHSREIHE MIT Y-27632

Um die Wirkung eines ROCK-Inhibitors auf die glatte Muskulatur zu untersuchen, wurde eine weitere Experimentfolge durchgeführt. Dazu wurden die Darmsegmente vom Duodenum, Ileum und Colon mit 5 μmol/L des ROCK-Inhibitor Y-27632 vorinkubiert und in die mit Organbadlösung befüllte und carbogenbegaste Organbadkammer eingehängt. Bei einer gleichbleibenden Temperatur von 37°C stellte sich der Ruhetonus (Baseline) der glatten Muskulatur ein, wie in Abb. 19 (A) ersichtlich.

Nach der Vitalitätskontrolle durch KCL und den anschließenden Spülvorgängen, erfolgte eine Kontraktionsauslösung durch Carbachol. Abschließend erfolgte die 10-minütige Vorinkubation

des ROCK-Inhibitors Y-27632 mit darauffolgender Carbachol-Applikation. Daraus resultierte eine verringerte Wirkung der Carbachol induzierten Kontraktion. Daraufhin erfolgte erneut eine Kontraktionsauslösung durch Carbachol und zum Ende des Experiments wurde eine letzte Vitalitätskontrolle mittels KCL-Gabe durchgeführt. Der Versuchsablauf dauerte insgesamt ca. 4,5 H. Währenddessen stellte sich nach jeder eingeleiteten Auswaschphase der Ruhetonus wiederholt ein.

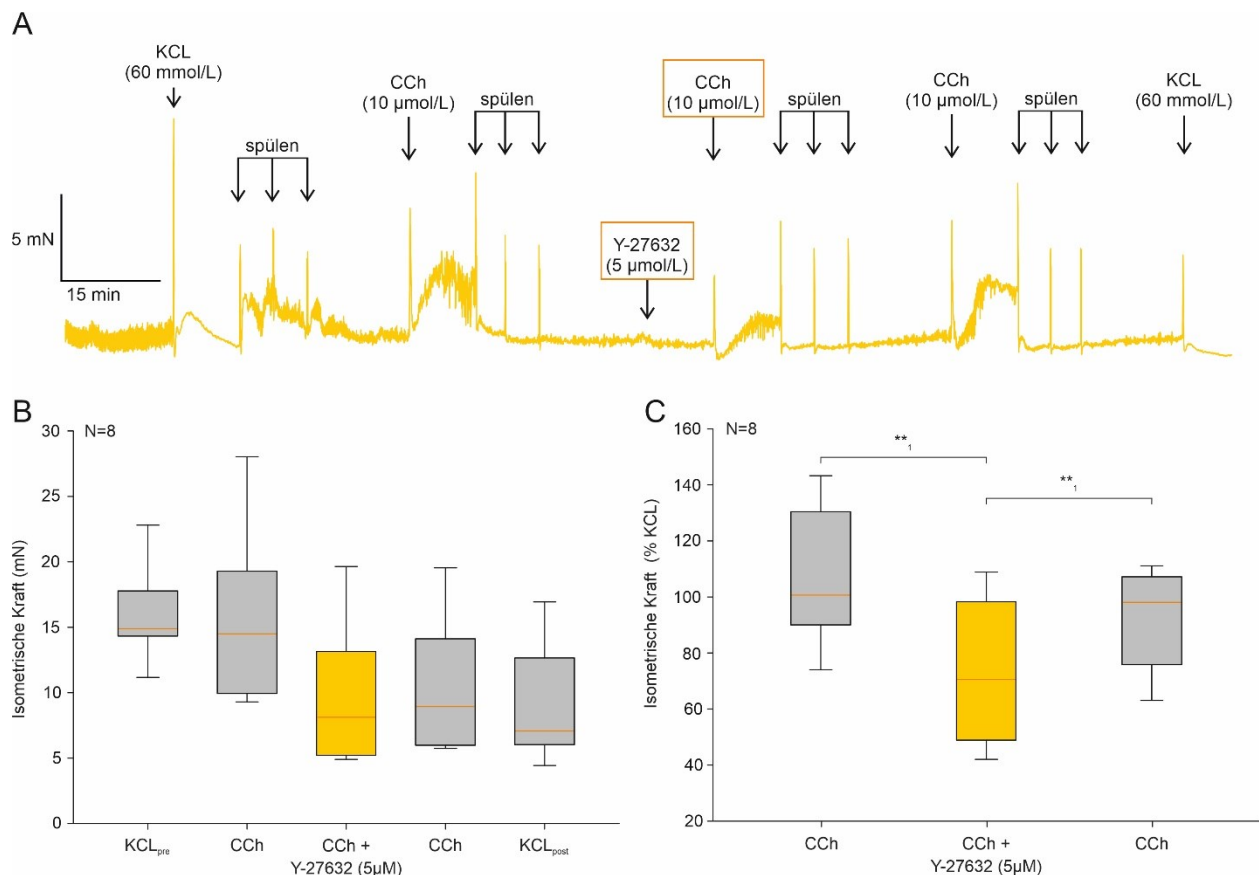


ABB. 19 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN RHO-KINASE-INHIBITORS Y-27632 (5 μMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 μMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN DUODENUM-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE. (A) Beispielspur einer Labchart-Aufzeichnung des zeitlichen Verlaufs einer durch Y-27632 verringerten Carbachol induzierten Kontraktion beim Duodenum-Segment der Wistar-Ratte. Der graphische Verlauf beschreibt die positive bzw. negative Kraftänderung in mN des Tonus sowie der phasischen Kontraktionen in Form von Amplituden in mN. (B) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN, (C) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %. (** $p < 0,01$; ₁ = gepaarter T-Test; gelber Boxplot = Y-27632 enthalten)

Die Ergebnisse der an der Wistar-Ratte durchgeführten Experimente wurden ebenfalls in Abb. 19 (B) und (C) dargestellt: Die Duodenum-Segmente antwortete nach der Zugabe von Carbachol mit einer isometrischen Kraft von $15,6 \pm 2,2$ mN. Diese Kraft wurde durch die anschließende Vorinkubation mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 auf $9,5 \pm 1,9$ mN deutlich

reduziert. Durch die dritte Carbachol-Applikation erhöhte sich die Kontraktionskraft auf $10,3 \pm 1,7$ mN.

Die in der Abb. 19 (C) dargestellten relativen Messwerte zeigen eine signifikante Reduktion ($p < 0,01$) der Kräfte von 108 ± 8 % auf 73 ± 9 %, durch die Wirkung des Inhibitors Y-27632. Auch die Medianwerte unterstrichen diesen Effekt (101 % reduziert auf 71 %). Ebenfalls stiegen die Kräfte signifikant ($p < 0,01$) nach Entfernung des Blockers auf 93 ± 6 % an.

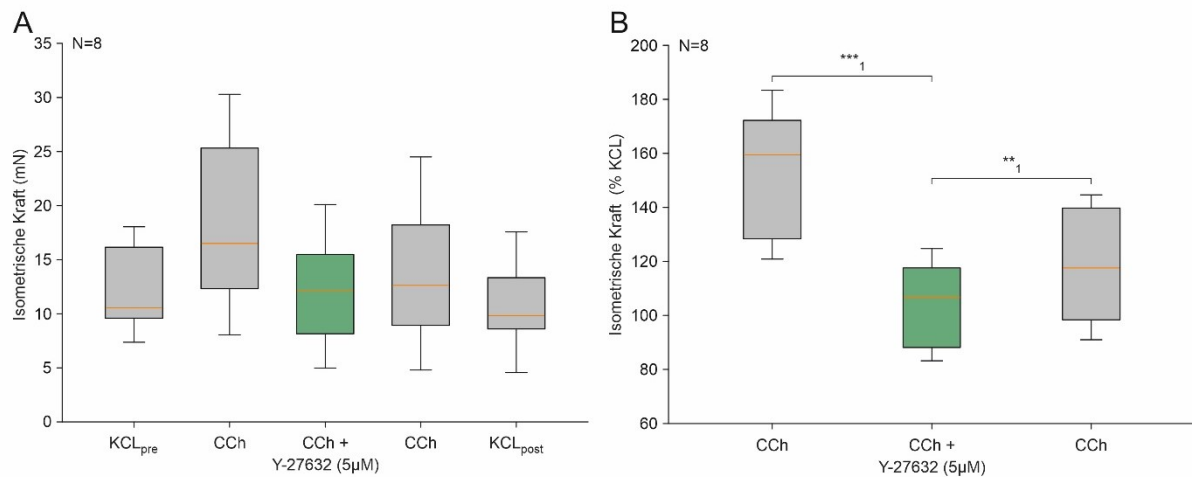


ABB. 20 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN RHO-KINASE-INHIBITORS Y-27632 (5 μMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 μMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN ILEUM-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE. (A) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN. (B) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ₁ = gepaarter T-Test; grüner Boxplot = Y-27632 enthalten)

Die Versuchsreihe an den Ileum-Segmenten umfassten insgesamt 8 Experimente. Deutlich zu erkennen war eine Inhibierung der maximalen Kontraktionskraft durch 5 μmol/L des Inhibitors Y-27632 (Abb. 20). Die Carbachol-Antwort wurde durch die Zugabe des Inhibitors Y-27632 von $18,4 \pm 2,7$ mN auf $12,2 \pm 1,7$ mN reduziert. Anschließend stieg die Kontraktionskraft durch die wiederholte Zugabe von Carbachol auf $13,5 \pm 2,2$ mN an.

Auch bei den korrespondierenden relativen Ergebnissen zeigte sich eine deutliche Blockierung der maximalen Kontraktionskräfte der Ileum-Segmente durch den ROCK-Inhibitor. Es bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) sowohl von der ersten Carbachol-Antwort (154 ± 8 %) zur mittleren Carbachol-Antwort mit Inhibitor (104 ± 5 %), als auch von der mittleren zur letzten Carbachol-Kraft (119 ± 7 %; $p < 0,01$). Eine vergleichbare Abnahme zeigte sich bei den Medianwerten, die von 159 % vor der Zugabe des Inhibitors auf 107 % danach sanken.

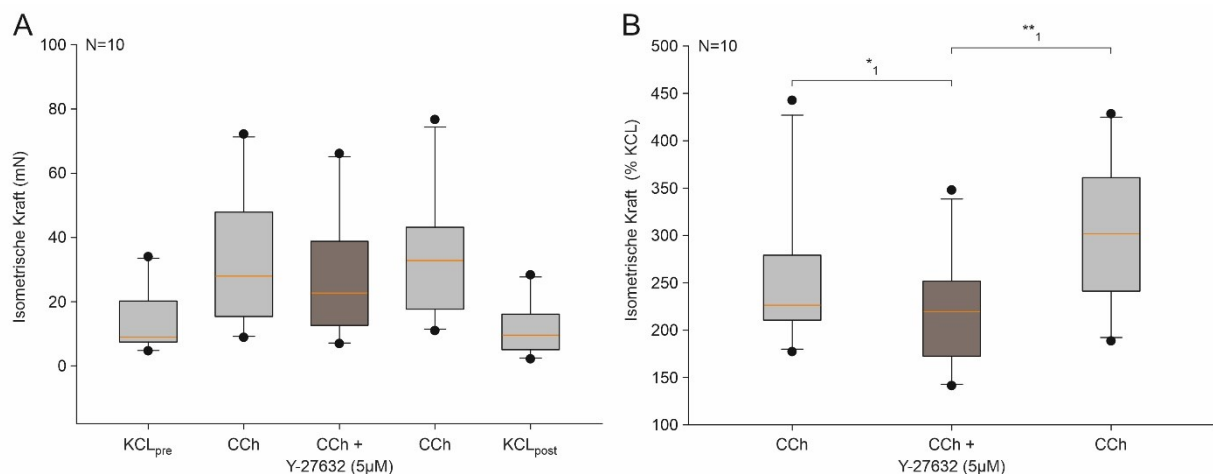


ABB. 21 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN RHO-KINASE-INHIBITORS Y-27632 (5 µMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 µMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN COLON-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE. (A) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN. (B) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ₁ = gepaarter T-Test; brauner Boxplot = Y-27632 enthalten)

An Darmsegmenten vom Colon wurden 10 Experimente durchgeführt, deren Ergebnisse in *Abb. 19* dargestellt sind. Es konnte eine Verminderung der Kontraktionskräfte durch den ROCK-Inhibitor Y-27632 beobachtet werden, wobei diese von $32,3 \pm 6,8$ mN auf $27,5 \pm 6,2$ mN sanken. Die relativen Messwerte zeigten eine signifikante Reduktion der durch Carbachol ausgelösten Kräfte von 253 ± 24 % auf 221 ± 19 % ($p < 0,05$). Die Medianwerte spiegelten ebenfalls die Abnahme der Kraft wider und reduzierten sich von 226 % auf 219 %. Nach dem Auswaschen des Inhibitors und einer erneuten Applikation von Carbachol stiegen diese Kräfte signifikant auf 305 ± 24 % an ($p < 0,01$).

Eine ähnliche Wirkung wurde auch in den Duodenum- und Ileum-Segmenten beobachtet, wobei durch Zugabe von Y-27632 die anschließenden durch Carbachol induzierten Kräfte reduziert wurden. Nach dem Auswaschen und erneuter Carbachol-Gabe nahmen die Kräfte in beiden Fällen signifikant zu.

3.3.5 VERSUCH KOMPLEX

Um eine mögliche additive Wirkung der drei PKC- und ROCK-Inhibitoren zu untersuchen, wurden Chelerythrin (10 $\mu\text{mol/L}$), H-7 (5 $\mu\text{mol/L}$) und Y-27632 (5 $\mu\text{mol/L}$) gleichzeitig verabreicht. Diese Versuchsreihe wurde ausschließlich an Darmsegmenten vom Colon durchgeführt.

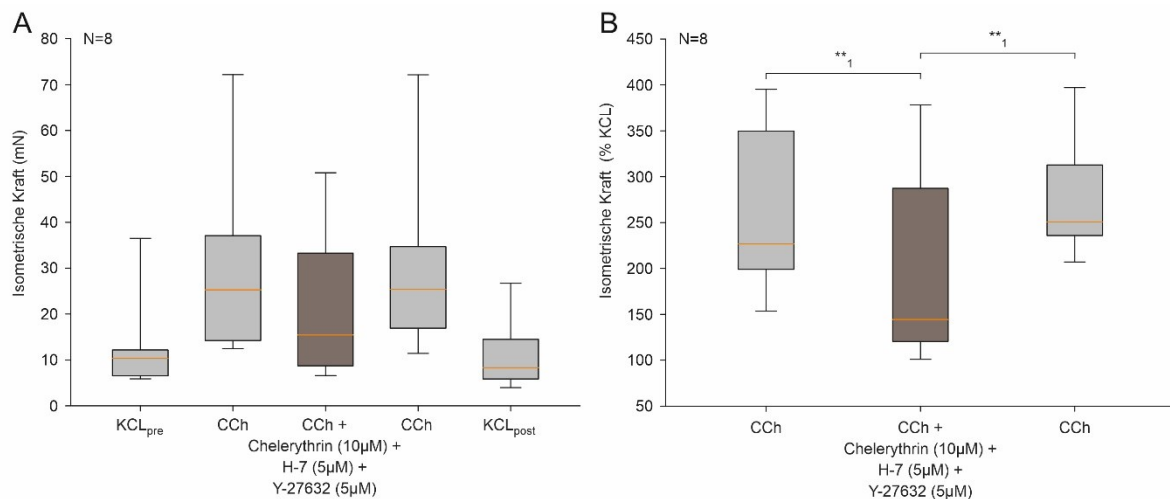


ABB. 22 WIRKUNG VON 3 INHIBITOREN: CHELERYTHRIN (10 $\mu\text{mol/L}$), H-7 (5 $\mu\text{mol/L}$), Y-27632 (5 $\mu\text{mol/L}$) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 $\mu\text{mol/L}$) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN COLON-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE. (A) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN. (B) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %. ($p < 0,01$; ₁ = gepaarter T-Test; Brauner Boxplot = Y-27632 enthalten)**

Bei den in Abb. 22 durchgeführten Experimenten an Colon-Segmenten wurde die Wirkung von drei gleichzeitig hinzugegebenen Inhibitoren untersucht. Diese Versuchsreihe umfasste insgesamt 8 Messungen. Durch die simultane Applikation von Chelerythrin, H-7 und Y-27632 konnte die Carbachol-Antwort von $29,4 \pm 7,0$ mN auf $21,0 \pm 5,5$ mN reduziert werden. Nach einem sorgfältigen Spülvorgang erreichte die Kontraktionskraft durch die separierte Gabe von Carbachol einen maximalen Wert von $29,7 \pm 6,7$ mN. Die relativen Messwerte wiesen eine signifikante Verringerung ($p < 0,01$) der Carbachol-Antwort durch die zugefügten Inhibitoren von 255 ± 31 % zu 188 ± 37 % auf. Die Medianwerte zeigten analog zur Mittelwertabnahme einen Rückgang der Kraft von 227 % vor der Inhibitorzugabe auf 144 % danach. Nach Entfernung der drei PKC- und ROCK-Inhibitoren stieg die maximale Kontraktionskraft, ausgelöst durch Carbachol, signifikant ($p < 0,01$) auf 273 ± 22 %. Im Vergleich zu den isolierten Zugaben der drei Inhibitoren, konnte eine additive Reduktion der maximalen Kontraktionskraft um 26 % festgestellt werden. Dagegen erreichte die separate Zugabe von Chelerythrin und Y-27632 eine Verringerung von 13 und 12 %. Der Inhibitor H-7 führte sogar zu annähernd keiner Veränderung.

IV. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der ROCK und PKC in der glatten Muskulatur, für die durch Carbachol induzierte Kontraktionskraft an drei Darmsegmenten des unteren Gastrointestinaltraktes untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse im Detail betrachtet und im Kontext der Fachliteratur diskutiert, wobei zu beachten ist, dass bisher nur wenig Literatur zu diesem Thema zur Verfügung steht. Darüber hinaus wurde nicht bei allen Arbeiten angegeben, ob es sich dabei um die Längs- oder Ringmuskulatur handelte. Im Interesse einer klareren Darstellung wird in der Diskussion auf die Unterscheidung zwischen Ring- und Längsmuskulatur verzichtet. Dennoch wurde der Versuch unternommen sich auf die Längsmuskulatur zu konzentrieren.

4.1 WIRKUNG VON CARBACHOL IM GLATTEN MUSKEL

Die permutierende Applikation von unterschiedlichen Carbachol-Konzentrationen bewirkte bei den Duodenum-, Ileum- und Colon-Präparaten, ausgehend vom Ruhetonus, eine dosisabhängige Kontraktion. Daraus ergibt sich in der Darstellung der Mittelwerte ein annähernd sigmoidaler Verlauf. Auch in anderen wissenschaftlichen Arbeiten (Weller 2016; Kirschstein et al. 2014; Takeuchi et al. 2007) konnte im Organbad bei der Verwendung aufsteigender Carbachol-Konzentrationen in der glatten Muskulatur ein sigmoidaler Verlauf aufgezeichnet werden. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass bei einer geringen Carbachol-Konzentration von 0,01 $\mu\text{mol/L}$ nur wenige Moleküle an die muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren binden und somit eine geringere Aktivierung kontraktile Prozesse auslösen. Eine maximale Kontraktionskraft wurde bei den vorliegenden Experimenten am Colon-Segment bei einer Zugabe von 100 $\mu\text{mol/L}$ Carbachol erreicht, was auf eine höhere kontraktile Kapazität dieses Darmsegments schließen lässt. Hingegen erreichten die Duodenum- und Ileum-Segmente eine maximale Kontraktionskraft schon nach der Applikation von 10 $\mu\text{mol/L}$ Carbachol. Diese Ergebnisse deuten auf eine Sättigung der Carbachol-Moleküle am muskarinergen Acetylcholin-Rezeptor hin, wobei es durch eine weitere Erhöhung der Carbachol-Dosis zu keiner stärkeren Wirkung führte.

Im Rahmen der Zeitkontroll-Versuche wurde Carbachol (10 $\mu\text{mol/L}$) über einen Zeitraum von 4,5 h dreimal appliziert (siehe *Kapitel 3.2*). Hiermit konnte die Reproduzierbarkeit, der durch Carbachol induzierten Kontraktionskraft nachgewiesen werden. Außerdem wurde ein mäßiger, kontinuierlicher Abfall der maximalen Kontraktionskraft beobachtet, wobei nur zwischen der ersten und zweiten Carbachol-Antwort des Duodenum-Segments ein signifikanter Unterschied vorlag. Auch in der Studie von Kirschstein et al. (2014) wurden

Zeitkontroll-Experimente durchgeführt, in denen ein geringes Nachlassen der durch Carbachol induzierten Kontraktionen beobachtet wurde. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die intrazellulären Calciumspeicher und ATP-Vorräte nach mehrfacher Auslösung der maximalen Kontraktionskraft erschöpft werden und eine Segmentermüdung erfolgt. Des Weiteren ist eine Desensibilisierung der muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren gegenüber Carbachol und zu wenig Zeit zur vollständigen Erholung zwischen den Intervallen der Carbachol-Applikation denkbar.

4.2 EFFEKTE EINER BLOCKADE DER ROCK AUF DIE KONTRAKTILITÄT DER GLATTEN MUSKULATUR DES UNTEREN GASTROINTESTINALTRAKTS

In der glatten Muskulatur kann der Mechanismus der Ca^{2+} -Sensitivierung unter anderem durch die ROCK-Aktivierung vermittelt werden. Dieser Prozess erfordert, dass Rho durch GTP aktiviert wird, das von Rho-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (RhoGEFs) bereitgestellt wird. Der entstehende Rho-GTP-Komplex aktiviert die ROCK. Diese phosphoryliert die myosinbindende Untereinheit der MLCP, wodurch ihre Aktivität gehemmt wird. Infolgedessen bleibt die Kontraktion bestehen (Somlyo und Somlyo 2003; Wynne et al. 2009).

Um den Einfluss der ROCK auf die Kontraktilität der glatten Muskulatur zu ermitteln, wurde dieses Enzym in der vorliegenden Arbeit an drei Darmabschnitten des unteren Gastrointestinaltrakts blockiert. Die Inhibierung dieses Signalwegs erfolgte mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 mit einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol/L}$. Y-27632 wird als spezifischer und potenter ROCK-Inhibitor beschrieben (Uehata et al. 1997). In den Arbeiten von Pfitzer et al. (2001) und Swärd et al. (2000) wurde Y-27632 am Ileum des Meerschweinchens mit einem IC_{50} von 1,4 bis 1,7 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt. Für die vorliegenden Experimente könnte der Ausgangswert von 5 $\mu\text{mol/L}$ somit sinnvoll sein, da dieser etwa 3 bis 3,5-fach über der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration liegt und die ROCK wahrscheinlich etwa 70 bis 90% gehemmt werden kann.

In der Vergangenheit haben bereits mehrere Arbeitsgruppen (Uehata et al. 1997; Davies et al. 2000; Yoshii et al. 1999; Sakamoto et al. 2003) nachgewiesen, dass Y-27632 die ROCK und damit die Kontraktion in der glatten Muskulatur hemmt. Aufgrund dieser Studien und den damit zugrundeliegenden Erkenntnissen über die Verwendung von Y-27632, lässt sich schlussfolgern, dass eine vergleichbare Wirkung an der glatten Muskulatur vom Duodenum, Ileum und Colon zu erwarten sein könnte.

Die pharmakologischen Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden im Organbad durchgeführt. Dabei wurden die Darmsegmente Duodenum, Ileum und Colon jeweils mit Y-27632 (5 $\mu\text{mol/L}$) inhibiert, um zu überprüfen, welchen Einfluss der ROCK-Inhibitor auf die durch Carbachol induzierte Kontraktion nimmt. Hauptaugenmerk lag auf dem zu untersuchendem Parameter der isometrischen Kontraktionskraft. An allen drei untersuchten Darmsegmenten wurde die isometrische Kontraktionskraft infolge der Applikation von Y-27632 (5 $\mu\text{mol/L}$) signifikant reduziert. Dieser Effekt war reproduzierbar.

4.2.1 STUDIEN ZUR GLATTEN MUSKULATUR

Die verfügbaren Arbeiten, die sich unter anderem mit der Inhibierung der durch Carbachol induzierten Kontraktionskraft in der glatten Muskulatur mittels Y-27632 beschäftigten, zeigten größtenteils bei diesem Parameter übereinstimmende Ergebnisse (Übersicht siehe *Tab. 10*). Die Arbeitsgruppe um Pfitzer et al. (2001) fand bei einer Studie am Ileum eines Meerschweinchens heraus, dass die durch Carbachol (10 $\mu\text{mol/L}$) induzierte Kraft durch Y-27632 ab einer Konzentration von 0,3 bis 10 $\mu\text{mol/L}$ reduziert wurde. Insgesamt zeigte Y-27632 dabei eine starke und signifikante Wirkung auf die Carbachol-induzierte Ca^{2+} -Sensitivität und Kontraktionskraft (Pfitzer et al. 2001). In einer Untersuchung von Takeuchi et al. (2004) wurde ebenfalls gezeigt, dass Y-27632 die durch GTP und Carbachol induzierte Ca^{2+} -Sensibilisierung blockierte. Gleichzeitig stellte die Arbeitsgruppe dabei fest, dass die Hemmung im proximalen Colon signifikant stärker auftrat als im distalen Colon (Takeuchi et al. 2004). Diese Beobachtungen regionaler Unterschiede in der Hemmwirkung, insbesondere die stärkere Inhibition im proximalen gegenüber dem distalen Colon, legen eine funktionelle Heterogenität des ROCK-Signalwegs innerhalb verschiedener Abschnitte des gastrointestinalen Trakts nahe.

In einer Studie von Mizuno et al. (2008) wurden die Kraftentwicklung, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und die FRET-Signalgebung eines CaM-Sensors simultan in isolierten Blasenmuskelstreifen von Mäusen gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass unter anderem Y-27632 (10 $\mu\text{mol/L}$) die Carbachol-induzierte (10 $\mu\text{mol/L}$) Kraftentwicklung sowie die Phosphorylierung der regulatorischen MLC reduzierte, ohne die intrazelluläre Calciumkonzentration oder das Ausmaß der MLCK-Aktivierung signifikant zu beeinflussen. Darüber hinaus führte Y-27632 zu einer verminderten Carbachol-vermittelten Phosphorylierung von MYPT1 an Thr694. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die durch Agonisten induzierte Kontraktion auf der Aktivierung des Calcium-CaM-abhängigen MLCK beruhen und die MYPT1-Phosphorylierung eine Rolle bei der Hemmung der MLCP-Aktivität einnimmt.

Die Arbeitsgruppe von Shabir et al. (2004) untersuchte Ureter von Ratten- und Meerschweinchen u.a. mit Hilfe von Kalziumfluoreszenz- sowie Gewebekraftmessungen. Die Ergebnisse zeigten, dass Carbachol (10 $\mu\text{mol/L}$) die Kontraktion der glatten Muskulatur verstärkte, während die Inhibition von ROCK durch Y-27632 (10 $\mu\text{mol/L}$) zu einer Ca^{2+} -unabhängigen Erhöhung der Relaxationsrate der Kontraktion, begleitet von einer Beschleunigung der MLC-Desphosphorylierung, führte. Das weist auf die wichtige Rolle von ROCK in der Signalübertragung hin. Die Wirkung der ROCK-Inhibition durch Y-27632 ist spezifisch für den Rattenureter und konnte im Meerschweinchen-Ureter nicht beobachtet werden, was für eine artspezifische Funktion der ROCK-vermittelten Signaltransduktion sprechen könnte.

TAB. 10 STUDIEN ZUR GLATTEN MUSKULATUR

Gewebe	Spezies	Methode	Referenz
Ileum	Meerschweinchen (<i>Dunkin-Harley</i>)	Myograph SDS-PAGE Western Blot	Pfitzer et al. (2001)
Harnblase	Maus (<i>transgen mit CaM-Sensor-MLCK-Expression</i>)	Fluoreszenzmikroskopie Myographie Urea-glycerol-PAGE, Western Blot	Mizuno et al. (2008)
Colon	Ratte (<i>Wistar, männl.</i>)	Kraftmessung	Takeuchi et al. (2004)
Ureter	Ratten Meerschweinchen	Kraftmessung im modifizierten Organbad Patch-Clamp Technik Kalziumfluoreszenzmessungen EFS	Shabir et al. (2004)
Ileum	Ratte	Kraftmessung Western Blot	Ihara et al. (2007)

4.2.2 STUDIEN ZUR GLATTEN MUSKULATUR IM ORGANBAD

Des Weiteren gibt es Studien, welche mit Hilfe des Organbads die Mechanismen der Ca^{2+} -Sensitivierung an der glatten Muskulatur erforschten (Übersicht siehe *Tab. 11*). Dazu zählt die Arbeitsgruppe von Durlu-Kandilci und Brading (2006), welche β -escin permeabilisierte Harnblasen von Ratten und Meerschweinchen, sowie Längsmuskelstreifen am Blinddarm (taenia caecum) vom Meerschweinchen untersuchten. Unter anderem wurde dafür Y-27632 (5 $\mu\text{mol/L}$) verwendet, welcher die durch Carbachol (50 $\mu\text{mol/L}$) induzierte Ca^{2+} -Sensibilisierung in der Ratten-Harnblase vollständig unterdrückte, was auf die zentrale

Rolle des ROCK-Signalwegs hinweist. In der Meerschweinchen-Harnblase und taenia caecum hatte Y-27632 dagegen keine hemmende Wirkung, stattdessen wurde in einigen Fällen eine initiale Kontraktion beobachtet, gefolgt von einer Rückkehr zur Basalaktivität. Dies deutet auf artspezifische Unterschiede in den Mechanismen der Ca^{2+} -Sensibilisierung hin. Wibberley et al. (2003) konnten bei der Untersuchung einer Harnblase von der Ratte beobachten, dass Y-27632 in einer Konzentration von $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ die durch Carbachol ($0,001$ bis $0,3\text{ }\mu\text{mol/L}$) hervorgerufene Kontraktion signifikant abschwächte.

In einer weiteren Studie untersuchten Oh et al. (2003) die Beteiligung des ROCK-Signalwegs bei der Agonisten-induzierten Ca^{2+} -Sensitivität am Myometrium einer trächtigen Ratte. Auch hierbei wurde eine durch Carbachol ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) induzierte phasische und tonische Kontraktion durch Y-27632 ($1\text{ }\mu\text{mol/L}$) geschwächt. Die Arbeitsgruppe von Cernecka et al. (2015) konnte in der glatten Muskulatur der Harnblase einer Ratte und eines Menschen eine durch Y-27632 ($1\text{ }\mu\text{mol/L}$) reduzierte durch Carbachol ($1\text{ }\mu\text{mol/L}$) induzierte Kontraktion auslösen.

Die Untersuchung von Kirschstein et al. (2014) ergänzt diese Befunde, indem sie zeigt, dass sowohl MLCK- als auch ROCK-Inhibitoren (darunter Y-27632, $10\text{ }\mu\text{mol/L}$) die durch Carbachol ($2\text{ }\mu\text{mol/L}$) induzierten Kontraktionen im menschlichen Detrusormuskel wirksam reduzieren können. Die gemessenen Kontraktionskräfte wurden, wie auch in der vorliegenden Arbeit, in Relation (in %) zur initialen Kaliumchlorid-Antwort (60 mmol/L) betrachtet. Die Ergebnisse zeigten zudem einen additiven Effekt bei der Kombination der Inhibitoren Y-27632 und ML-9 bei der Reduktion der Carbachol-Antwort. Daraus lässt sich ableiten, dass die ROCK eine ebenso wesentliche Rolle wie die MLCK bei der durch Carbachol induzierten Kontraktion einnimmt.

Bisher sind wenige Arbeiten bekannt, welche die Wirkung von Y-27632 an der durch Carbachol induzierten Kontraktionskraft an den Darmsegmenten Ileum, Colon und Duodenum, mittels Organbad ausführlich untersuchten. Zudem existieren widersprüchliche Ergebnisse. Frei et al. (2009) fanden in ihrer Studie heraus, dass die Kontraktion eines durch Carbachol ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) induzierten Colons der Maus durch Y-27632 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) nicht signifikant gehemmt wurde. Das in derselben Studie untersuchte Jejunum wurde dagegen signifikant beeinflusst und wies eine Reduzierung der Kontraktion nach Hinzugabe von Y-27632 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) auf. Aufgrund dieser Erkenntnisse vermutet die Studiengruppe um Frei et al. (2009), dass die Ca^{2+} -Sensibilisierung durch die ROCK-Signalweg nur eine untergeordnete Bedeutung bei der durch Carbachol induzierten Kontraktion in der Colon-Muskulatur einnimmt. Stattdessen wird angenommen, dass die Kontraktion dort eher von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen abhängen. Ihre Vermutung untermauern Sie mit Studien, in denen die Kontraktion durch den Ca^{2+} -Kanalblocker Nifedipin

vollständig gehemmt und in Präparaten ohne funktionsfähige spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle deutlich reduziert war.

Im Gegensatz dazu konnten Gastreich-Seelig et al. (2020) bei Experimenten am proximalen Colon feststellen, dass Y-27632 (10 $\mu\text{mol/L}$) die Reaktion auf Carbachol (10 $\mu\text{mol/L}$) signifikant blockiert. Daraus lässt sich schließen, dass der Muskarinrezeptor-Agonist bei der Induktion der Kontraktion den ROCK-Signalweg aktiviert, der eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Muskelkontraktion einnimmt. Wie zuvor beschrieben, zeigten Takeuchi et al. (2004) außerdem einen Unterschied zwischen proximalen Colon und distalen Colon in der Wirkung des ROCK-Inhibitors auf. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die Kontraktilität durch den Signalweg der ROCK in verschiedenen Teilen des Gastrointestinaltrakts unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann.

In der aktuellen Literatur finden sich nur wenige wissenschaftliche Arbeiten, die einen vergleichbaren Ansatz verfolgen, wie die Vorliegende. Eine Studie, die im Rahmen der gegenwärtigen Arbeit als vergleichbar erachtet werden kann, wurde von Anderson et al. (2014) durchgeführt und befasst sich unter anderem mit der Rolle der ROCK in der muskarinergen m_3 -Rezeptor-vermittelten Kontraktion der Längsmuskulatur des Ratten-Colons. Nach der Inkubation von Y-27632 (10 $\mu\text{mol/L}$) erfolgte die Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Carbachol (0,1 bis 100 $\mu\text{mol/L}$). Es resultierte eine signifikante Inhibierung der durch Carbachol induzierten dosisabhängigen Kontraktion. Sowohl die Änderung des Basaltonus als auch die maximale Kraftamplitude nach Carbachol Zugabe konnten festgestellt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen die Bedeutung des ROCK-Signalwegs zur Aufrechterhaltung des Kontraktionsprozesses sowohl beim Ruhetonus als auch bei agonisteninduzierten Kontraktionen mittels Carbachol. Daraus lässt sich schließen, dass die ROCK eine entscheidende Rolle bei der Phosphorylierung und damit verbundenen Inaktivierung der MLCP einnimmt.

Unterschiede zwischen den einzelnen Abschnitten des unteren Gastrointestinaltrakts werden in der Literatur kaum beschrieben und konnten in der vorliegenden Arbeit nur in geringem Maß festgestellt werden. Die durch Carbachol induzierte maximale Kontraktionskraft wurde im Vergleich zu der durch Y-27632 inhibierten Kontraktionskraft am stärksten im Ileum und Duodenum reduziert. Die geringste reduzierte Kontraktionskraft konnte im Colon festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass die ROCK im Ileum und Duodenum einen größeren Stellenwert als im Colon einnimmt und maßgeblich an der Ca^{2+} -Sensitivierung beteiligt ist. Dabei soll nicht unerwähnt bleiben, dass pro Segment jeweils nur ein Blocker verwendet wurde

und keine direkten Vergleiche verschiedener Blocker am selben Segment durchgeführt wurden. Dies gewährleistet, dass eine vollständige Auswaschung zwischen den Anwendungen sichergestellt war.

TAB. 11 STUDIEN ZUR GLATTEN MUSKULATUR IM ORGANBAD

Gewebe	Spezies	Methode	Referenz
Harnblase Taenia caecum	Ratte (<i>Wistar, al bino, männl.</i>) Meerschweinchen (<i>männl.</i>) Meerschweinchen (<i>männl.</i>)	Organbad	Durlu-Kandilci und Brading (2006)
Harnblase	Ratte (<i>Sprague-Dawley, männl.</i>)	Organbad Western Blot RT-PCR	Wibberley et al. (2003)
Myometrium	Ratte (<i>Sprague-Dawley, weibl., trächtig</i>)	Organbad Elektrophorese Western Blot Kalziumfluoreszenzmessungen	Oh et al. (2003)
Harnblase	Ratte (<i>Wistar, männl.</i>) Mensch	Organbad SDS-PAGE Western Blot	Cernecka et al. (2015)
Harnblase (Detrusor)	Mensch	Organbad	Kirschstein et al. (2014)
Colon Jejunum	Maus (<i>wild-Typ; ohne cGKI; mutiertes IRAG</i>)	Organbad Western Blot Fluoreszenzmessungen	Frei et al. (2009)
Analschließmuskel	Ratte (<i>Sprague-Dawley, erw.</i>) Kaninchen (<i>Neuseeland</i>)	Organbad Western Blot	Fan et al. (2002)
Colon	Ratte (<i>Wistar; Sprague-Dawley</i>)	Organbad EFS Fluoreszenzmikroskopie	Gastreich-Seelig et al. (2020)
Colon	Ratte (<i>Sprague-Dawley</i>)	Organbad Immuno-Kinase-Assay	Anderson et al. (2014)
Colon	Maus (<i>BALB/c</i>)	Organbad EFS Voltage-Clamp Technik	Bayguinov et al. (2011)
Duodenum Ileum Colon	Ratte (<i>Wistar</i>)	Organbad	Vorliegende Arbeit

4.2.3 POTENZIELLE ZUKÜNFTIGE ROLLE VON ROCK

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass der ROCK-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Modulation der gastrointestinalen Motilität im Duodenum, Ileum sowie Colon einnimmt und dass ein ROCK-Inhibitor als potenzieller therapeutischer Ansatz zur Regulierung der glatten Muskulatur dienen könnte.

Studien zu ROCK-Inhibitoren in Bezug auf die glatte Muskulatur zeigen, dass diese Substanzen bei der Behandlung verschiedener Erkrankungen wie Asthma, pulmonaler Hypertonie und anderer Gefäßkrankheiten, z.B. Koronararterien-Spasmus, potenziell effektiv sein können (Fukumoto et al. 2005; Masumoto et al. 2002; Uehata et al. 1997; Iizuka et al. 2000; Fujita et al. 2010; Mohri et al. 2003; Abe et al. 2004).

Aufgrund einer stark relaxierenden Wirkung von ROCK-Inhibitoren auf die glatte Muskulatur, ermöglicht es therapeutische Anwendungen, bringt jedoch auch Nebenwirkungen wie z.B. Hypotension oder eine Beeinträchtigung der bronchialen Funktion mit sich (Zhang et al. 2018; Gupta et al. 2013; Hanson et al. 2018; Löhn et al. 2015; Yasuda et al. 2024). Die genaue Dosierung und die individuellen physiologischen Bedingungen des Patienten spielen eine entscheidende Rolle bei der Minimierung unerwünschter Effekte (Yasuda et al. 2024).

Die Forschung zu ROCK-Inhibitoren und ihren Auswirkungen auf die glatte Muskulatur sollte als noch nicht abgeschlossen gelten, denn auch die vorliegende Arbeit zeigt, dass es durchaus verschiedene Anteile von einer ROCK-Beteiligung in verschiedenen Organen des Gastrointestinaltraktes gibt. Darüber hinaus sind weitere Studien erforderlich, um ihr vollständiges Nebenwirkungsprofil zu bestimmen.

4.3 EFFEKT EINER BLOCKADE DER PKC AUF DIE KONTRAKTILITÄT DER GLATTEN MUSKULATUR DES UNTEREN GASTROINTESTINALTRAKTS

Der PKC-Signalweg ist ein Teil der Ca^{2+} -Sensitivierungsmechanismen in der glatten Muskulatur und trägt durch die Hemmung der MLCP zur Verstärkung der Muskelkontraktion bei (Pfitzer 2019). Durch die Bindung von Agonisten erfolgt die Aktivierung von PLC über das $\text{G}_{q/11}$ -Protein (Tanahashi et al. 2021), die das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert (Xia et al. 2001). Dies führt einerseits zur Aktivierung von PKC und gleichzeitig zur Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} (Xia et al. 2001). Die aktivierte PKC phosphoryliert das Inhibitor-Protein

CPI-17, welches die katalytische Untereinheit PP-1C der MLCP direkt inhibiert (Somlyo und Somlyo 2000). Daraus resultiert eine verstärkte Phosphorylierung der MLC und führt somit zu einer erhöhten Kontraktion der glatten Muskulatur (Somlyo und Somlyo 2003).

Um die Bedeutung des PKC-Signalwegs im unteren Gastrointestinaltrakt zu erforschen, erfolgte in den vorliegenden Experimenten die Inhibierung dieses Enzyms bei der Carbachol induzierten Kontraktion. Mit Hilfe von zwei PKC-Inhibitoren, H-7 (5 $\mu\text{mol/L}$) und Chelerythrin (10 $\mu\text{mol/L}$), wurde versucht die Übertragungskette zu blockieren. Erneut erfolgten diese pharmakologischen Versuche mit Hilfe eines Organbads an Präparaten von den Darmsegmenten Duodenum, Ileum und Colon. Der Fokus lag weiterhin auf dem zu untersuchendem Parameter der isometrischen Kontraktionskraft.

Chelerythrin ist ein potenter und spezifischer Inhibitor der PKC mit einer IC_{50} von 0,66 $\mu\text{mol/L}$ (Herbert et al. 1990; Liu und Khalil 2018). Es hemmt die Aktivität von PKC, indem es spezifisch an die katalytische Domäne der PKC bindet (Herbert et al. 1990). Dadurch verhindert es die Phosphorylierung von Zielproteinen und stört PKC-abhängige Signalwege. Auch der Inhibitor H-7 ist bekannt dafür die PKC zu hemmen, indem er die Interaktion von ATP und Proteinsubstraten innerhalb der katalytischen Domäne stört (Matsui et al. 1991).

In vorherigen Studien (siehe *Tab. 12*) konnte die Inhibierung der Kontraktion der glatten Muskulatur durch H-7 und Chelerythrin bereits festgestellt werden. Durch die bereits gewonnenen Ergebnisse und den aktuellen Erkenntnisstand, lässt sich annehmen, dass eine ähnliche Wirkung am Duodenum, Ileum und Colon eintreten könnte. Die Versuchsreihen am Duodenum, Ileum und Colon ergaben, dass die durch Carbachol induzierte Kontraktion durch den Inhibitor Chelerythrin (10 $\mu\text{mol/L}$) signifikant reduziert wurde. Durch die Vorinkubation des zweiten Inhibitors H-7 und einer anschließenden Carbachol-Gabe in die Organbadkammer reduzierte sich die absolute Kontraktionskraft des Duodenums und Ileums signifikant. Am Colon-Segment konnte jedoch keine signifikante Reduktion der durch Carbachol induzierten Kontraktion durch den PKC-Inhibitor H-7 festgestellt werden.

4.3.1 STUDIEN ZUR GLATTEN MUSKULATUR IM ORGANBAD

In der aktuellen Literatur finden sich einige Studien, die sich mit der Wirkung von den PKC-Inhibitoren H-7 und Chelerythrin in der glatten Muskulatur beschäftigen. Dabei wurde die zu hemmende Kontraktion nicht immer, wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall ist, durch

Carbachol, sondern auch durch andere Substanzen induziert. Eine Auswahl an Studien kann der *Tab. 12* entnommen werden.

Beispielsweise konnten Fan et al. (2002) in ihren Studien mittels Angiotensin II eine Kontraktion am inneren Analschließmuskel einer Ratte induzieren und diese signifikant durch den Einsatz von H-7 hemmen. Die Arbeitsgruppe um Cortijo et al. (1997) erzeugte wiederum durch Vanadat (200 µmol/L) eine Kontraktion in Gewebepräparaten der menschlichen Bronchialmuskulatur. Mit Hilfe des PKC-Inhibitors H-7 (10 µmol/L) konnte auch hier die Kontraktion signifikant gehemmt werden.

In Studien zum PKC-Inhibitor Chelerythrin erfolgte die Kontraktion mittels Dexmedetomidin (DMT) in der glatten Muskulatur der Aorta von Präparaten einer Wistar-Ratte. Hier konnte die Kontraktion durch die Zugabe von 10 und 30 µmol/L Chelerythrin signifikant verringert werden (Baik et al. 2014). Auch Tykocki et al. (2015) führten Untersuchungen an der Aorta von Ratten durch. Die Studiengruppe verwendete Endothelin-1 (ET-1), um die Kontraktion an den jeweiligen Gewebeproben zu aktivieren. Eine signifikante Reduktion konnte bei dieser Studie durch die Zugabe von 10 µmol/L Chelerythrin erreicht werden. Die Studien zeigen, dass PKC-Inhibitoren wie H-7 und Chelerythrin in verschiedenen Gewebearten und Spezies (z. B. Ratte, Mensch) durch unterschiedliche Stimuli ausgelöste Kontraktionen der glatten Muskulatur signifikant hemmen können. Dies weist auf eine zentrale Rolle der PKC in kontraktile Prozessen der glatten Muskulatur hin.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Kontraktionsstimulation der glatten Muskulatur Carbachol im Organbad verwendet. In der verfügbaren Literatur finden sich nur einzelne Studien, in denen ebenfalls Carbachol genutzt und eine Inhibierung durch PKC-Inhibitoren H-7 und Chelerythrin vorgenommen wurde. Wie bereits bei den Studien zur Blockade der ROCK mittels Y-27632, decken sich auch die Ergebnisse der verfügbaren Arbeiten, die sich mit der Inhibierung der durch Carbachol induzierten Kontraktionskraft in der glatten Muskulatur mit Hilfe der PKC-Inhibitoren H-7 und Chelerythrin beschäftigen.

Vergleichbare Studien strengte beispielsweise die Arbeitsgruppe um Chopra et al. (1994) an. Sie untersuchte die Wirkung von H-7 (200 µmol/L) an Bronchiolen von Ratten, die zuvor durch Carbachol (0,001 bis 50 µmol/L) induziert wurden. Durch die Anwesenheit von H-7 kam es zu einer Rechtsverschiebung der Carbachol-Dosis-Wirkungskurve, was darauf hinweist, dass höhere Konzentrationen von Carbachol erforderlich sind, um die gleiche Kontraktionskraft zu erzielen. Dies deutet auf eine reduzierte Empfindlichkeit der glatten Muskulatur hin und lässt

darauf schließen, dass H-7 die PKC-abhängigen Signalwege hemmt, was wiederum die Kontraktionskraft der Muskulatur abschwächt.

Einen weiteren Ansatz zur Untersuchung dieses Zusammenhangs verfolgten Uchida et al. (1994), in dem eine tonische Kontraktion durch 1 µmol/L Carbachol an der glatten Muskulatur einer Harnblase vom Schwein ausgelöst wurde. Die Inhibierung der induzierten Kontraktion erfolgte signifikant durch 10 und 30 µmol/L H-7. Vergleichbare Ergebnisse erzielte die Studiengruppe von Ruggieri und Braverman (2013) mit einer Versuchsreihe am Magen von Mäusen, unter der Verwendung vom PKC-Inhibitor Chelerythrin. Hier wurde die Wirkung von unter anderem Chelerythrin auf die durch Carbachol induzierte Kontraktion an Wildtyp-Mäusen sowie Mäusen ohne M₂- oder M₃-Rezeptor (sog. Knockout-Mäuse, M₂KO und M₃KO) untersucht. Dabei konnte die am M₃-muskarinergen-Rezeptor vermittelte Kontraktion im M₂KO-Stamm durch Chelerythrin (10 µmol/L) um 54 % signifikant verringert werden. Die Ergebnisse dieser Studien bestätigen die Wirkung von PKC-Inhibitoren wie H-7 und Chelerythrin auf die durch Carbachol induzierte Kontraktion der glatten Muskulatur. Beide Inhibitoren führten zu einer signifikanten Abschwächung der Kontraktionskraft, was die Rolle von PKC in der Modulation der glatten Muskelkontraktion unterstützt.

Die verfügbare Literatur zu dem Thema der Hemmung der Carbachol-induzierten Kontraktion im unteren Gastrointestinaltrakt durch die PKC-Inhibitoren H-7 und Chelerythrin im Organbad ist stark begrenzt. Dies weist auf eine bislang geringe wissenschaftliche Aufmerksamkeit hin. Um die vorliegende Arbeit im Kontext der bestehenden Forschung zu positionieren, wird im Folgenden ein Vergleich mit einer relevanten Studie angestellt.

In der Studie von Takeuchi et al. (2004) wurden, wie auch in der vorliegenden Arbeit, Experimente mit Colon-Präparaten der Darmlängsmuskulatur von Wistar-Ratten durchgeführt. Hierbei wurden Kraftmessungen vorgenommen, diese fanden abweichend zur vorliegenden Studie jedoch ohne die Anwendung eines Organbads statt. Die Behandlung im proximalen Colon mit 3 µmol/L Chelerythrin zeigte keine Inhibierung der Aktivität in Gegenwart von GTP und Carbachol. Bei einer Konzentration von 10 µmol/L Chelerythrin wurde eine leichte Inhibierung beobachtet, diese war jedoch nicht statistisch signifikant. Im Gegensatz dazu führte die Anwendung von 3 und 10 µmol/L Chelerythrin im distalen Colon zu einer signifikanten Reduktion der Aktivität. Bei einer Konzentration von 1 µmol/L Chelerythrin konnte hingegen keine Inhibierung festgestellt werden. Zusammenfassend stellten die Ergebnisse dar, dass Chelerythrin die durch GTP und Carbachol hervorgerufene Ca²⁺-Sensibilisierung im proximalen Colon signifikant stärker unterdrückte als im distalen Colon. Diese Ergebnisse

legen nahe, dass der Signalweg der PKC eine unterschiedlich starke Rolle bei der Regulation der Kontraktilität in den verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts spielt.

In der Gegenwärtigen Literatur werden, wie auch schon im Kapitel zur Rolle der ROCK in der glatten Muskulatur beschrieben, die Unterschiede der einzelnen Abschnitte des unteren Gastrointestinaltraktes auch in Bezug auf die PKC kaum thematisiert. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten nur wenige Unterschiede festgestellt werden. Die maximale durch Carbachol ausgelöste Kontraktionskraft wurde durch H-7 (5 $\mu\text{mol/L}$) im Duodenum und dem Ileum-Präparat annähernd gleich reduziert. Beim Colon blieb die Kontraktionskraft dagegen nach der Hinzugabe von H-7 fast unverändert, hier fand somit keine Hemmung statt. Dieses Ergebnis könnte durch die gewählte Konzentration von 5 $\mu\text{mol/L}$ des verwendeten Inhibitors H-7 erklärbar sein. Es wäre denkbar, dass eine Hemmung der Kontraktion möglicherweise durch eine höhere Konzentration von H-7 erreicht werden könnte.

Bei der Anwendung von Chelerythrin (10 $\mu\text{mol/L}$) reagierten die Darmsegmente des Duodenums und Ileums vergleichbar zum Versuch mit H-7. Die Reaktion des Colons stellte sich hier gegenteilig zur Versuchsreihe mit H-7 dar. In allen drei Fällen wurde eine signifikante Hemmung der Kontraktilität festgestellt. Die Reaktion der drei Darmsegmente zeigte hierbei keine wesentlichen Unterschiede in der Hemmung, wobei das Ileum-Segment eine minimal geringere Reduktion der Kontraktion aufwies. Die Ergebnisse legen nahe, dass die PKC im Duodenum, Ileum und Colon eine funktionelle Bedeutung hat und somit eine zentrale Rolle in der Regulation der Ca^{2+} -Sensitivierung einnimmt. Die beobachtete fehlende hemmende Wirkung von H-7 im Gegensatz zur signifikanten Beeinflussung der Colon-Aktivität durch Chelerythrin deutet darauf hin, dass weitere Forschungen zur Bedeutung der PKC in verschiedenen Darmsegmenten notwendig sind.

Es sollte auch in diesem Abschnitt beachtet werden, dass in der vorliegenden Arbeit kein gepaarter Vergleich durchgeführt wurde. Stattdessen wurden zahlreiche verschiedene Substanzen an unterschiedlichen Segmenten des unteren Gastrointestinaltraktes untersucht.

TAB. 12 STUDIEN ZUR GLATTEN MUSKULATUR BEI DER VERWENDUNG VON PKC-INHIBITOREN IM ORGANBAD

Gewebe	Spezies	Methode	Referenz
H-7			
Analschließmuskel	Ratte (<i>Sprague-Dawley, erw.</i>) Kaninchen (<i>Neuseeland</i>)	Organbad Western Blot	Fan et al. (2002)
Bronchiole	Ratte (<i>Wistar, männl.</i>)	Organbad	Chopra et al. (1994)
Lunge	Mensch	Organbad	Cortijo et al. (1997)
Harnblase Harnröhre	Kaninchen (<i>weiß, Neuseeland, weibl.</i>)	Organbad	Yoshida et al. (1992)
Aorta Harnblase	Kaninchen Kaninchen Mensch	Organbad	Yoshimura und Yamaguchi (1997)
Harnblase	Schwein	Organbad	Uchida et al. (1994)
Duodenum Ileum Colon	Ratte (<i>Wistar</i>)	Organbad	Vorliegende Arbeit
Chelerythrin			
Aorta	Ratte (<i>Sprague-Dawley, männl.</i>)	Organbad Western Blot	Baik et al. (2014)
Colon Duodenum	Maus (<i>Schweiz CD-1, männl.</i>)	Organbad Western Blot	González-Montelongo et al. (2010)
Aorta Vena cava	Ratte (<i>Sprague-Dawley, männl.</i>)	Organbad Western Blot Immunzytochemische Analyse	Tyckocki et al. (2015)
Aorta	Ratte (<i>Sprague-Dawley, männl.</i>)	Organbad Western Blot	Yu et al. (2015)
Ösophagus	Katze (<i>erw.</i>)	Organbad EFS	Park et al. (2010)
Magen	Maus (<i>wild, M₂KO und M₃KO</i>)	Organbad	Ruggieri und Braverman (2013)
Duodenum Ileum Colon	Ratte (<i>Wistar</i>)	Organbad	Vorliegende Arbeit

4.3.2 POTENZIELLE ZUKÜNFTIGE ROLLE VON PKC

In der Konklusion weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass der PKC-Signalweg eine zentrale Rolle bei der Regulation der gastrointestinalen Motilität im Duodenum, Ileum und Colon einnimmt. Zudem könnte ein PKC-Inhibitor als vielversprechender therapeutischer Ansatz zur Steuerung der Funktion der glatten Muskulatur dienen.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sowie aus der vorhandenen Literatur (siehe *Tab. 12*) zu PKC-Inhibitoren im Zusammenhang mit der glatten Muskulatur legen nahe, dass diese Wirkstoffe potenziell bei der Behandlung verschiedener Erkrankungen, wie Bluthochdruck, einer überaktiven Harnblase, Asthma oder anderer Atemwegserkrankungen sowie Darmmotilitätsstörungen, eingesetzt werden könnten. Ihre Fähigkeit, die kontraktile Aktivität der glatten Muskulatur zu modulieren, könnte sie zu vielversprechenden Optionen für therapeutische Interventionen machen.

Dem steht jedoch ein breites Nebenwirkungsprofil gegenüber. In der aktuellen Literatur sind keine spezifischen Angaben zur therapeutischen Anwendung von PKC-Inhibitoren in der glatten Muskulatur des unteren Gastrointestinaltraktes, die Einfluss auf die Motilität nehmen, zu finden. Dies ist vermutlich auf die ubiquitäre Verfügbarkeit dieses Enzyms im Organismus und das damit verbundene breite Nebenwirkungsprofil zurückzuführen. Die Entwicklung hochspezifischer und sicherer PKC-Inhibitoren bleibt mutmaßlich eine Herausforderung.

4.4 EFFEKT EINER BLOCKADE DER ROCK UND PKC AUF DIE KONTRAKTILITÄT DER GLATTEN MUSKULATUR DES UNTEREN GASTROINTESTINALTRAKTS

Die beiden Signalwege ROCK und PKC sind als entscheidende Regulatoren der Kontraktilität der glatten Muskulatur bekannt. Diese werden als Ca^{2+} -sensitivierende Signalwege bezeichnet, da sie ohne die typische Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Zellplasma der glatten Muskelzelle eine Kontraktion auslösen können. Die Blockade dieser Signalwege hat potenziell therapeutische Relevanz, da sie die übermäßige Kontraktion glatter Muskeln bei pathologischen Zuständen lindern könnte. Ziel der letzten Versuchsreihen war es, den additiven Effekt beider Hemmstoffe auf die Muskelkontraktionen zu analysieren und die zugrundeliegenden Mechanismen in den Abschnitten des unteren Gastrointestinaltraktes besser zu verstehen und zu differenzieren. Dies könnte neue Ansätze zur Behandlung von gastrointestinalen Funktionsstörungen eröffnen.

In den vorliegenden Experimenten erfolgte eine simultane Gabe des ROCK-Inhibitor Y-27632 (5 µmol/L) sowie der PKC-Inhibitoren H-7 (5 µmol/L) und Chelerythrin (10 µmol/L). Diese Versuchsreihen wurden ausschließlich am Colon durchgeführt. Die Messwerte der letzten Datenerhebungen zeigen, im Vergleich zu den Einzelversuchen mit den jeweiligen PKC- und ROCK-Inhibitoren, einen größeren inhibitorischen Effekt der absoluten sowie relativen gemessenen Kontraktionskräfte. Es ist naheliegend anzunehmen, dass die PKC und ROCK gleichzeitig ablaufen und somit parallel aktiviert werden können. Daraus ließe sich schlussfolgernd ein Synergieeffekt in der letzten Versuchsreihe der vorliegenden Arbeit ableiten, wobei alle drei eingesetzten Substanzen gemeinsam wirken und eine verstärkte Inhibierung der Muskelkontraktion auslösen können. Dieser Effekt wurde bereits in einer vorhandenen Studie am distalen Colon einer Ratte erzielt. In dieser wurde die Wirkung von Chelerythrin in Kombination mit Y-27632 untersucht, wobei ebenfalls eine additive Reaktion auf die GTP- und Carbachol-induzierte Ca^{2+} -Sensitivierung hervorgerufen wurde (Takeuchi et al. 2004).

Die Forschungsgruppe von Del González-Montelongo et al. (2019) untersuchte ebenfalls die synergistischen Effekte von PKC- und ROCK-Inhibitoren auf die glatte Muskulatur. Dazu wurden Arterien von Ratten präpariert. Die Versuche wurden mit den PKC-Inhibitoren Y-27632 (1 µmol/L) und GFX (0,5 µmol/L) sowie den ROCK-Inhibitoren Chelerythrin (5 µmol/L) und Fasudil (1 µmol/L) durchgeführt. Hierfür wurde das Präparat zunächst mit der Zugabe von 70 µmol/L K^+ induziert. Mit der Anwesenheit von Fasudil bzw. Y-27632 konnte eine Hemmung der Kontraktilität erreicht werden. Durch die additive Zugabe von Fasudil und Chelerythrin bzw. Y-27632 und GFX konnte die Forschungsgruppe eine signifikante Verringerung der gemessenen Kontraktionskraft beobachten. Del González-Montelongo et al. (2019) schließen daraus, dass auch bei der Behandlung von arteriellen Vasospasmen eine kombinierte Anwendung von ROCK- und PKC-Inhibitoren eine vielversprechende therapeutische Strategie darstellen könnte.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Regulation der glatten Muskulatur im unteren Gastrointestinaltrakt maßgeblich durch die Signalwege der ROCK und der PKC bestimmt werden, wobei keine eindeutige Dominanz bei einem dieser Signalwege festgestellt werden konnte. Da die beiden Enzyme beim Colon nur einen mäßigen Effekt zeigten, unterscheidet es sich offensichtlich vom Dünndarm, da dieser deutlich mehr PKC und ROCK innerviert. Weitere Forschung ist erforderlich, um die genauen Mechanismen und Wechselwirkungen zwischen diesen Signalwegen vollständig zu verstehen und in unterschiedlichen Abschnitten des unteren Gastrointestinaltraktes zu differenzieren.

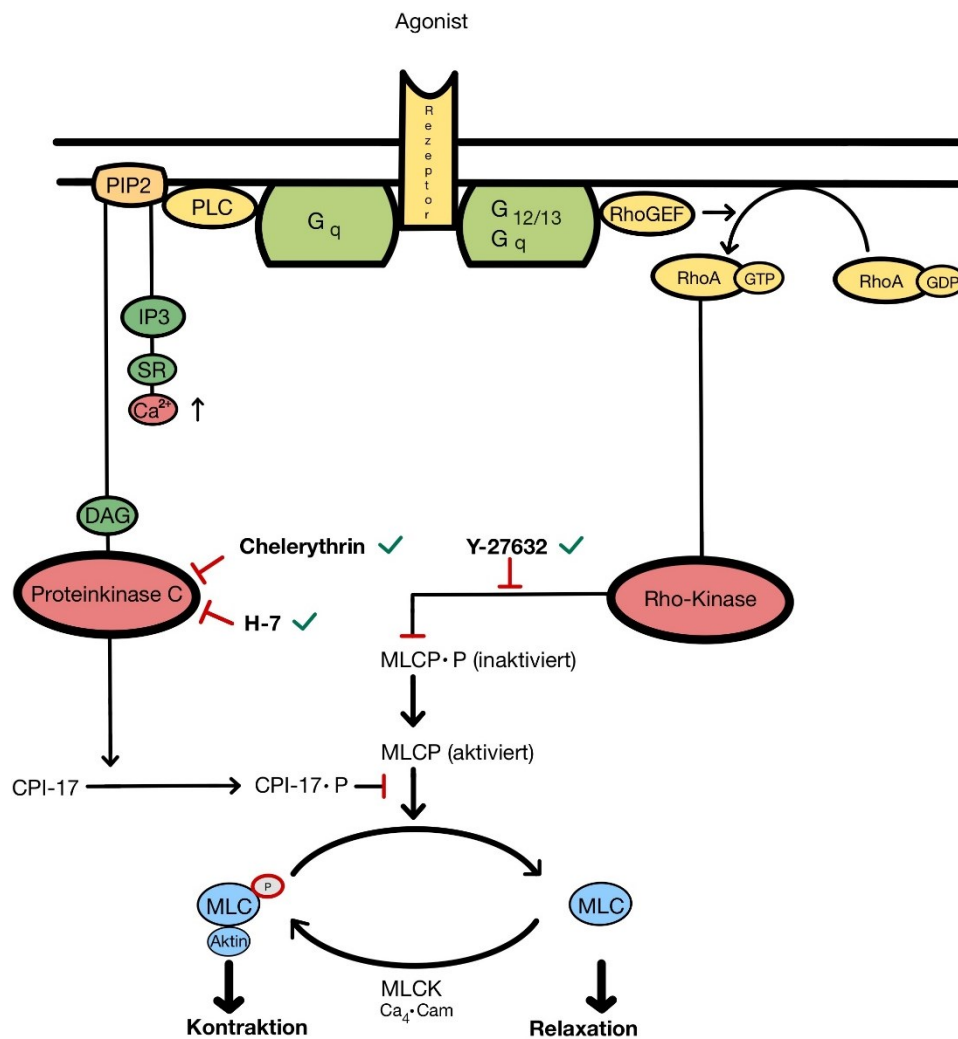


ABB. 23 SIGNALWEGE DER Ca^{2+} -SENSITIVIERUNG IN DER GLATTEN MUSKULATUR. In der vorliegenden Arbeit gelang es die Ca^{2+} -Sensitivierung mit Hilfe der PKC-Inhibitoren Chelerythrin und H-7, sowie des ROCK-Inhibitors Y-27632 zu inhibieren.

4.5 LIMITATIONEN

Jede wissenschaftliche Arbeit unterliegt bestimmten methodischen und konzeptionellen Einschränkungen, die die Interpretation und Generalisierbarkeit der Ergebnisse beeinflussen können (Döring 2023). Im Rahmen dieser Dissertation ist es daher essenziell, die Limitationen der angewandten Methoden kritisch zu reflektieren und mögliche Auswirkungen auf die Aussagekraft der gewonnenen Daten darzulegen.

Die in dieser Arbeit verwendete Organbadmethode ermöglicht eine detaillierte Untersuchung der Kontraktionskraft und Relaxation von Gewebeproben unter kontrollierten in-vitro-Bedingungen. Sie liefert primär funktionelle Daten zur Gewebekontraktilität und deren

pharmakologischer Modulation, erlaubt jedoch keine direkten Einblicke in die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen auf zellulärer und biochemischer Ebene.

Während pharmakologische Modulationen wichtige Hinweise auf die Beteiligung spezifischer Signalwege liefern können, bleibt der direkte Nachweis molekularer Veränderungen auf der Ebene der Gen- oder Proteinexpression aus. Zur weiteren Validierung und Ergänzung der funktionellen Daten hätte die Anwendung molekularbiologischer Techniken, wie der PCR-Methode oder auch dem Western Blot einen wichtigen Mehrwert darstellen können. Diese Methoden hätten die Möglichkeit geboten, die Expression relevanter Gene bzw. Proteine (VanGuilder et al. 2008; Mahmood und Yang 2012), beispielsweise solcher, die im Zusammenhang mit PKC oder ROCK stehen, zu quantifizieren. Zukünftige Studien sollten somit die Organbadmethode durch molekulare Analysetechniken ergänzen, um eine umfassendere Aufklärung der zugrunde liegenden Signalwege zu ermöglichen.

Ein weiterer kritischer Aspekt der vorliegenden Arbeit liegt in der Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen der PKC-Inhibitoren H-7 (5 $\mu\text{mol/L}$) und Chelerythrin (10 $\mu\text{mol/L}$), die im Colon zu variierenden Ergebnissen führten, während in den anderen Geweben wie dem Duodenum und Ileum vergleichbare Effekte beobachtet wurden. Die Anwendung von 5 $\mu\text{mol/L}$ H-7 könnte im Colon nicht ausreichend gewesen sein, um eine spezifische Hemmung von PKC zu erreichen. In Vorversuchen konnte H-7 mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/L}$ eine Hemmung der Konzentration auslösen. Ein möglicher Grund könnte sein, dass Chelerythrin eine stärkere Hemmwirkung auf PKC zeigt, während H-7 unspezifisch ist (Chopra et al. 1994) und auch andere Kinasen hemmen kann.

Schlussfolgernd zeigen diese Ergebnisse, dass die Wirkungen der beiden PKC-Inhibitoren nicht nur von ihrer Konzentration und Spezifität, sondern auch von gewebespezifischen Faktoren abhängen. Zukünftige Untersuchungen sollten daher die Inhibitoren in einer breiteren und standardisierten Konzentrationsreihe und unter Berücksichtigung der regionalen Unterschiede in der PKC-Signaltransduktion im Gastrointestinaltrakt testen.

Ein potenzieller methodischer Schwachpunkt dieser Arbeit liegt in der standardisierten Gewebepräparation mit einer einheitlichen Länge von ca. 1 cm sowie der ausschließlichen Untersuchung der Längsmuskulatur. Die glatte Muskulatur des Darms besteht aus einer Längs- und einer Ringmuskelschicht, die eng miteinander verbunden sind. Es ist folglich nicht möglich, ausschließlich die Aktivität der Längsmuskulatur zu messen, ohne dabei potenziell auch Beiträge der Ringmuskulatur oder anderer Gewebekomponenten zu erfassen. Diese Limitation schränkt die Aussagekraft der Ergebnisse hinsichtlich der spezifischen Rolle der

Längsmuskulatur ein. Zukünftige Studien könnten durch gezielte Methoden zur Trennung der Muskelschichten oder durch den Einsatz hochauflösender Bildgebungsverfahren die selektive Analyse der Längsmuskulatur weiter verbessern.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die glatte Muskulatur übernimmt die Regulation zahlreicher zentraler physiologischer Funktionen, darunter die Kontrolle des Blutdrucks, die Entleerung der Harnblase sowie die Motilität des Gastrointestinaltrakts. Dabei stellt die Ca^{2+} -Sensitivierung einen wesentlichen Mechanismus zur Regulation der Kontraktilität der glatten Muskulatur dar, bei dem die Kontraktionskraft unabhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -konzentration verstärkt wird. Dieser Prozess wird maßgeblich durch Signalwege, wie dem RhoA/ROCK- und PKC/CPI-17-Weg, vermittelt, die durch Hemmung der MLCP eine erhöhte Phosphorylierung der MLC fördern.

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der Enzyme PKC und ROCK bei der Carbachol-induzierten Kontraktion zu untersuchen und mögliche Unterschiede in drei Darmabschnitten des unteren Gastrointestinaltraktes zu analysieren. Hierfür wurden mit Hilfe der Organbadmethode pharmakologische Tests mit dem ROCK-Blocker Y-27632 (5 $\mu\text{mol/L}$) sowie den PKC-Inhibitoren H-7 (5 $\mu\text{mol/L}$) und Chelerythrin (10 $\mu\text{mol/L}$) am Duodenum-, Ileum- und Colon-Segment der Wistar-Ratte durchgeführt. Der zu untersuchende Parameter war die maximal ausgelöste Kontraktionskraft.

Die Ergebnisse zeigten, dass Y-27632 (5 $\mu\text{mol/L}$) in allen untersuchten Darmsegmenten eine signifikante Verringerung der durch Carbachol ausgelösten Kontraktionskraft erzielen konnte. Gleiches ließ sich durch den PKC-Inhibitor Chelerythrin feststellen. Im Unterschied dazu konnte der PKC-Inhibitor H-7 nur am Duodenum und Ileum eine signifikante Reduktion, der durch Carbachol induzierten Kraft, erzielen. Eine Wirkung am Colon blieb aus. Des Weiteren löste die simultane Verwendung aller drei Inhibitoren einen synergetischen Effekt am Colon-Segment aus.

Abschließend deuten die Ergebnisse der vorliegenden Studie stark darauf hin, dass sowohl der PKC- als auch der ROCK-Signalweg unabhängig voneinander die durch Aktivierung muskarinerger Rezeptoren mittels Carbachol induzierte Ca^{2+} -Sensibilisierung im Duodenum, Ileum und Colon verantwortlich ist. Wobei der Dünndarm in den Versuchen deutlich mehr PKC und ROCK innerviert. Weitere Forschung ist erforderlich, um die genaue Rolle der ROCK und PKC bei der Motilität des unteren Gastrointestinaltraktes besser verstehen zu können und mögliche Unterschiede zu untersuchen.

VI. THESEN

1. Die Motilität des unteren Gastrointestinaltraktes wird durch eine phasisch-rhythmische Spontanaktivität geprägt und bildet so die Grundlage für verschiedene Bewegungsmuster des Dün- und Dickdarms, die sowohl zur Durchmischung als auch zum Weitertransport des Darminhaltes führen.
2. Ein multizelluläres Netzwerk aus Cajal-Zellen (ICC) und glatten Muskelzellen bilden die zelluläre und elektrophysiologische Grundlage für die koordinierte Motilität.
3. Die Kontraktions- und Relaxationsreaktionen glatter Muskulatur lassen sich mithilfe der Organbadmethode quantifizieren. Als maximale Kontraktionskraft nach Applikation der jeweiligen Prüfsubstanz wird jeweils die höchste gemessene Kraft in mN herangezogen.
4. Die Calciumsensitivierung kann in der glatten Muskulatur über die Signalwege der PKC und ROCK ausgelöst werden.
5. Die parasympathische Stimulation der glatten Muskulatur mittels Carbachol bewirkte einen Anstieg der Kontraktionskraft. Es konnte zudem gezeigt werden, dass dies dosisabhängig ist.
 - a. Die PKC Inhibitoren Chelerythrin und H-7 verringern die durch Carbachol induzierte Kontraktionskraft, heben sie aber nicht vollständig auf.
 - b. Der ROCK Inhibitor Y-27632 verringert die durch Carbachol induzierte Kontraktionskraft, hebt sie aber nicht vollständig auf.
 - c. Die simultane Gabe von Chelerythrin, H-7 und Y-27632 führte im Colon-Segment zu einem synergistischen Effekt.
6. Durch die PKC und ROCK-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass die Calciumsensitivierung einen Einfluss auf die durch Carbachol induzierte Kontraktion nimmt. Wesentliche Unterschiede zwischen dem Duodenum, distalem Ileum und proximalem Colon konnten nicht festgestellt werden.
7. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass die PKC- und ROCK Inhibitoren ein möglicher Ansatzpunkt bei Motilitätsstörungen des unteren GIT darstellen könnten.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abe, Kohtaro; Shimokawa, Hiroaki; Morikawa, Keiko; Uwatoku, Toyokazu; Oi, Keiji; Matsumoto, Yasuharu et al. (2004): Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats. In: *Circulation research* 94 (3), S. 385–393. DOI: 10.1161/01.RES.0000111804.34509.94.
- Akata, Takashi (2007): Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺-dependent regulation of vascular tone. In: *Journal of anesthesia* 21 (2), S. 220–231. DOI: 10.1007/s00540-006-0487-5.
- Ali, Irshad; Sarna, Sushil K. (2002): Selective modulation of PKC isozymes by inflammation in canine colonic circular muscle cells. In: *Gastroenterology* 122 (2), S. 483–494. DOI: 10.1053/gast.2002.31215.
- Allescher, Hans-Dieter (2020): Einführung: Allgemeine Grundlagen der gastrointestinalen Motilität. In: *Management der gastrointestinalen und kolorektalen Motilitätsstörungen*, S. XIX–XXXII. Online verfügbar unter <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/9783110643633-202/html>.
- Amano, Mutsuki; Nakayama, Masanori; Kaibuchi, Kozo (2010): Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. In: *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 67 (9), S. 545–554. DOI: 10.1002/cm.20472.
- Anderson, Charles D.; Kendig, Derek M.; Al-Qudah, Mohammad; Mahavadi, Sunila; Murthy, Karnam S.; Grider, John R. (2014): Role of various kinases in muscarinic M3 receptor-mediated contraction of longitudinal muscle of rat colon. In: *Journal of smooth muscle research = Nihon Heikatsukin Gakkai kikanishi* 50, S. 103–119. DOI: 10.1540/jsmr.50.103.
- Andrea, J. E.; Walsh, M. P. (1992): Protein kinase C of smooth muscle. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 20 (5), S. 585–595. DOI: 10.1161/01.HYP.20.5.585.
- Baik, Jiseok; Ok, Seong-Ho; Cho, Hyunhoo; Yu, Jongsun; Kim, Woochan; Nam, In-Koo et al. (2014): Dexmedetomidine-induced contraction involves phosphorylation of caldesmon by JNK in endothelium-denuded rat aortas. In: *International journal of biological sciences* 10 (10), S. 1108–1115. DOI: 10.7150/ijbs.9797.

- Baker, Salah A.; Karwa, Manushri; Lee, Ji Yeon; Riar, Sarah; Drumm, Bernard T.; Sanders, Kenton M. (2025): Ca^{2+} signaling in myenteric interstitial cells of Cajal (ICC-MY) and their role as conditional pacemakers in the colon. In: *Cell calcium* 125, S. 102990. DOI: 10.1016/j.ceca.2024.102990.
- Bayguinov, O.; Dwyer, L.; Kim, H.; Marklew, A.; Sanders, K. M.; Koh, S. D. (2011): Contribution of Rho-kinase to membrane excitability of murine colonic smooth muscle. In: *British journal of pharmacology* 163 (3), S. 638–648. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01241.x.
- Beech, D. J. (1997): Actions of neurotransmitters and other messengers on Ca^{2+} channels and K^{+} channels in smooth muscle cells. In: *Pharmacology & therapeutics* 73 (2), S. 91–119. DOI: 10.1016/s0163-7258(97)87271-3.
- Behrends, Jan (2021): Vegetatives Nervensystem. In: Jan Behrends, Josef Bischofberger, Rainer Deutzmann, Heimo Ehmke, Stephan Frings, Stephan Grissmer et al. (Hg.): *Duale Reihe Physiologie*. 4., unveränderte Auflage: Thieme. Online verfügbar unter https://eref.thieme.de/ebooks/cs_13687541#ebook_cs_13687541_cs13705.
- Berridge, M. J.; Bootman, M. D.; Lipp, P. (1998): Calcium - a life and death signal. In: *Nature* 395 (6703), S. 645–648. DOI: 10.1038/27094.
- Berridge, Michael J.; Bootman, Martin D.; Roderick, H. Llewelyn (2003): Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 4 (7), S. 517–529. DOI: 10.1038/nrm1155.
- Blair, Peter J.; Rhee, Poong-Lyul; Sanders, Kenton M.; Ward, Sean M. (2014): The significance of interstitial cells in neurogastroenterology. In: *Journal of Neurogastroenterology and Motility* 20 (3), S. 294–317. DOI: 10.5056/jnm14060.
- Bolton, T. B.; Prestwich, S. A.; Zholos, A. V.; Gordienko, D. V. (1999): Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. In: *Annual Review of Physiology* 61 (Volume 61, 1999), S. 85–115. DOI: 10.1146/annurev.physiol.61.1.85.
- Bootman, Martin D.; Berridge, Michael J.; Roderick, H. Llewelyn (2002): Activating calcium release through inositol 1,4,5-trisphosphate receptors without inositol 1,4,5-trisphosphate. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (11), S. 7320–7322. DOI: 10.1073/pnas.132254299.

- Borysova, Lyudmyla; Shabir, S.; Walsh, Michael P.; Burdyga, Theodor (2011): The importance of Rho-associated kinase-induced Ca²⁺ sensitization as a component of electromechanical and pharmacomechanical coupling in rat ureteric smooth muscle. In: *Cell calcium* 50 (4), S. 393–405. DOI: 10.1016/j.ceca.2011.07.003.
- Burns, A. J.; Herbert, T. M.; Ward, S. M.; Sanders, K. M. (1997): Interstitial cells of Cajal in the guinea-pig gastrointestinal tract as revealed by c-Kit immunohistochemistry. In: *Cell and tissue research* 290 (1), S. 11–20. DOI: 10.1007/s004410050902.
- Bynagari-Settipalli, Yamini S.; Chari, Ramya; Kilpatrick, Laurie; Kunapulli, Satya P. (2010): Protein Kinase C - Possible Therapeutic Target to Treat Cardiovascular Diseases. In: *Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets* (10:3).
- Cernecka, Hana; Kersten, Kim; Maarsingh, Harm; Elzinga, Carolina R.; Jong, Igle Jan de; Korstanje, Cees et al. (2015): β 3-Adrenoceptor-mediated relaxation of rat and human urinary bladder: roles of BKCa channels and Rho kinase. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 388 (7), S. 749–759. DOI: 10.1007/s00210-015-1128-z.
- Chanpong, Atchariya; Borrelli, Osvaldo; Thapar, Nikhil (2022): Recent advances in understanding the roles of the enteric nervous system. In: *Faculty reviews* 11, S. 7. DOI: 10.12703/r/11-7.
- Chopra, L. C.; Twort, C. H.; Ward, J. P. (1994): Differences in sensitivity to the specific protein kinase C inhibitor Ro31-8220 between small and large bronchioles of the rat. In: *British journal of pharmacology* 113 (4), S. 1237–1242. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1994.tb17130.x.
- Clarke, Margaret; Dodson, Paul M. (2007): PKC inhibition and diabetic microvascular complications. In: *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 21 (4), S. 573–586. DOI: 10.1016/j.beem.2007.09.007.
- Cortijo, J.; Villagrasa, V.; Martí-Cabrera, M.; Villar, V.; Moreau, J.; Advenier, C. et al. (1997): The spasmogenic effects of vanadate in human isolated bronchus. In: *British journal of pharmacology* 121 (7), S. 1339–1349. DOI: 10.1038/sj.bjp.0701277.
- Davies, S. P.; Reddy, H.; Caivano, M.; Cohen, P. (2000): Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. In: *The Biochemical journal* 351 (Pt 1), S. 95–105. DOI: 10.1042/0264-6021:3510095.

- Del González-Montelongo, María Carmen; Porras-González, Cristina; González-Montelongo, Rafaela; Revilla-González, Gonzalo; Pastor, María Dolores; Castellano, Antonio; Ureña, Juan (2019): PKC α -Mediated Downregulation of RhoA Activity in Depolarized Vascular Smooth Muscle: Synergistic Vasorelaxant Effect of PKC α and ROCK Inhibition. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 52 (1), S. 76–93. DOI: 10.33594/0000000006.
- Deloose, Eveline; Janssen, Pieter; Depoortere, Inge; Tack, Jan (2012): The migrating motor complex: control mechanisms and its role in health and disease. In: *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 9 (5), S. 271–285. DOI: 10.1038/nrgastro.2012.57.
- Döring, Nicola (2023): Forschungsmethoden und Evaluation in den Sozial- und Humanwissenschaften. 6., vollständig überarbeitete, aktualisierte und erweiterte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer (Lehrbuch). Online verfügbar unter <http://www.springer.com/>.
- Durlu-Kandilci, N. Tugba; Brading, Alison F. (2006): Involvement of Rho kinase and protein kinase C in carbachol-induced calcium sensitization in beta-escin skinned rat and guinea-pig bladders. In: *British journal of pharmacology* 148 (3), S. 376–384. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706723.
- Erickson, Jonathan C.; Obioha, Chibuike; Goodale, Adam; Bradshaw, L. Alan; Richards, William O. (2009): Detection of small bowel slow-wave frequencies from noninvasive biomagnetic measurements. In: *IEEE transactions on bio-medical engineering* 56 (9), S. 2181–2189. DOI: 10.1109/TBME.2009.2024087.
- Fan, Ya-Ping; Puri, Rajinder N.; Rattan, Satish (2002): Animal model for angiotensin II effects in the internal anal sphincter smooth muscle: mechanism of action. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 282 (3), G461-9. DOI: 10.1152/ajpgi.00207.2001.
- Fisher, Steven A. (2010): Vascular smooth muscle phenotypic diversity and function. In: *Physiological genomics* 42A (3), S. 169–187. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00111.2010.
- Frei, Eva; Huster, Maria; Smital, Petra; Schlossmann, Jens; Hofmann, Franz; Wegener, Jörg W. (2009): Calcium-dependent and calcium-independent inhibition of contraction by cGMP/cGKI in intestinal smooth muscle. In: *American journal of physiology*.

Gastrointestinal and liver physiology 297 (4), G834-9. DOI: 10.1152/ajpgi.00095.2009.

Fujita, Hiroshi; Fukumoto, Yoshihiro; Saji, Kenya; Sugimura, Koichiro; Demachi, Jun; Nawata, Jun; Shimokawa, Hiroaki (2010): Acute vasodilator effects of inhaled fasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, in patients with pulmonary arterial hypertension. In: *Heart and vessels* 25 (2), S. 144–149. DOI: 10.1007/s00380-009-1176-8.

Fukumoto, Y.; Matoba, T.; Ito, A.; Tanaka, H.; Kishi, T.; Hayashidani, S. et al. (2005): Acute vasodilator effects of a Rho-kinase inhibitor, fasudil, in patients with severe pulmonary hypertension. In: *Heart (British Cardiac Society)* 91 (3), S. 391–392. DOI: 10.1136/hrt.2003.029470.

Gastreich-Seelig, Mirko; Jimenez, Marcel; Pouokam, Ervice (2020): Mechanisms Associated to Nitroxyl (HNO)-Induced Relaxation in the Intestinal Smooth Muscle. In: *Frontiers in physiology* 11, S. 438. DOI: 10.3389/fphys.2020.00438.

Gekle, Michael (2023): Funktion des Magen-Darm-Trakts, Energiehaushalt und Ernährung. In: Rainer Klinke, Markus Bleich, Andreas Draguhn, Heimo Ehmke und Dominique Singer: Physiologie. 10., vollständig überarbeitete Auflage. Hg. v. Hans-Christian Pape, Armin Kurtz und Stefan Silbernagl. Unter Mitarbeit von Rüdiger Gay und Astried Rothenburger. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, S. 504–604, zuletzt geprüft am 19.10.2024.

González-Montelongo, María C.; Marín, Raquel; Gómez, Tomás; Marrero-Alonso, Jorge; Díaz, Mario (2010): Androgens induce nongenomic stimulation of colonic contractile activity through induction of calcium sensitization and phosphorylation of LC20 and CPI-17. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 24 (5), S. 1007–1023. DOI: 10.1210/me.2009-0472.

Gupta, Vivek; Gupta, Nilesh; Shaik, Imam H.; Mehvar, Reza; McMurtry, Ivan F.; Oka, Masahiko et al. (2013): Liposomal fasudil, a rho-kinase inhibitor, for prolonged pulmonary preferential vasodilation in pulmonary arterial hypertension. In: *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 167 (2), S. 189–199. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.01.011.

Hanson, Shawn F. L.; Terry, Michael H.; Moretta, Dafne T.; Power, Gordon G.; Wilson, Sean M.; Alam, Farzana et al. (2018): Inhaled Fasudil Lacks Pulmonary Selectivity in Thromboxane-Induced Acute Pulmonary Hypertension in Newborn Lambs. In:

Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics 23 (5), S. 472–480.
DOI: 10.1177/1074248418772814.

Heidt, Peter J.; Rusch, Volker; van der Waaij, Dirk (1997): THE STIMULATORY INFLUENCE OF THE INTESTINAL MICROFLORA ON GASTRO-INTESTINAL MOTILITY AND MYOELECTRIC ACTIVITY OF SMALL INTESTINE. Seminar Monograph 9: Gastro-intestinal motility. Ullevål University of Oslo, Oslo. Department of Medicine.

Hein, Lutz; Fischer, Jens W. (2020): Taschenatlas Pharmakologie. 178 Farbtafeln. 8., überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag (Pharmakologie in Text und Bild).

Heinrich, Peter C.; Müller, Matthias; Graeve, Lutz; Koch, Hans-Georg; Löffler, Georg; Petrides, Petro E. (Hg.) (2022): Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Verlag GmbH. 10., vollständig überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer (Lehrbuch).

Herbert, J. M.; Augereau, J. M.; Gleye, J.; Maffrand, J. P. (1990): Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. In: *Biochemical and biophysical research communications* 172 (3), S. 993–999. DOI: 10.1016/0006-291x(90)91544-3.

Herbert, M. K.; Holzer, P. (2009): Therapie der gestörten Magen-Darm-Motilität bei Intensivpatienten. In: *Anästh Intensivmed* (50), 602-616.

Hisatsune, Chihiro; Nakamura, Kyoko; Kuroda, Yukiko; Nakamura, Takeshi; Mikoshiba, Katsuhiko (2005): Amplification of Ca²⁺ signaling by diacylglycerol-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (12), S. 11723–11730. DOI: 10.1074/jbc.M409535200.

Huppelsberg, Jens; Walter, Kerstin (2013): Kurzlehrbuch Physiologie. 4., aktualisierte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

Huxley, A. F. (1957): Muscle Structure and Theories of Contraction. In: *Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry* 7, S. 255–318. DOI: 10.1016/S0096-4174(18)30128-8.

Ihara, Eikichi; Moffat, Lori; Ostrander, Janina; Walsh, Michael P.; MacDonald, Justin A. (2007): Characterization of protein kinase pathways responsible for Ca²⁺ sensitization in rat ileal longitudinal smooth muscle. In: *American journal of*

- physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 293 (4), G699-710. DOI: 10.1152/ajpgi.00214.2007.
- Iizuka, K.; Shimizu, Y.; Tsukagoshi, H.; Yoshii, A.; Harada, T.; Dobashi, K. et al. (2000): Evaluation of Y-27632, a rho-kinase inhibitor, as a bronchodilator in guinea pigs. In: *European journal of pharmacology* 406 (2), S. 273–279. DOI: 10.1016/S0014-2999(00)00504-5.
- Ikebe, M.; Hartshorne, D. J.; Elzinga, M. (1987): Phosphorylation of the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin by the calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. Phosphorylation sites and effects of phosphorylation. In: *Journal of Biological Chemistry* 262 (20), S. 9569–9573. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)47971-9.
- Ishizaki, T.; Uehata, M.; Tamechika, I.; Keel, J.; Nonomura, K.; Maekawa, M.; Narumiya, S. (2000): Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. In: *Molecular Pharmacology* 57 (5), S. 976–983.
- Kellow, J. E.; Borody, T. J.; Phillips, S. F.; Tucker, R. L.; Haddad, A. C. (1986): Human interdigestive motility: Variations in patterns from esophagus to colon. In: *Gastroenterology* 91 (2), S. 386–395. DOI: 10.1016/0016-5085(86)90573-1.
- Kirsch, J.; Schulte, E.; vormals beteiligt: Schmitz, F. (2024): Rumpfdarm - Ösophagus und Gastrointestinaltrakt. In: *Duale Reihe Anatomie. Unter Mitarbeit von Gerhard Aumüller, Gabriela Aust, Jürgen Engele, Giovanni Maio und Joachim Kirsch*. 6. Auflage: Georg Thieme Verlag KG, S. 662–719. Online verfügbar unter <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:24-epflicht-3157913>, zuletzt geprüft am 07.10.2024.
- Kirschstein, Timo; Protzel, Chris; Porath, Katrin; Sellmann, Tina; Köhling, Rüdiger; Hakenberg, Oliver W. (2014): Age-dependent contribution of Rho kinase in carbachol-induced contraction of human detrusor smooth muscle in vitro. In: *Acta pharmacologica Sinica* 35 (1), S. 74–81. DOI: 10.1038/aps.2013.126.
- Kitazawa, Toshio; Eto, Masumi; Woodsome, Terence P.; Khalequzzaman, Md (2003): Phosphorylation of the myosin phosphatase targeting subunit and CPI-17 during Ca²⁺ sensitization in rabbit smooth muscle. In: *The Journal of physiology* 546 (Pt 3), S. 879–889. DOI: 10.1113/jphysiol.2002.029306.

- Körber, Jürgen; Hoffmann, Wilfried (2022): Rehabilitation bei Vorliegen einer Harn-und/oder Stuhlinkontinenz. In: Kompendium Internistische Onkologie: Standards in Diagnostik und Therapie: Springer, S. 1–6.
- Kraft, Theresia; Brenner, Bernhard (2023): Muskulatur. Unter Mitarbeit von Rüdiger Gay und Astried Rothenburger. In: Rainer Klinke, Markus Bleich, Andreas Draguhn, Heimo Ehmke und Dominique Singer: Physiologie. 10., vollständig überarbeitete Auflage. Hg. v. Hans-Christian Pape, Armin Kurtz und Stefan Silbernagl. Unter Mitarbeit von Rüdiger Gay und Astried Rothenburger. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, S. 141–179.
- Lee, M. R.; Li, L.; Kitazawa, T. (1997): Cyclic GMP causes Ca²⁺ desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (8), S. 5063–5068. DOI: 10.1074/jbc.272.8.5063.
- Leipziger, Jens (2017): Verdauung. In: Jan C. Behrends, Josef Bischofberger, Rainer Deutzmann, Heimo Ehmke, Stephan Frings, Stephan Grissmer et al. (Hg.): Physiologie. 3., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe), S. 477–506.
- Lenzi, A.; Tuscano, D. (2004): Do Acetylcholinesterase Inhibitors Have a Role in Improving Cognitive Impairment in Patients with Schizophrenia? In: *International Journal of Pharmaceutical Medicine* (18), S. 139–148.
- Liao, Dong-Hua; Zhao, Jing-Bo; Gregersen, Hans (2009): Gastrointestinal tract modelling in health and disease. In: *World journal of gastroenterology* 15 (2), S. 169–176. DOI: 10.3748/wjg.15.169.
- Liu, W.S; Heckman, C.A (1998): The Sevenfold Way of PKC Regulation. In: *Cellular Signalling* 10 (8), S. 529–542. DOI: 10.1016/S0898-6568(98)00012-6.
- Liu, Zhongwei; Khalil, Raouf A. (2018): Evolving mechanisms of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease. In: *Biochemical pharmacology* 153, S. 91–122. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.02.012.
- Löhn, Matthias; Plettenburg, Oliver; Kannt, Aimo; Kohlmann, Markus; Hofmeister, Armin; Kadereit, Dieter et al. (2015): End-organ protection in hypertension by the novel and selective Rho-kinase inhibitor, SAR407899. In: *World journal of cardiology* 7 (1), S. 31–42. DOI: 10.4330/wjc.v7.i1.31.

- Lüllmann, Heinz; Mohr, Klaus; Wehling, Martin; Hein, Lutz (2016): Pharmakologie und Toxikologie. Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen : ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker. 18., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Mahmood, Tahrin; Yang, Ping-Chang (2012): Western blot: technique, theory, and trouble shooting. In: *North American journal of medical sciences* 4 (9), S. 429–434. DOI: 10.4103/1947-2714.100998.
- Martinsen, A.; Dessy, C.; Morel, N. (2014): Regulation of calcium channels in smooth muscle: new insights into the role of myosin light chain kinase. In: *Channels (Austin, Tex.)* 8 (5), S. 402–413. DOI: 10.4161/19336950.2014.950537.
- Masumoto, Akihiro; Mohri, Masahiro; Shimokawa, Hiroaki; Urakami, Lemmy; Usui, Makoto; Takeshita, Akira (2002): Suppression of coronary artery spasm by the Rho-kinase inhibitor fasudil in patients with vasospastic angina. In: *Circulation* 105 (13), S. 1545–1547. DOI: 10.1161/hc1002.105938.
- Matsui, T.; Takuwa, Y.; Johshita, H.; Yamashita, K.; Asano, T. (1991): Possible role of protein kinase C-dependent smooth muscle contraction in the pathogenesis of chronic cerebral vasospasm. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 11 (1), S. 143–149. DOI: 10.1038/jcbfm.1991.17.
- McCorry, Laurie Kelly (2007): Physiology of the autonomic nervous system. In: *American journal of pharmaceutical education* 71 (4), S. 78. DOI: 10.5688/aj710478.
- McDaniel, S. S.; Platoshyn, O.; Wang, J.; Yu, Y.; Sweeney, M.; Krick, S. et al. (2001): Capacitative Ca(2+) entry in agonist-induced pulmonary vasoconstriction. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 280 (5), L870-80. DOI: 10.1152/ajplung.2001.280.5.L870.
- Mizuno, Yusuke; Isotani, Eiji; Huang, Jian; Ding, Hailei; Stull, James T.; Kamm, Kristine E. (2008): Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle in vivo. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 295 (2), C358-64. DOI: 10.1152/ajpcell.90645.2007.
- Mohri, Masahiro; Shimokawa, Hiroaki; Hirakawa, Yoji; Masumoto, Akihiro; Takeshita, Akira (2003): Rho-kinase inhibition with intracoronary fasudil prevents myocardial

- ischemia in patients with coronary microvascular spasm. In: *Journal of the American College of Cardiology* 41 (1), S. 15–19. DOI: 10.1016/s0735-1097(02)02632-3.
- Murphy, Richard A.; Rembold, Christopher M. (2005): The latch-bridge hypothesis of smooth muscle contraction. In: *Canadian journal of physiology and pharmacology* 83 (10), S. 857–864. DOI: 10.1139/y05-090.
- Mutschler, Ernst; Geisslinger, Gerd; Menzel, Sabine; Gudermann, Thomas; Hinz, Burkhard; Ruth, Peter (2020): Mutschler Arzneimittelwirkungen. Pharmakologie - Klinische Pharmakologie - Toxikologie. 11., völlig neu bearbeitete Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Narumiya, Shuh; Ishizaki, Toshimasa; Ufhata, Masayoshi (2000): Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632. In: W. E. Balch, Channing J. Der und Alan Hall (Hg.): *Methods in Enzymology : Regulators and Effectors of Small GTPases - Part D: Rho Family*, Bd. 325: Academic Press, S. 273–284. Online verfügbar unter <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687900254499>.
- Oh, Jae-Hwan; You, Sung-Kyung; Hwang, Mi-Kyung; Ahn, Duck-Sun; Kwon, Seong-chun; Taggart, Michael J.; Lee, Young-Ho (2003): Inhibition of rho-associated kinase reduces MLC20 phosphorylation and contractility of intact myometrium and attenuates agonist-induced Ca²⁺ sensitization of force of permeabilized rat myometrium. In: *The Journal of veterinary medical science* 65 (1), S. 43–50. DOI: 10.1292/jvms.65.43.
- Ohno, Shigeo; Akita, Yoshiko; Hata, Akiko; Osada, Shin-Ichi; Kubo, Kyoko; Konno, Yasuhiko et al. (1991): Structural and functional diversities of a family of signal transducing protein kinases, protein kinase C family; two distinct classes of PKC, conventional cPKC and novel nPKC. In: *Advances in Enzyme Regulation* 31, S. 287–303. DOI: 10.1016/0065-2571(91)90018-H.
- Park, Sun Young; Shim, Jae Ho; Kim, Mina; Sun, Yih Hsiu; Kwak, Hyun Soo; Yan, Xiangmei et al. (2010): MLCK and PKC Involvements via Gi and Rho A Protein in Contraction by the Electrical Field Stimulation in Feline Esophageal Smooth Muscle. In: *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 14 (1), S. 29–35. DOI: 10.4196/kjpp.2010.14.1.29.

- Perrino, Brian A. (2016): Calcium Sensitization Mechanisms in Gastrointestinal Smooth Muscles. In: *Journal of Neurogastroenterology and Motility* 22 (2), S. 213–225. DOI: 10.5056/jnm15186.
- Pfitzer, G. (2019): Glatte Muskulatur. In: Ralf Brandes, Florian Lang und Robert F. Schmidt (Hg.): *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie : mit 850 Farbbildungen*. 32. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer Lehrbuch), S. 149–161.
- Pfitzer, G.; Sonntag-Bensch, D.; Brkic-Koric, D. (2001): Thiophosphorylation-induced Ca(2+) sensitization of guinea-pig ileum contractility is not mediated by Rho-associated kinase. In: *The Journal of physiology* 533 (Pt 3), S. 651–664. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2001.t01-2-00651.x.
- Pfitzer, Gabriele (2022): Die Muskulaturglatte Muskulatur. In: Heinrich, Peter C. and Müller, Matthias and Graeve, Lutz and Koch, Hans-Georg (Hg.): *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 1071–1086.
- Rae, M. G.; Fleming, N.; McGregor, D. B.; Sanders, K. M.; Keef, K. D. (1998): Control of motility patterns in the human colonic circular muscle layer by pacemaker activity. In: *Journal of Physiology* (510.1), S. 309–320.
- Ratz, Paul H.; Berg, Krystina M.; Urban, Nicole H.; Miner, Amy S. (2005): Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 288 (4), C769-83. DOI: 10.1152/ajpcell.00529.2004.
- Reho, John J.; Zheng, Xiaoxu; Fisher, Steven A. (2014): Smooth muscle contractile diversity in the control of regional circulations. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 306 (2), H163-72. DOI: 10.1152/ajpheart.00493.2013.
- Rembold, C. M. (1992): Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 20 (2), S. 129–137. DOI: 10.1161/01.hyp.20.2.129.
- Riento, Kirsi; Ridley, Anne J. (2003): Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 4 (6), S. 446–456. DOI: 10.1038/nrm1128.

- Roffel, Adriaan Frans (1990): Muscarinic receptor subtypes in airway smooth muscle: Binding, transduction, and function. University of Groningen, Groningen. University Medical Center Groningen.
- Ruggieri, Michael R.; Braverman, Alan S. (2013): Gastric body cholinergic contractile signal transduction in M2 and M3 receptor knockout mice. In: *Journal of receptor and signal transduction research* 33 (4), S. 249–254. DOI: 10.3109/10799893.2013.802803.
- Sakamoto, Kazuyuki; Hori, Masatoshi; Izumi, Masanori; Oka, Tatsuya; Kohama, Kazuhiro; Ozaki, Hiroshi; Karaki, Hideaki (2003): Inhibition of high K⁺-induced contraction by the ROCKs inhibitor Y-27632 in vascular smooth muscle: possible involvement of ROCKs in a signal transduction pathway. In: *Journal of pharmacological sciences* 92 (1), S. 56–69. DOI: 10.1254/jphs.92.56.
- Sanders, Kenton M.; Koh, Sang Don; Ward, Sean M. (2006): Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. In: *Annual Review of Physiology* 68 (Volume 68, 2006), S. 307–343. DOI: 10.1146/annurev.physiol.68.040504.094718.
- Sanders, Kenton M.; Santana, L. Fernando; Baker, Salah A. (2023): Interstitial cells of Cajal - pacemakers of the gastrointestinal tract. In: *The Journal of physiology*. DOI: 10.1113/JP284745.
- Sanders, Kenton M.; Ward, Sean M.; Koh, Sang Don (2014): Interstitial cells: regulators of smooth muscle function. In: *Physiological reviews* 94 (3), S. 859–907. DOI: 10.1152/physrev.00037.2013.
- Sarna, Sushil K. (2010): Colonic Motility: From Bench Side to Bedside. Morgan & Claypool Life Sciences. San Rafael (CA) (Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease).
- Schneider, Sabine; Wright, Christina M.; Heuckeroth, Robert O. (2019): Unexpected Roles for the Second Brain: Enteric Nervous System as Master Regulator of Bowel Function. In: *Annual Review of Physiology* 81, S. 235–259. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021317-121515.
- Shabir, S.; Borisova, L.; Wray, Susan; Burdyga, T. (2004): Rho-kinase inhibition and electromechanical coupling in rat and guinea-pig ureter smooth muscle: Ca²⁺-dependent and -independent mechanisms. In: *The Journal of physiology* 560 (Pt 3), S. 839–855. DOI: 10.1113/jphysiol.2004.070615.

- Somlyo, A. P.; Somlyo, A. V. (2000): Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. In: *The Journal of physiology* 522 Pt 2 (Pt 2), S. 177–185. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2000.t012-00177.x.
- Somlyo, Andrew P.; Somlyo, Avril V. (2003): Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. In: *Physiological reviews* 83 (4), S. 1325–1358. DOI: 10.1152/physrev.00023.2003.
- Staumont, Ghislain; Delvaux, Michel; Fioramonti, Jean; Berry, Pascal; Bueno, Lionel; Frexinos, Jacques (1992): Differences between jejunal myoelectric activity after a meal and during phase 2 of migrating motor complexes in healthy humans. In: *Digestive diseases and sciences* 37 (10), S. 1554–1561. DOI: 10.1007/BF01296502.
- Stehle, Peter; Ellinger, Sabine (2024): Funktionen des Gastrointestinaltraktes. In: Peter Stehle und Sabine Ellinger (Hg.): Einführung in die Humanernährung. Physiologische Grundlagen, Nährstoffe, Ernährungsformen. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum (Lehrbuch), S. 5–19. Online verfügbar unter https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-68399-6_2#citeas.
- Swärd, K.; Dreja, K.; Susnjar, M.; Hellstrand, P.; Hartshorne, D. J.; Walsh, M. P. (2000): Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca²⁺ sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum. In: *The Journal of physiology* 522 Pt 1 (Pt 1), S. 33–49. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2000.0033m.x.
- Takeuchi, Tadayoshi; Kushida, Masahiko; Hirayama, Nobue; Kitayama, Muneyoshi; Fujita, Akikazu; Hata, Fumiaki (2004): Mechanisms involved in carbachol-induced Ca(2+) sensitization of contractile elements in rat proximal and distal colon. In: *British journal of pharmacology* 142 (4), S. 657–666. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705820.
- Takeuchi, Tadayoshi; Nakajima, Hidemitsu; Hata, Fumiaki; Azuma, Yasu-Taka (2007): A minor role for Ca²⁺ sensitization in sustained contraction through activation of muscarinic receptor in circular muscle of rat distal colon. In: *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 454 (4), S. 565–574. DOI: 10.1007/s00424-007-0221-7.

- Tanahashi, Yasuyuki; Komori, Seiichi; Matsuyama, Hayato; Kitazawa, Takio; Unno, Toshihiro (2021): Functions of Muscarinic Receptor Subtypes in Gastrointestinal Smooth Muscle: A Review of Studies with Receptor-Knockout Mice. In: *International journal of molecular sciences* 22 (2). DOI: 10.3390/ijms22020926.
- Tykocki, Nathan R.; Wu, BinXi; Jackson, William F.; Watts, Stephanie W. (2015): Divergent signaling mechanisms for venous versus arterial contraction as revealed by endothelin-1. In: *Journal of vascular surgery* 62 (3), S. 721–733. DOI: 10.1016/j.jvs.2014.03.010.
- Uchida, W.; Masuda, N.; Shirai, Y.; Shibasaki, K.; Satoh, N.; Takenada, T. (1994): The role of extracellular Ca²⁺ in carbachol-induced tonic contraction of the pig detrusor smooth muscle. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 350 (4), S. 398–402. DOI: 10.1007/BF00178958.
- Uehata, M.; Ishizaki, T.; Satoh, H.; Ono, T.; Kawahara, T.; Morishita, T. et al. (1997): Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. In: *Nature* 389 (6654), S. 990–994. DOI: 10.1038/40187.
- VanGuilder, Heather D.; Vrana, Kent E.; Freeman, Willard M. (2008): Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. In: *BioTechniques* 44 (5), S. 619–626. DOI: 10.2144/000112776.
- Vaupel, Peter (2010): Funktionen des Magen-Darm-Trakts. In: Robert F. Schmidt, Florian Lang und Manfred Heckmann (Hg.): *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie*. 31., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Heidelberg: Springer (SpringerLink Bücher), S. 792–833.
- Vaupel, Peter; Jänig, Wilfrid (2019): Magen-Darm-Trakt. In: Ralf Brandes, Florian Lang und Robert F. Schmidt (Hg.): *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie : mit 850 Farabbildungen*. 32. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer Lehrbuch), S. 471–538.
- Ward, Sean M.; Sanders, Kenton M. (2001): Interstitial cells of Cajal: Primary targets of enteric motor innervation. In: *Anat. Rec.* 262 (1), S. 125–135. DOI: 10.1002/1097-0185(20010101)262:1<125::AID-AR1017>3.0.CO;2-I.
- Waterman, S. A.; Tonini, M.; Costa, M. (1994): The role of ascending excitatory and descending inhibitory pathways in peristalsis in the isolated guinea-pig small intestine. In: *The Journal of physiology* 481 (Pt 1) (Pt 1), S. 223–232. DOI: 10.1113/jphysiol.1994.sp020433.

- Webb, R. Clinton (2003): Smooth muscle contraction and relaxation. In: *Advances in physiology education* 27 (1-4), S. 201–206. DOI: 10.1152/advan.00025.2003.
- Wei, Lei; Surma, Michelle; Shi, Stephanie; Lambert-Cheatham, Nathan; Shi, Jianjian (2016): Novel Insights into the Roles of Rho Kinase in Cancer. In: *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 64 (4), S. 259–278. DOI: 10.1007/s00005-015-0382-6.
- Weller, Johannes (2016): Altersabhängige Adenosin-vermittelte Relaxation des Musculus detrusor vesicae der Ratte. Dissertation. Universität Rostock, Rostock. Oscar Langendorff Institut für Physiologie.
- Wibberley, Alexandra; Chen, Zunxuan; Hu, Erding; Hieble, J. Paul; Westfall, Timothy D. (2003): Expression and functional role of Rho-kinase in rat urinary bladder smooth muscle. In: *British journal of pharmacology* 138 (5), S. 757–766. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705109.
- Wynne, Brandi M.; Chiao, Chin-Wei; Webb, R. Clinton (2009): Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1. In: *Journal of the American Society of Hypertension : JASH* 3 (2), S. 84–95. DOI: 10.1016/j.jash.2008.09.002.
- Xia, C.; Bao, Z.; Yue, C.; Sanborn, B. M.; Liu, M. (2001): Phosphorylation and regulation of G-protein-activated phospholipase C-beta 3 by cGMP-dependent protein kinases. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (23), S. 19770–19777. DOI: 10.1074/jbc.M006266200.
- Xiao, Daliao; Longo, Lawrence D.; Zhang, Lubo (2005): Alpha1-adrenoceptor-mediated phosphorylation of MYPT-1 and CPI-17 in the uterine artery: role of ERK/PKC. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 288 (6), H2828–35. DOI: 10.1152/ajpheart.01189.2004.
- Yasuda, Yuto; Wang, Lu; Chitano, Pasquale; Seow, Chun Y. (2024): Rho-Kinase Inhibition of Active Force and Passive Tension in Airway Smooth Muscle: A Strategy for Treating Airway Hyperresponsiveness in Asthma. In: *Biology* 13 (2). DOI: 10.3390/biology13020115.
- Yoshida, M.; Nishi, K.; Machida, J.; Sakiyama, H.; Ikeda, K.; Ueda, S. (1992): Effects of phorbol ester on lower urinary tract smooth muscles in rabbits. In: *European journal of pharmacology* 222 (2-3), S. 205–211. DOI: 10.1016/0014-2999(92)90856-y.

- Yoshii, A.; Iizuka, K.; Dobashi, K.; Horie, T.; Harada, T.; Nakazawa, T.; Mori, M. (1999): Relaxation of contracted rabbit tracheal and human bronchial smooth muscle by Y-27632 through inhibition of Ca²⁺ sensitization. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 20 (6), S. 1190–1200. DOI: 10.1165/ajrcmb.20.6.3441.
- Yoshimura, Y.; Yamaguchi, O. (1997): Calcium independent contraction of bladder smooth muscle. In: *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* 4 (1), S. 62–67. DOI: 10.1111/j.1442-2042.1997.tb00142.x.
- Yu, Jongsun; Ok, Seong-Ho; Kim, Won Ho; Cho, Hyunhoo; Park, Jungchul; Shin, Il-Woo et al. (2015): Dexmedetomidine-Induced Contraction in the Isolated Endothelium-Denuded Rat Aorta Involves PKC- δ -mediated JNK Phosphorylation. In: *International journal of medical sciences* 12 (9), S. 727–736. DOI: 10.7150/ijms.11952.
- Zhang, Xiang; Zhang, Xueming; Wang, Saihua; Luo, Jun; Zhao, Zhihong; Zheng, Changzhu; Shen, Jieyan (2018): Effects of Fasudil on Patients with Pulmonary Hypertension Associated with Left Ventricular Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: A Prospective Intervention Study. In: *Canadian respiratory journal* 2018, S. 3148259. DOI: 10.1155/2018/3148259.

ANHANG

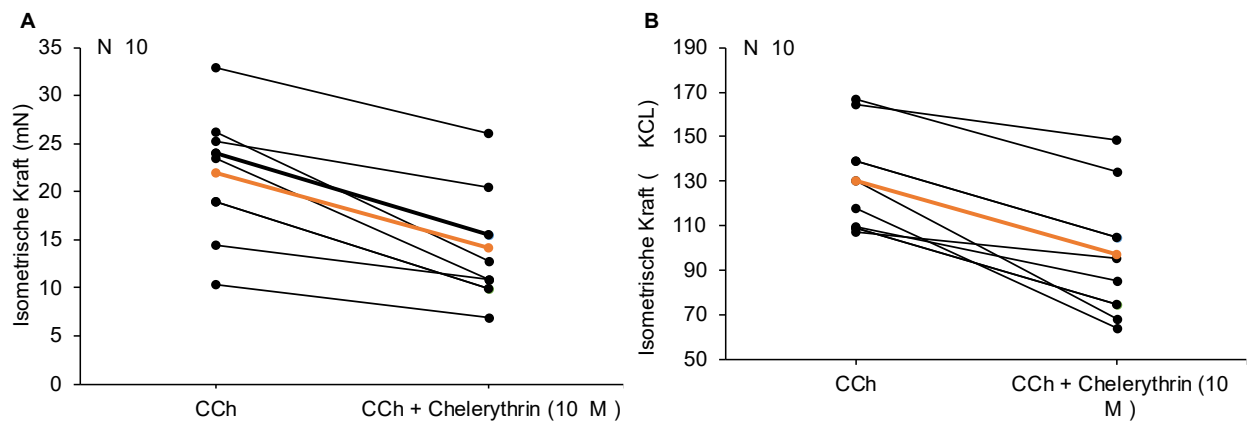


ABB. 24 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS CHELERYTHRIN (10 µMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 µMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN DUODENUM-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE. (A) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN, (B) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %. (orangefarbenes Punktepaa = Mittelwerte der Versuchsreihe)

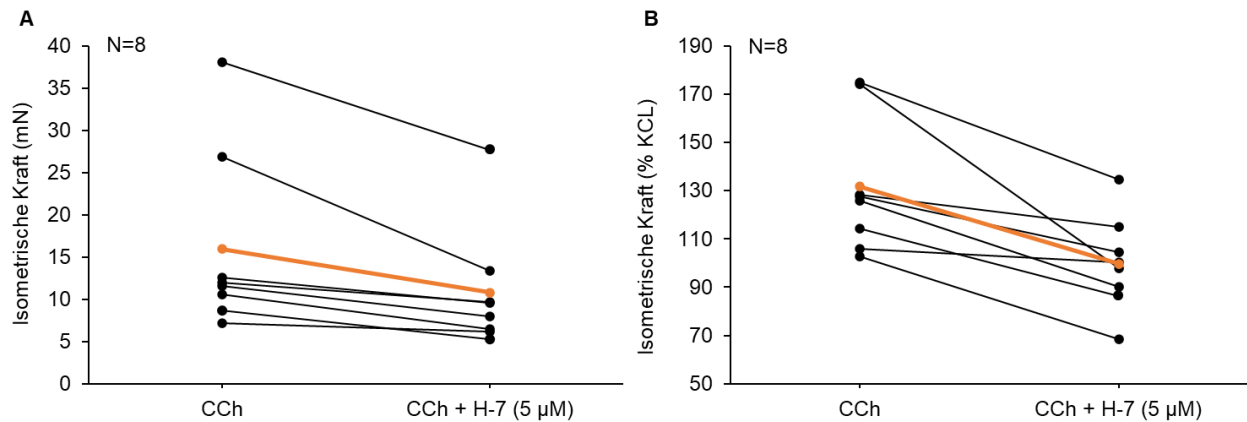


ABB. 25 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS H-7 (5 µMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 µMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN DUODENUM-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE. (A) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN, (B) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %. (orangefarbenes Punktepaa = Mittelwerte der Versuchsreihe)

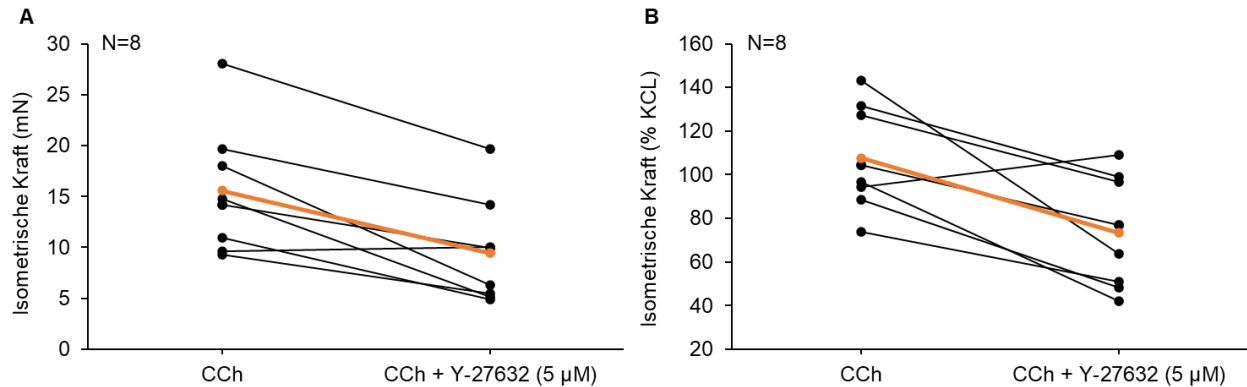


ABB. 26 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN RHO-KINASE-INHIBITORS Y-27632 (5 µMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 µMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN DUODENUM-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE. (A) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN, (B) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %. (orangefarbenes Punktepaar = Mittelwerte der Versuchsreihe)

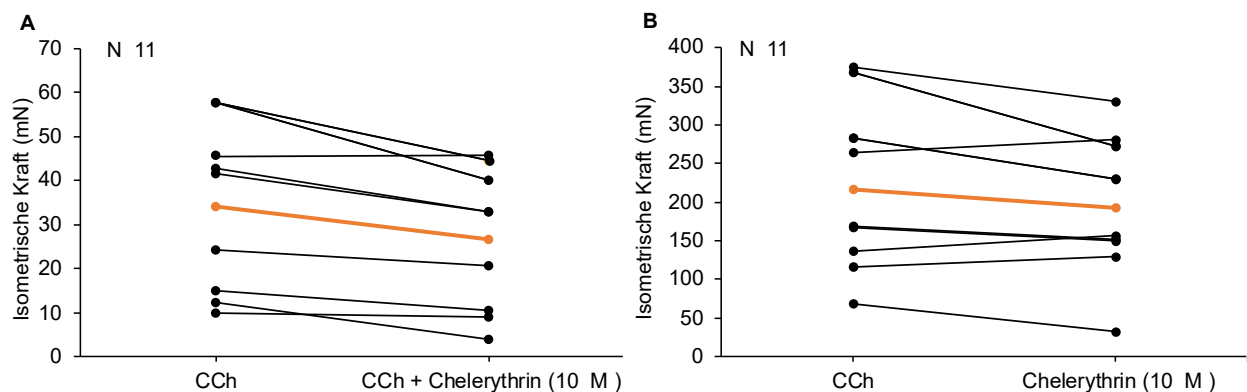


ABB. 27 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS CHELERYTHRIN (10 µMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 µMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AM COLON DER WISTAR-RATTE. (A) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN, (B) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %. (orangefarbenes Punktepaar = Mittelwerte der Versuchsreihe)

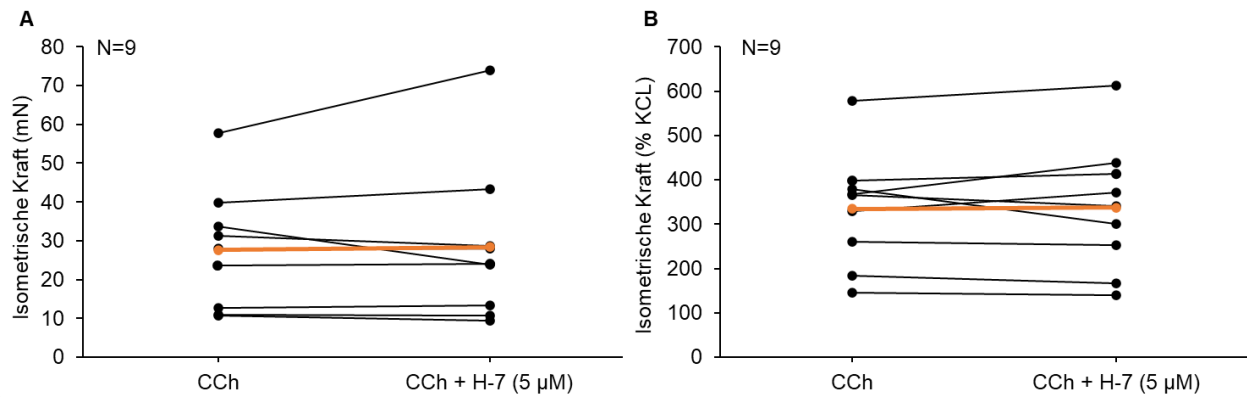


ABB. 28 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS H-7 (5 µMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 µMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN COLON-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE. (A) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN, (B) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %. (orangefarbenes Punktpaar = Mittelwerte der Versuchsreihe)

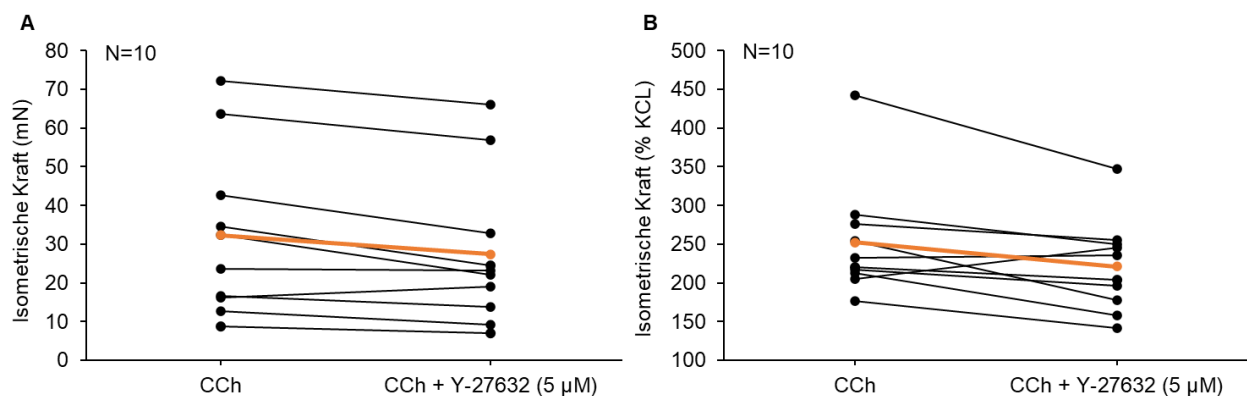


ABB. 29 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN RHO-KINASE-INHIBITORS Y-27632 (5 µMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 µMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN COLON-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE. (A) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN. (B) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %. (orangefarbenes Punktpaar = Mittelwerte der Versuchsreihe)

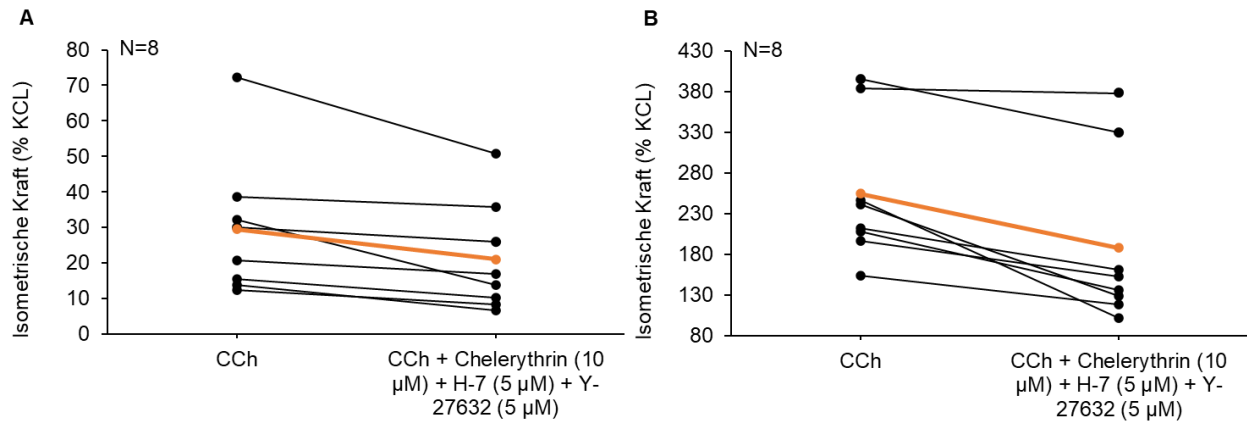


ABB. 30 WIRKUNG VON 3 INHIBITOREN: CHELERYTHRIN (10 μ MOL/L), H-7 (5 μ MOL/L), Y-27632 (5 μ MOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 μ MOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN COLON-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE. (A) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN. (B) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %. (orangefarbenes Punktepaar = Mittelwerte der Versuchsreihe)

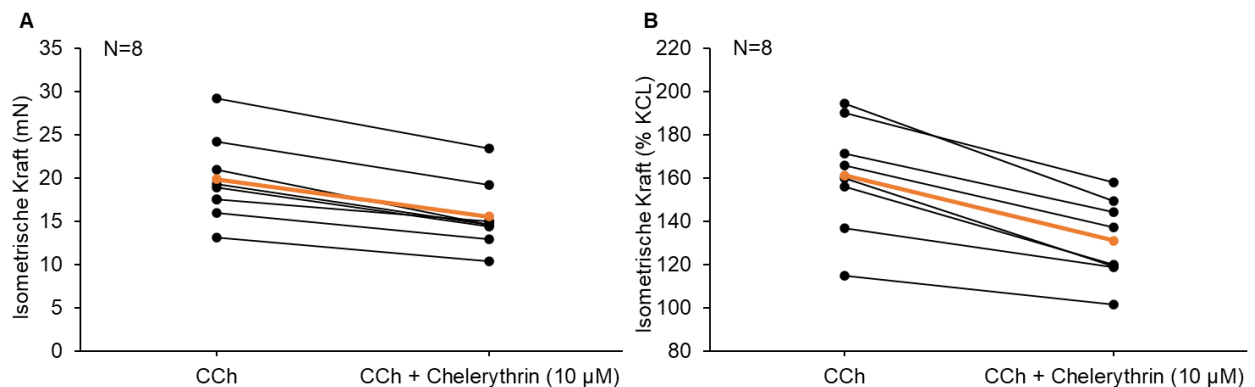


ABB. 31 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS CHELERYTHRIN (10 μ MOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 μ MOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AM ILEUM DER WISTAR-RATTE. (A) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN, (B) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %. (orangefarbenes Punktepaar = Mittelwerte der Versuchsreihe)

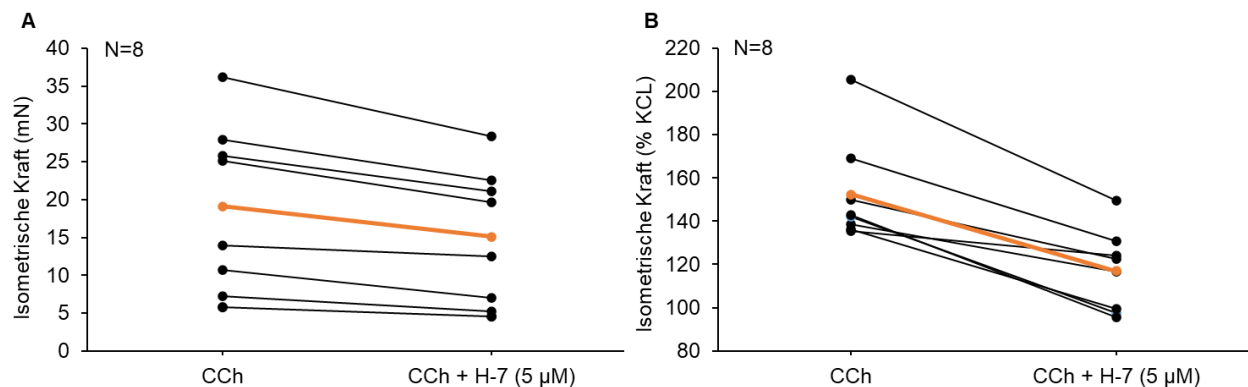


ABB. 32 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN PKC-INHIBITORS H-7 (5 µMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 µMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN ILEUM-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE. (A) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN, (B) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %. (orangefarbenes Punktpaar = Mittelwerte der Versuchsreihe)

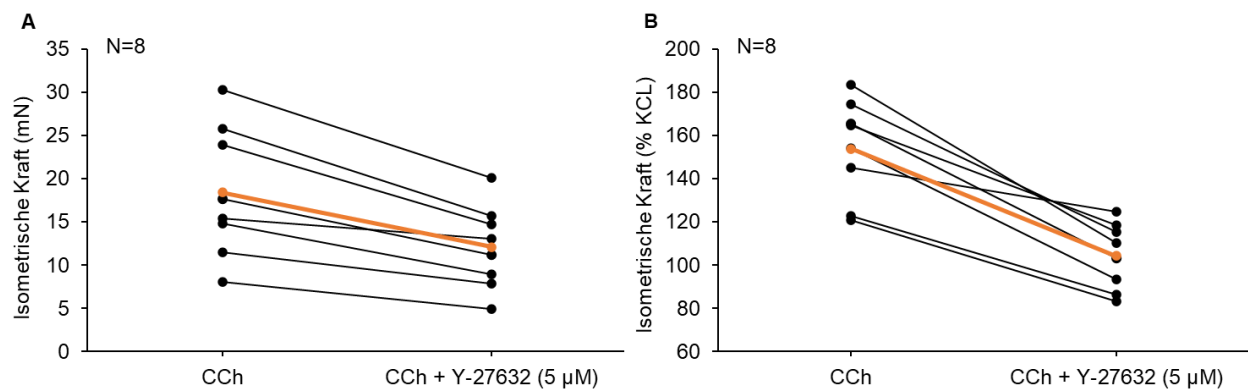


ABB. 33 WIRKUNG DES VORINKUBIERTEN RHO-KINASE-INHIBITORS Y-27632 (5 µMOL/L) AUF DIE DURCH CARBACHOL (10 µMOL/L) INDUZIERT ERHÖHUNG DER ISOMETRISCHEN KONTRAKTION AN ILEUM-SEGMENTEN DER WISTAR-RATTE. (A) Darstellung der absoluten isometrischen Kraft in mN, (B) Darstellung der relativen isometrischen Kraft der Carbachol-Antworten zum Kalium-Normwert in %. (orangefarbenes Punktpaar = Mittelwerte der Versuchsreihe)

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.

Hamburg,

23.04.2025

(Abgabedatum)

gez. Freya Kugel

(Vollständige Unterschrift)

DANKSAGUNG

Ganz herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling für die Möglichkeit, dieses Projekt am Oscar-Langendorff-Institut für Physiologie der Universität Rostock durchführen zu dürfen.

Mein herzlicher Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. med. Timo Kirschstein für die Bereitstellung des interessanten Themas, die fachliche Unterstützung, die vielen wertvollen Impulse und anregenden Diskussionen sowie die konstruktive Kritik bei der Ausarbeitung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeiter*innen des Instituts für Physiologie, insbesondere bei Herrn Dr. med. Bernd Frerker, für die freundliche Aufnahme und Unterstützung bei der Durchführung meiner experimentellen Arbeit bedanken.

Schließlich möchte ich meinem Lebenspartner meinen Dank aussprechen, der mir mit seiner Geduld, seinem Verständnis und seiner Ermutigung in herausfordernden Momenten stets zur Seite stand.