

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**



**Einfluss von Ionen und Pflanzeninhaltsstoffen auf die
Freisetzung von Katecholaminen
am Ductus deferens und am Nebennierenmark**

**Susanne Jost
aus München**

2009

ERKLÄRUNG

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Vierling betreut und von Herrn Prof. Dr. Martin Biel vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 5. Mai 2009

Susanne Jost

Dissertation eingereicht am: 07.05.2009

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Vierling

2. Gutachter: Prof. Dr. Martin Biel

Mündliche Prüfung am: 18.06.2009

Verzeichnis wichtiger Abkürzungen

A	Adrenalin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Kurve)
BSA	Bovine serum albumin; Rinderserumalbumin
Ca²⁺	Calcium
Carbachol	Carbamoylcholinchlorid
DAG	Diacylglycerin
DMPP	1,1-Dimethyl-4-Phenylpiperaziniumiodid
DTT	Dithiothreitol
Duct. def.	Ductus deferens
EC₅₀	Konzentration bei halbmaximaler Wirkung
ECL	Enhanced Chemiluminescence
F_{Cmax}	maximale Kontraktionskraft
FCS	Fetal calf serum (Fötales bovines Serum)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
IP₃	Inositoltrisphosphat
ISTD	Interner Standard
K⁺	Kalium
Konz.	Konzentration
MEM	Modified eagle medium
Mg²⁺	Magnesium
MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase (myosin light chain kinase)
NA	Noradrenalin
Na⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaN₃	Natriumazid
n. s.	nicht signifikant
PAGE	Polyacrylamid-Gel
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
Stim.	Stimulation
TBS	Tris-Borat-NaCl-Puffer
TBST	Tris-gepufferte Saline Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin Thymidinkinase
Tris	α,α,α-Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
VAP	Vesicle associated protein

1	EINLEITUNG.....	5
1.1	NEUROTRANSMITTER-FREISETZUNG	5
1.1.1	MOLEKULARER MECHANISMUS DER EXOCYTOSE	7
1.2	KATECHOLAMINE	8
1.2.1	NORADRENERGE SYNAPSE	8
1.2.2	ADRENOZEPTOREN.....	9
1.3	UNTERSUCHTE PRÄPARATE	10
1.3.1	DUCTUS DEFERENS	10
1.3.1.1	Aufbau und Funktion.....	10
1.3.1.2	Präsynaptische Vorgänge am Ductus deferens.....	11
1.3.1.3	Postsynaptische Vorgänge	12
1.3.2	ZUSAMMENFASSUNG	15
1.3.3	NEBENNIERE	16
1.3.3.1	Aufbau und Funktion.....	16
1.3.3.2	Calcium-Kanäle in chromaffinen Zellen der Ratte	18
1.3.4	PC12-ZELLEN	20
1.4	EIGENSCHAFTEN DER UNTERSUCHTEN SUBSTANZEN	21
1.4.1	VERATRUM-ALKALOIDE.....	21
1.4.1.1	Verwendung von Veratrum album und Veratrum-Alkaloiden.....	21
1.4.1.2	Botanische Charakterisierung von Veratrum album	22
1.4.1.3	Chemische Einteilung und Charakterisierung der Veratrum-Alkaloide	23
1.4.1.4	Pharmakologische Charakterisierung der Veratrum-Alkaloide	25
1.4.2	MENTHOL.....	27
1.4.2.1	Pharmakologische Charakterisierung von (-)-Menthol.....	27
1.4.3	PROTONEN.....	29
1.4.4	MAGNESIUM	29
1.4.5	HYPOTHETISCHE BEEINFLUSSUNG DER KATECHOLAMIN-FREISETZUNG	31
2	MATERIAL UND METHODEN	33
2.1	HERSTELLUNG DER VERWENDETEN LÖSUNGEN	33
2.1.1	NÄHRLÖSUNGEN UND STIMULATIONS-LÖSUNGEN.....	33
2.1.2	TESTLÖSUNGEN	34
2.1.3	STANDARDLÖSUNGEN FÜR VOLTAMMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN	37
2.1.4	LÖSUNGEN FÜR DIE ZELLKULTUR	37
2.1.5	LÖSUNGEN FÜR SDS-GELELEKTROPHORESE UND WESTERNBLOT	38
2.2	CHEMIKALIENVERZEICHNIS	39
2.3	KONTRAKTIONSKRAFT-MESSUNGEN AM ISOLIERTEN DUCTUS DEFERENS.....	40
2.3.1	PRÄPARATION DES DUCTUS DEFERENS	40
2.3.2	VERSUCHSAUFBAU	41
2.3.3	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG.....	42
2.3.3.1	Elektrische Stimulation.....	42

2.3.3.2	Stimulation mit Kalium oder durch Zugabe von Pharmaka.....	42
2.3.3.3	Auswertung.....	43
2.4	KONTRAKTIONSKRAFT-MESSUNGEN AM ISOLIERTEN PAPILLARMUSKEL.....	44
2.4.1	PRÄPARATION DES PAPILLARMUSKELS.....	44
2.4.2	VERSUCHSAUFBAU UND –DURCHFÜHRUNG.....	45
2.4.2.1	Kalibrierung und Auswertung.....	45
2.5	ELEKTROCHEMISCHE MESSVERFAHREN AN CHROMAFFINEN ZELLEN.....	46
2.5.1	HERSTELLUNG DER NEBENNIEREN-SCHNITTE.....	46
2.5.2	KULTIVIERUNG VON PC12-ZELLEN.....	46
2.5.2.1	Beschichtung mit Poly-D-Lysin.....	46
2.5.2.2	Kultivierung.....	47
2.5.3	ELEKTROCHEMISCHE MESSVERFAHREN.....	47
2.5.3.1	Herstellung der Kohlefaser-Mikroelektroden.....	47
2.5.3.2	Prinzip der Messung.....	48
2.5.3.3	Allgemeiner Aufbau.....	48
2.5.3.4	Voltammetrie an Nebennieren-Schnitten.....	50
2.5.3.5	Amperometrie an PC12-Zellen.....	53
2.6	HPLC-GESTÜTZTE KATECHOLAMIN-BESTIMMUNG AN NEBENNIEREN-SCHNITTEN.....	55
2.6.1	GEWINNUNG DES PERFUSATS.....	55
2.6.2	PRINZIP DER HPLC-MESSUNG.....	57
2.6.3	MATERIALIEN.....	58
2.6.4	GERÄTE.....	58
2.6.5	GERÄTEPARAMETER.....	59
2.6.6	DETEKTION.....	59
2.6.7	PROBENAUFBEREITUNG.....	59
2.6.8	VERWENDUNG VON PLASMA-KALIBRATIONSTANDARDS UND KONTROLLE.....	59
2.6.9	QUANTITATIVE AUSWERTUNG.....	60
2.6.10	VALIDIERUNG.....	60
2.7	HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG VON NEBENNIEREN-SCHNITTEN MITTELS GLYOXYLSÄURE-FÄRBUNG.....	62
2.7.1	ANFERTIGUNG DER SCHNITTE.....	62
2.7.2	REAKTIONSPRINZIP.....	62
2.7.3	AUFNAHME DER BILDER.....	63
2.7.4	PRINZIP DER KONFOKALEN MIKROSKOPIE.....	63
2.8	SDS-POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE (PAGE) UND WESTERNBLOT.....	65
2.8.1	PRINZIP.....	65
2.8.2	SAMMEL- UND TRENNUNG.....	65
2.8.3	PRÄPARATION DER PROBEN.....	66
2.8.4	PROTEINBESTIMMUNG.....	66
2.8.5	BELADEN DES GELS, GEL-LAUF UND BLOTTEN.....	66
2.8.5.1	Inkubation mit Antikörpern.....	67
2.8.6	DETEKTION MITTELS „ENHANCED CHEMILUMINESCENCE (ECL) SYSTEM“.....	68
2.9	STATISTISCHE AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE.....	69

3	ERGEBNISSE	70
3.1	KONTRAKTIONSKRAFT-MESSUNGEN AM DUCTUS DEFERENS DER RATTE	70
3.1.1	ETABLIERUNG DES VERSUCHSMODELLS	70
3.1.1.1	Kontraktion durch elektrische Stimulation	70
3.1.1.2	Kontraktion durch Zugabe von Noradrenalin	77
3.1.1.3	Kontraktion durch Zugabe von Tyramin	80
3.1.1.4	Kontraktion durch Erhöhung der Kalium-Ionen-Konzentration	81
3.1.1.5	Zusammenfassung	83
3.1.2	DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE	84
3.1.3	VERATRUM-ALKALOIDE	85
3.1.3.1	Ceveratrum-Alkaloide	85
3.1.3.2	Jerveratrum-Alkaloid Veratramin	93
3.1.3.3	Gesamtextrakt von Veratrum album	95
3.1.4	(-)-MENTHOL	98
3.1.4.1	Wirkung von (-)-Menthol	98
3.1.4.2	Vergleich mit der Wirkung von Icilin	102
3.1.5	EXTRAZELLULÄRE PROTONEN-KONZENTRATION	104
3.1.6	MAGNESIUM	105
3.1.6.1	Wirkung von Magnesium	105
3.1.6.2	Kombinierte Wirkung von Magnesium und Veratridin	108
3.1.6.3	Kombinierte Wirkung von Magnesium und (-)-Menthol	111
3.2	GLYOXYLSÄURE-FÄRBUNG	113
3.3	VOLTAMMETRIE AN NEBENNIEREN-SCHNITTEN	116
3.3.1	ETABLIERUNG DES VERSUCHSMODELLS	116
3.3.1.1	Etablierung der Messmethode	116
3.3.1.2	Kontrollversuche zur Stimulation der Freisetzung am Nebennierenmark	120
3.3.1.3	Kontrollversuche zur Stimulation mit Kalium	121
3.3.1.4	Kontrollversuche zur Stimulation mit Carbachol	123
3.3.1.5	Kontrollversuche zur Stimulation mit DMPP	125
3.3.1.6	Kontrollversuch mit Oxotremorin	127
3.3.1.7	Kontrollversuche zur Erhöhung der extrazellulären Protonen-Konzentration	128
3.3.1.8	Zusammenfassung	130
3.3.2	VERATRUM-ALKALOIDE	131
3.3.2.1	Veratridin	131
3.3.2.2	Veratramin	134
3.3.3	(-)-MENTHOL	137
3.3.3.1	Wirkung von (-)-Menthol	137
3.3.3.2	Vergleich mit der Wirkung von Icilin	139
3.3.3.3	Einfluss von Capsazepin auf die (-)-Menthol-Wirkung	141
3.3.4	MAGNESIUM	145
3.3.4.1	Wirkung von Magnesium	145
3.3.4.2	Einfluss von Magnesium auf die Protonen-induzierte Freisetzung	148
3.3.4.3	Einfluss von Magnesium auf die Veratridin-Wirkung	150
3.4	PROTEINEXPRESSION DES TRPM8-KANALS	152

3.5 AMPEROMETRIE	153
3.5.1 (-)-MENTHOL.....	153
3.5.2 MAGNESIUM.....	156
3.6 UNTERSUCHUNGEN MITTELS HPLC	158
3.6.1 ETABLIERUNG DER METHODE	158
3.6.2 VERATRIDIN	161
3.6.3 VERATRAMIN	162
3.6.4 (-)-MENTHOL	163
3.6.5 MAGNESIUM	164
3.6.6 ZUSAMMENFASSUNG	165
4 DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG	167
4.1 ETABLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER VERSUCHSMODELLE.....	167
4.1.1 BEWERTUNG DER INDIREKTEN MESSVERFAHREN.....	167
4.1.1.1 Kontraktionskraft-Messung am Ductus deferens.....	167
4.1.2 BEWERTUNG DER DIREKTEN MESSVERFAHREN.....	170
4.1.2.1 Voltammetrie an Nebennieren-Schnitten	171
4.1.2.2 Amperometrie an PC12-Zellen	173
4.1.2.3 Bestimmung der Katecholamin-Konzentration mittels HPLC.....	174
4.2 BEURTEILUNG DER WIRKUNG DER UNTERSUCHTEN SUBSTANZEN	175
4.2.1 VERATRUM-ALKALOIDE.....	175
4.2.1.1 Jerveratrum-Alkaloid Veratramin	175
4.2.1.2 Ceveratrum-Alkaloide	177
4.2.1.3 Vergleich der Wirkungen der Ceveratrum-Alkaloide am Ductus deferens.....	182
4.2.1.4 Gesamtextrakt.....	184
4.2.2 (-)-MENTHOL	185
4.2.3 ERHÖHUNG DER EXTRAZELLULÄREN PROTONEN-KONZENTRATION.....	187
4.2.4 MAGNESIUM	189
4.2.4.1 Wirkung von Magnesium	189
4.2.4.2 Wirkung von Magnesium auf die Protonen-induzierte Freisetzung	192
4.2.4.3 Kombinierte Wirkung von Magnesium mit (-)-Menthol bzw. Veratridin	192
4.2.4.4 Zusammenfassung der Wirkung von Magnesium am Sympathikus	195
4.3 ZUSAMMENFASSUNG.....	198

1 Einleitung

1.1 Neurotransmitter-Freisetzung

Signalübertragung und interzelluläre Kommunikation ist von entscheidender Bedeutung für die Funktion des Organismus. Ein wichtiger Aspekt ist dabei die Freisetzung von chemischen Botenstoffen z.B. bei der endokrinen Regulation oder bei der synaptischen Übertragung.

Im Folgenden soll nun ein Überblick über die Abläufe bei der Neurotransmission an der chemischen Synapse gegeben werden. Der Fokus liegt dabei auf den Mechanismen, die die Exocytose und die Neurotransmitter-Freisetzung an der präsynaptischen Zelle regulieren. Viele dieser Abläufe lassen sich auch auf andere Freisetzungsmechanismen, denen Exocytose zugrunde liegt, übertragen.

Der zentrale Vorgang an der chemischen Synapse ist die Kommunikation zwischen prä- und postsynaptischen Zellen, die durch den synaptischen Spalt getrennt sind. Die präsynaptische Zelle sendet dabei Informationen aus, die von der postsynaptischen Zelle empfangen und umgesetzt werden. Die Informationsträger sind die Neurotransmitter, die in der Nervenzelle präsynaptisch in Vesikeln gespeichert sind. Durch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration kommt es zur sogenannten Exocytose wobei die Vesikel mit der Zellmembran verschmelzen. Die dadurch freigesetzten Neurotransmitter diffundieren durch den synaptischen Spalt und binden spezifisch an postsynaptische Rezeptoren. Dadurch wird rezeptorabhängig die postsynaptische Antwort ausgelöst (Abb. 1). Die Art und Stärke der postsynaptischen Antwort ist von der Art und Menge des freigesetzten Neurotransmitters abhängig. Die Anzahl der mit der präsynaptischen Membran fusionierenden Vesikel und die Menge an Neurotransmittern, die pro Vesikel freigesetzt werden, spielen somit eine wichtige Rolle.

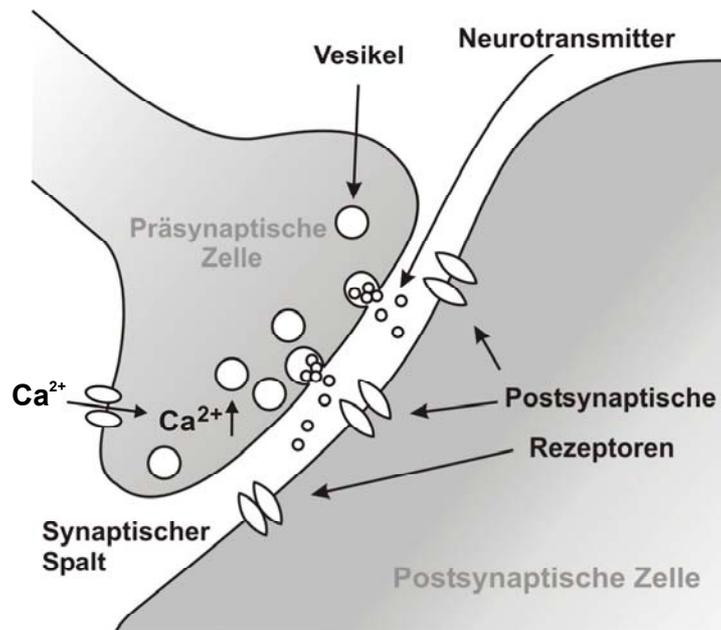


Abb. 1

Grundlegende Vorgänge an der chemischen Synapse. Der Calcium-Anstieg in der präsynaptischen Zelle führt zur Exocytose. Freigesetzte Neurotransmitter diffundieren durch den synaptischen Spalt und aktivieren postsynaptische Rezeptoren.

Für die Aufrechterhaltung der synaptischen Übertragung ist es von Bedeutung, dass die mit Neurotransmittern beladenen Vesikel dauerhaft zur Verfügung stehen. Der weniger als eine Millisekunde andauernden Prozess der Exocytose ist dabei nur ein Teil eines komplexen Kreislaufs, der im Wesentlichen aus folgenden Schritten besteht (s. Abb. 2):

Zunächst werden Neurotransmitter (NT) aktiv in die Vesikel transportiert (1). Die treibende Kraft dafür ist der elektrochemische Gradient, der durch Protonentransport in die Vesikel über eine ATP-abhängige Protonenpumpe entsteht. Die so beladenen Vesikel sind noch nicht zur Exocytose bereit und bilden den sogenannten Reserve-Pool (2). In einem weiteren Schritt wandern die Vesikel zur Zellmembran und docken über eine komplexe Verbindung zwischen verschiedenen Membranproteinen im Bereich der Zellmembran, die an den synaptischen Spalt angrenzt, an (3). Der Vorgang des Andockens findet nur in der sogenannten aktiven Zone in der Nähe des synaptischen Spaltes statt, was eine zielgerichtete Lokalisation der Vesikel zur Folge hat. Dort unterliegen sie einer Reaktion, dem Priming, wodurch sie erst die Fähigkeit zur Calcium-induzierten Fusion mit der Zellmembran erlangen. Die kompetenten Vesikel bilden den sogenannten „Readily Releasable Pool“ (4). Ein Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration führt schließlich zur Fusion der Vesikel mit der Zellmembran und zur Freisetzung der Neurotransmitter (5). Anschließend unterliegen die Vesikel einem Recycling-Prozess. Es kommt zur Endocytose (6) und die Vesikel werden direkt wieder mit Neurotransmittern gefüllt (7) oder fusionieren zunächst mit Endosomen (8) und werden dann regeneriert (9). Somit ist wieder Schritt (1) des Vesikel-Zyklus erreicht (vgl. Südhof, 1995).

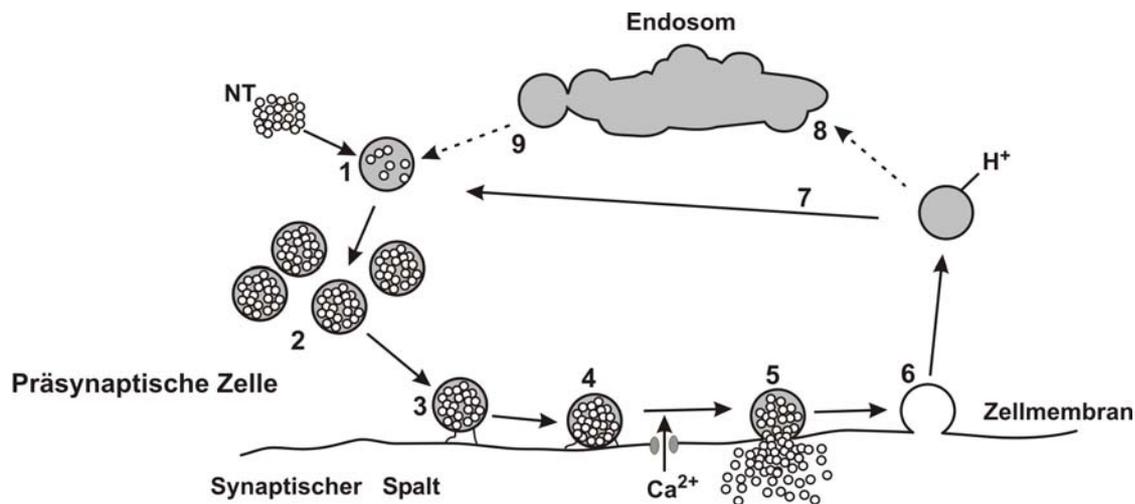


Abb. 2

Vesikel-Zyklus (modifiziert nach Westerink, 2002). Beschreibung s. Text.

1.1.1 Molekularer Mechanismus der Exocytose

Die Exocytose unterliegt komplexen Regulationsmechanismen. Eine wesentliche Rolle spielen dabei die SNARE-Proteine (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor protein). Diese können in zwei Gruppen, die v-SNAREs (vesicle synaptosome-associated protein receptor) und die t-SNAREs (target synaptosome-associated protein receptor) unterteilt werden. Während die v-SNAREs zu der Gruppe der Vesikel-assoziierten Membranproteine (VAMP) gehören und an der Vesikel-Membran lokalisiert sind, befinden sich die t-SNAREs dagegen an der Plasma-Membran. Das v-SNARE-Protein Synaptobrevin und die beiden t-SNARE-Proteine Syntaxin und SNAP-25 (synaptosome-associated protein of 25,000 daltons) bilden dabei den sogenannten SNARE-Komplex, der das Vesikel an der Plasmamembran verankert und somit für Docking und Priming verantwortlich ist (Chen *et al.*, 2001). An der eigentlichen Calcium-induzierten Neurotransmitter-Freisetzung sind Synaptotagmin und Complexin beteiligt. Die genaue Rolle dieser Proteine ist allerdings noch nicht ganz verstanden. Complexin dient vermutlich eher der Calcium-abhängigen Stabilisierung des SNARE-Komplexes, während Synaptotagmin vermutlich als eigentlicher Calcium-Sensor fungiert. Durch Interaktion mit Calcium kann Synaptotagmin seine Konformation ändern und so die Vesikel-Membran und die Zellmembran noch näher zusammenbringen, was zur Fusion führt (Li *et al.*, 2003). Zentraler Trigger der Freisetzung ist somit die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration, die v.a. durch Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle induziert wird. Dabei reguliert sowohl der Calcium-Einstrom in Abhängigkeit von der Offenwahrscheinlichkeit des Calcium-Kanals als auch die bereits zuvor basal vorhandene intrazelluläre Calcium-Konzentration die Freisetzung der Neurotransmitter. In einem komplexen System der gegenseitigen Beeinflussung können die an der Freisetzung beteiligten Proteine ihrerseits spannungsabhängige Calcium-Kanäle modulieren (Jarvis *et al.*, 2005). Zusätzlich können zahlreiche

andere Ionenkanäle, wie TRP-Kanäle (Fleig *et al.*, 2004), pH-sensitive Ionenkanäle (Fujiwara *et al.*, 1994) oder HCN-Kanäle (Wahl-Schott *et al.*, 2009) an der Induktion und der Modulation der Freisetzung beteiligt sein.

1.2 Katecholamine

Katecholamine, z.B. Adrenalin (A), Noradrenalin (NA) und Dopamin, sind biogene Amine, denen Brenzcatechin als Grundstruktur gemeinsam ist. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Freisetzung von Adrenalin und Noradrenalin untersucht wurde, soll im Folgenden nur auf diese Katecholamine näher eingegangen werden. Adrenalin und Noradrenalin sind sowohl als Hormone des Nebennierenmarks, als auch als Neurotransmitter von entscheidender Bedeutung. Das Nebennierenmark sezerniert Adrenalin (ca. 80%) und Noradrenalin (ca. 20%) in die Blutbahn und sorgt so für die Aufrechterhaltung einer basalen Konzentration (de Diego *et al.*, 2007), die z.B. Gefäßtonus, Nierenfunktion und Blutdruck reguliert. Noradrenalin stellt außerdem den wichtigsten postganglionären Neurotransmitter des Sympathikus dar (Lundberg, 1996) und sorgt somit für die direkte Informationsübertragung vom Sympathikus auf die Erfolgsorgane. Neurone, die Adrenalin freisetzen, sind dagegen v.a. im ZNS vorhanden und sind z.B. zentral an der Barorezeptor-vermittelten Regulation des Blutdrucks beteiligt (Guyenet, 2006).

1.2.1 Noradrenerge Synapse

Die meisten noradrenergen postganglionären Neurone des Sympathikus haben ihren Ursprung in vegetativen Ganglien im Grenzstrang des Sympathikus, wo die Verschaltung von den präganglionären, cholinergen mit postganglionären, noradrenergen Neuronen stattfindet. Die postganglionären Fasern versorgen schließlich von dort die Erfolgsorgane. Einige präganglionäre Neurone werden allerdings erst später umgeschaltet. So innervieren z.B. präganglionäre Nn. splanchnici direkt das Nebennierenmark.

Noradrenalin wird direkt in den Nervenendigungen der postganglionären Neurone synthetisiert (Esler *et al.*, 1990). Dazu wird Dopamin aus dem Axoplasma über den vesikulären Monoamin-Transporter ins Vesikel-Innere aufgenommen. Die treibende Kraft für diesen Transport ist der Protonen-Gradient zwischen Vesikel-Innerem und Intrazellulärraum. Erst im Vesikel-Inneren wird schließlich unter dem Einfluss der Dopamin- β -Hydroxylase Noradrenalin aus Dopamin gebildet. Kommt nun ein Aktionspotential an der Nervenendigung an, werden spannungsabhängige Calcium-Kanäle geöffnet, was zur Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran und zur Freisetzung von Noradrenalin in den synaptischen Spalt führt (s. Abb. 1). Von dort aktiviert Noradrenalin spezifische Rezeptoren und wird anschließend inaktiviert. Ein Teil des Noradrenalins kann aus dem synaptischen Spalt in den Blutkreislauf

gelangen (sog. Spillover) (Esler *et al.*, 1990). Der Hauptweg der Inaktivierung ist die Wiederaufnahme des Noradrenalins in die präsynaptische Zelle über einen selektiven Na^+ -Cotransport. Dort wird es entweder über das Enzym Monoaminoxidase A abgebaut oder zur erneuten Freisetzung wieder in Vesikel aufgenommen. Beim Abbau außerhalb der Neuronen, z.B. im synaptischen Spalt, spielt v.a. die Katechol-O-Methyltransferase eine wichtige Rolle.

1.2.2 Adrenozeptoren

Die endogenen Liganden Adrenalin und Noradrenalin aktivieren in ihrer Funktion als Neurotransmitter oder Hormone Adrenozeptoren und haben so einen Einfluss auf zahlreiche Vorgänge im Körper. So regulieren sie z.B. den Tonus glatter Muskeln, die Herztätigkeit und den Stoffwechsel.

Die Adrenozeptoren sind alle G-Protein-gekoppelt und lassen sich in folgende Gruppen unterteilen:

- α -Adrenozeptoren: α_1 , α_2
- β -Adrenozeptoren: β_1 , β_2 , β_3 , (β_4)

Durch die unterschiedliche Funktion und Verteilung der Adrenozeptoren können Adrenalin und Noradrenalin auf unterschiedliche Weise unsere Körperfunktionen modulieren:

α_1 -Adrenozeptoren aktivieren Gq-gekoppelt die Phospholipase C, unter deren Einfluss Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) gebildet wird. IP_3 induziert z.B. die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, wodurch die Kontraktion vieler glatter Muskeln, z.B. die der peripheren Gefäße, vermittelt wird (s. Abb. 4). DAG kann die Proteinkinase C aktivieren, die dann zahlreiche Zielproteine phosphorylieren kann.

α_2 -Adrenozeptoren sind dagegen Gi-gekoppelt und hemmen die Adenylatcyclase, wodurch die Bildung von cAMP vermindert wird. Durch die Aktivierung von α_2 -Autorezeptoren an der präsynaptischen Zelle kann Noradrenalin z.B. seine eigene Freisetzung hemmen.

β_1 -, β_2 - und β_3 -Adrenozeptoren aktivieren Gs-gekoppelt die Adenylatcyclase was zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führt. Die PKA kann wiederum verschiedene Proteine phosphorylieren.

Am Herzen sind v.a. β_1 -Adrenozeptoren vorhanden. Deren Aktivierung führt zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit des L-Typ-Calcium-Kanals und einer verstärkten Aufnahme von Calcium in das sarkoplasmatische Retikulum. Dadurch wird sowohl die Kontraktionskraft des Herzens verstärkt, als auch die Erschlaffung beschleunigt.

Das Herzzeitvolumen wird erhöht. In der Niere kommt es durch Stimulierung von β_1 -Adrenozeptoren, aber auch von β_2 -Adrenozeptoren zur Freisetzung von Renin und zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Die Aktivierung des β_2 -Rezeptors an zentralen Gefäßmuskelzellen oder Bronchien dagegen führt zu einer Aktivierung von Kalium-Kanälen und einer Hemmung der MLCK (Myosin-Leichtketten-Kinase) und so zur Vaso- bzw. Broncho-Dilatation (s. auch Abb. 4).

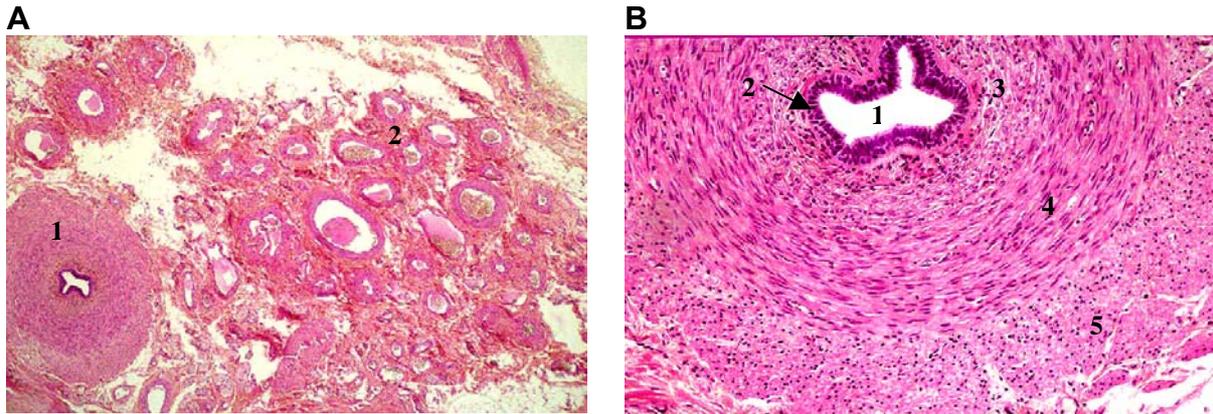
Auch der Stoffwechsel wird über die Aktivierung von β -Adrenozeptoren beeinflusst. Die Stimulation von β_2 -Adrenozeptoren führt z.B. zur Aktivierung der Glykolyse und zur Tokolyse während β_3 -Adrenozeptoren in Adipozyten die Lipolyse beeinflussen (Bachman *et al.*, 2002). Der β_3 -Rezeptor ist auch im Herzen vorhanden und vermittelt dort vermutlich eine negativ inotrope Wirkung. Außerdem gibt es Hinweise auf einen weiteren Subtyp, den β_4 -Rezeptor, am Herzen. Dessen Existenz ist allerdings nicht gesichert (Griffin *et al.*, 2004; Starke, 2006b)

1.3 Untersuchte Präparate

1.3.1 Ductus deferens

1.3.1.1 Aufbau und Funktion

Der Ductus deferens (Samenleiter) beginnt als Ausführungsgang am Nebenhoden und mündet in der Höhe der Prostata in den Urogenital-Kanal. Er ist Teil des Funiculus spermaticus (Samenstrangs), der die Einheit aus Ductus deferens und den dazu gehörigen Gefäßen, Nerven und dem Bindegewebe bezeichnet. Er wird vom Nervus hypogastricus mit postganglionären Fasern des Sympathikus innerviert. Die Umschaltung von prä- auf postganglionäre Fasern des Nervus hypogastricus erfolgt in der hinteren Bauchhöhle im Ganglion mesentericum caudale. Aufgrund der reichen Innervierung mit postganglionären Nervenfasern eignet sich der Ductus deferens insbesondere für die Untersuchung der elektrisch stimulierten Katecholamin-Freisetzung und deren Beeinflussung durch Pharmaka (Blattner *et al.*, 1978).

**Abb. 3**

A: Funiculus spermaticus mit Ductus deferens (1) und umgebendem Gewebe mit Blutgefäßen, Nerven und Bindegewebe (2).

B: Ductus deferens mit Lumen (1), Epithel (2), innerer Schicht longitudinal angeordneter glatter Muskelzellen (3), mittlerer Schicht zirkulär angeordneter glatter Muskelzellen (4) und äußerer Schicht longitudinal angeordneter glatter Muskelzellen (5) (Präparat der Medizinischen Hochschule Hannover, 2008).

An der Kontaktstelle zwischen Nerv und glattem Muskel bilden die Axone zahlreiche Verdickungen, die sogenannten Varikositäten. Hier befinden sich die Synapsen zwischen Nervenzellen und glatten Muskelzellen. In der aktiven Zone der Varikositäten steht die präsynaptische Membran der Nervenzelle in engem Kontakt mit der postsynaptischen Membran der glatten Muskelzelle (Abstand ca. 50 – 100 nm).

Bei Aktivierung der postsynaptischen Rezeptoren am glatten Muskel durch Neurotransmitter kann eine Kontraktion ausgelöst werden. Dabei ist die Stärke der Kontraktion neben anderen Mechanismen v.a. von der Art und Menge der freigesetzten Neurotransmitter abhängig. Die Kontraktionskraft stellt somit einen Indikator für die Freisetzung von Neurotransmittern dar. Aus diesem Grund soll im Folgenden sowohl auf präsynaptische als auch auf postsynaptische Vorgänge am Ductus deferens eingegangen werden (vgl. Bennett *et al.*, 1998).

1.3.1.2 Präsynaptische Vorgänge am Ductus deferens

Am Ductus deferens induziert v.a. der Einstrom von extrazellulärem Calcium über den N-Typ-Calcium-Kanal die Neurotransmitter-Freisetzung. Der wichtigste postganglionäre Überträgerstoff der Sympathikus-Neurone ist Noradrenalin. Allerdings werden aus sympathischen Nervenbahnen auch andere Substanzen wie ATP und Neuropeptide (z.B. Neuropeptid Y und Substanz P) als Cotransmitter freigesetzt. Substanz P kann z.B. Kontraktionen am Ductus deferens induzieren (Moritoki *et al.*, 1987). Neuropeptid Y hat dagegen weniger einen direkten Effekt auf die glatte Muskulatur, sondern wirkt eher als präsynaptischer Modulator, der die Freisetzung von NA und ATP mehr oder weniger stark vermindert. NA und ATP können durch direkte Wirkung an der glatten Muskulatur des Ductus deferens eine

Kontraktion auslösen. Präsynaptisch können beide Substanzen im Sinne einer negativen Rückkopplung ihre eigene Freisetzung reduzieren. NA aktiviert dabei α_2 -Adrenozeptoren und ATP wird zu Adenosin (AD) umgewandelt, was dann v.a. präsynaptische P_1 -Rezeptoren aktiviert. Anders als bei den chromaffinen Zellen ist nicht klar, ob ATP und NA in den selben Vesikeln gespeichert werden. Die Tatsache, dass verschiedene Substanzen selektiv auf die ATP oder NA-Freisetzung wirken, spricht eher für eine Speicherung in verschiedenen Vesikeln. Auch scheint die Freisetzung abhängig von der Art der Stimulation zu sein (vgl. Bennett *et al.*, 1998; Burnstock, 1995).

1.3.1.3 Postsynaptische Vorgänge

1.3.1.3.1 Allgemeine Vorgänge an der glatten Muskulatur

Zunächst soll ein kurzer Überblick über die bei der Kontraktion der glatten Muskulatur ablaufenden Mechanismen im Allgemeinen gegeben werden. Im folgenden Kapitel (1.3.1.3.2) wird dann speziell auf die Abläufe am Ductus deferens eingegangen.

Aufgebaut sind glatte Muskeln aus einkernigen, spindelförmigen Zellen, die in vielen Organen durch „Gap Junctions“ verbunden sind und somit ein funktionelles Synzytium bilden. Über diese „Gap Junctions“ können Nachbarzellen sowohl chemisch, als auch elektrisch miteinander kommunizieren. So wird z.B. eine Depolarisation von Muskelzelle zu Muskelzelle weitergetragen.

Wie auch bei anderen Muskeln, ist bei der glatten Muskulatur eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration ein entscheidender Schritt bei der Auslösung einer Kontraktion. Die Bindung von Calcium an Calmodulin führt zu dessen Konformationsänderung und ermöglicht dadurch die Bindung des gebildeten Calcium-Calmodulins an die MLCK. Dadurch wird diese aktiviert und die regulatorische Myosin-Leichtkette (regulatory myosin light chain) phosphoryliert. Diese wiederum aktiviert die Magnesium-abhängige Myosin-ATPase, die Myosin phosphoryliert. Myosin interagiert schließlich mit Aktin und es kommt zur Kontraktion.

Zur Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration kann es über elektromechanische Koppelung kommen, bei der spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle durch eine Depolarisation der Zellmembran geöffnet werden und Calcium von extrazellulär in die Zelle einströmt. Zusätzlich kann Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum über Ryanodin-Rezeptoren freigesetzt werden (Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung). Es kann aber auch durch Neurotransmitter, Hormone und Pharmaka zur Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren oder ligandengesteuerten Calcium-Kanälen kommen. Eine G-Protein-vermittelte Bildung von IP_3 führt zur Aktivierung von IP_3 -Rezeptoren am sarkoplasmatischen Retikulum wodurch Ca^{2+} freigesetzt wird (Abb. 4, linke Seite).

Wird die intrazelluläre Calcium-Konzentration durch ATP-getriebene Ca^{2+} -Pumpen am sarkoplasmatischen Retikulum oder durch Pumpen an der Oberflächenmembran (ATP-getriebene Ca^{2+} -Pumpe und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher) wieder verringert, so kommt es zur Relaxation des Muskels. Katecholamine können durch Bindung an β_2 -Adrenozeptoren zu einer Relaxation des Muskels führen. Dabei kommt es G-Protein- vermittelt zur Aktivierung der Adenylatcyclase, wodurch cAMP gebildet wird. cAMP aktiviert die Proteinkinase A, welche durch Phosphorylierung die Ca^{2+} -Pumpe am sarkoplasmatischen Retikulum aktiviert (Abb. 4, rechte Seite). Die Muskelzelle kann jedoch auch gegenüber Ca^{2+} sensitiviert werden, so dass selbst bei wieder verminderter intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration die Kontraktionskraft erhalten bleibt. Dabei spielt das G-Protein RhoA und die Rho-assoziierte Kinase (Rho-Kinase) eine wichtige Rolle.

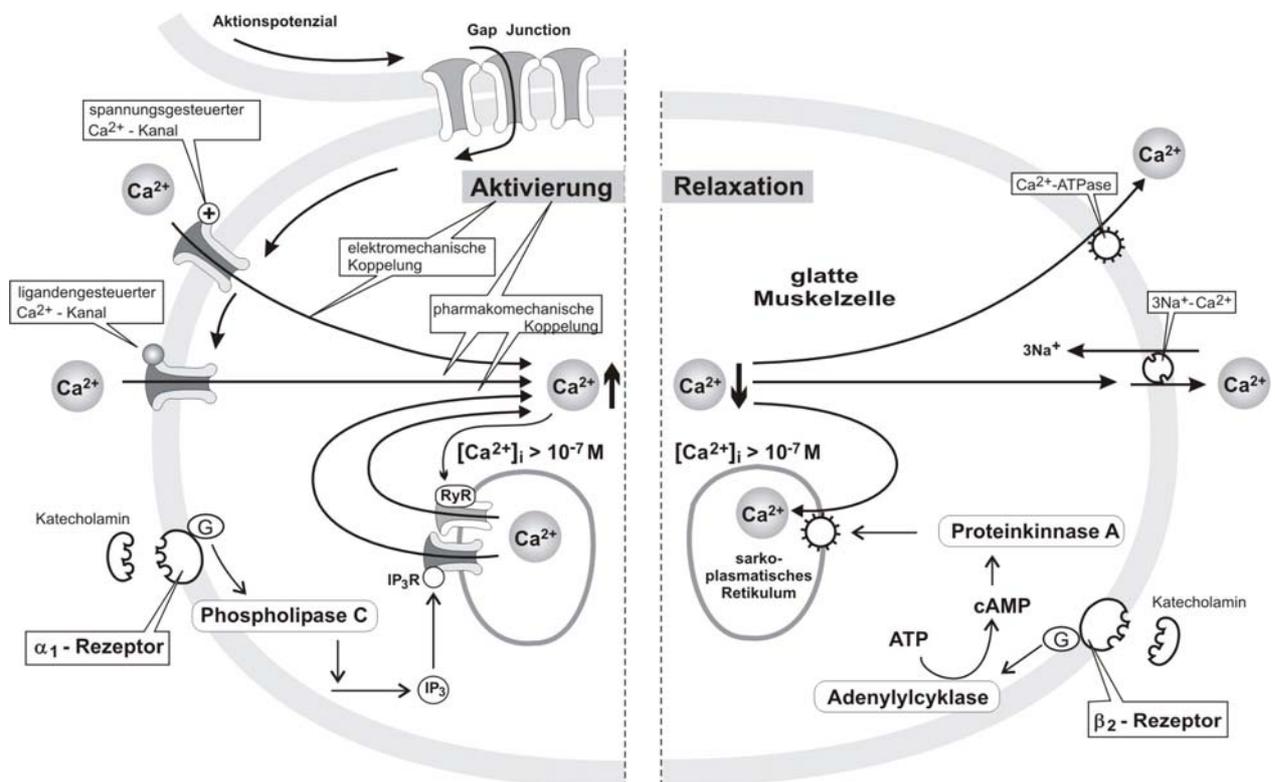


Abb. 4

Mechanismen zur Auslösung der Kontraktion (linke Seite) und der Relaxation (rechte Seite) im glatten Muskel. Entscheidend für die Auslösung einer Kontraktion ist die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration. Zur Relaxation kommt es durch die Verringerung der intrazellulären Calcium-Konzentration. RyR: Ryanodin-Rezeptor. IP_3 R: Inositoltrisphosphat-Rezeptor. IP_3 : Inositoltrisphosphat (modifiziert nach Brenner et al., 2005).

1.3.1.3.2 Spezielle postsynaptische Mechanismen am Ductus deferens

Sneddon et al. (1984) fanden, dass es bei elektrischer Stimulation der Nervenbahnen mit 8 Hz am Ductus deferens des Meerschweinchens zu einer biphasischen Antwort kommt. Dabei schien die schnelle phasische Komponente mehr durch ATP und die langsamere tonische Komponente mehr durch NA induziert zu sein.

Die NA-induzierte Kontraktion lässt sich nach Boselli (1998; 1997) in drei Komponenten aufteilen: Eine schnelle phasische Komponente, eine langsamere tonische Komponente und periodische Spikes, die die tonische Phase überlagern.

NA aktiviert α_1 -Adrenozeptoren (Bennett *et al.*, 1998) wodurch IP_3 und DAG gebildet werden. Während IP_3 die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern induziert, aktiviert DAG die Phospholipase C, die wiederum durch Phosphorylierung weitere Zielproteine aktivieren kann.

Vor allem am Nebenhoden-nahen Abschnitt des Ductus deferens scheint die NA-induzierte Kontraktion allerdings primär durch den Einstrom von extrazellulärem Calcium über L-Typ-Calcium-Kanäle vermittelt zu sein. Erst sekundär kommt es dann zur Calcium-vermittelten Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, was für die rhythmische Komponente und die Aufrechterhaltung der tonischen Phase verantwortlich ist. Nach Burt (1996) ist die initiale, phasische Kontraktion vermutlich von der durch DAG aktivierten Proteinkinase C abhängig, die spannungsabhängige Calcium-Kanäle aktiviert. Nach Burt scheinen intrazelluläre Calcium-Speicher hier nur eine geringe Rolle zu spielen.

ATP gehört zur Gruppe der Nukleotide und aktiviert v.a. die P2-Rezeptoren, im Gegensatz zu den P1-Rezeptoren, die v.a. durch Nukleoside wie Adenosin aktiviert werden. Die P2-Rezeptoren lassen sich in 2 Hauptgruppen unterteilen, die P2X und P2Y Rezeptoren, die sich jeweils wieder in zahlreiche Subtypen unterteilen lassen (P2X1 bis P2X7 und P2Y1, P2Y2, PY4, PY6, PY11, PY12, PY13). Während P2Y-Rezeptoren G-Protein-gekoppelt sind, sind P2X-Rezeptoren ligandengesteuerte Ionenkanäle, die permeabel für Na^+ , Ca^{2+} und K^+ sind. Am Ductus deferens spielt postsynaptisch v.a. der P2X1-Rezeptor eine Rolle. Bei dessen Aktivierung kommt es zu einer Depolarisation der Zellmembran und vermutlich vorwiegend über elektromechanische Kopplung zur Kontraktion (Bhagwat *et al.*, 1996; Burnstock, 1995).

1.3.2 Zusammenfassung

Abb. 5 bietet einen Überblick über die grundlegenden Vorgänge an der neuro-muskulären Verbindung des Ductus deferens:

Ein Aktionspotential führt zur Depolarisation der präsynaptischen Membran, wodurch v.a. N-Typ-Calcium-Kanäle geöffnet werden. Durch den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration werden Noradrenalin und ATP freigesetzt. Beide Neurotransmitter können ihre eigene Freisetzung hemmen. NA aktiviert dabei präsynaptische α_2 -Adrenozeptoren, ATP wird zu AD umgewandelt, was präsynaptische P1-Rezeptoren aktiviert.

Postsynaptisch aktiviert NA α_1 -Adrenozeptoren, wodurch PLC-vermittelt IP_3 und DAG gebildet wird. Die initiale NA-induzierte Kontraktion wird vermutlich v.a. durch eine DAG- und PKC-vermittelte Aktivierung des spannungsabhängigen Calcium-Kanals induziert. Eine IP_3 -vermittelte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern ist wahrscheinlich eher für eine spätere Komponente der Kontraktion verantwortlich.

Durch ATP wird dagegen die Öffnung des P2X1-Rezeptors induziert, wodurch es zum Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} kommt. Dies führt zur Ausbildung eines EJP's und zur Depolarisation. Spannungsabhängige Calcium-Kanäle (v.a. L-Typ) werden geöffnet und der Muskel kontrahiert.

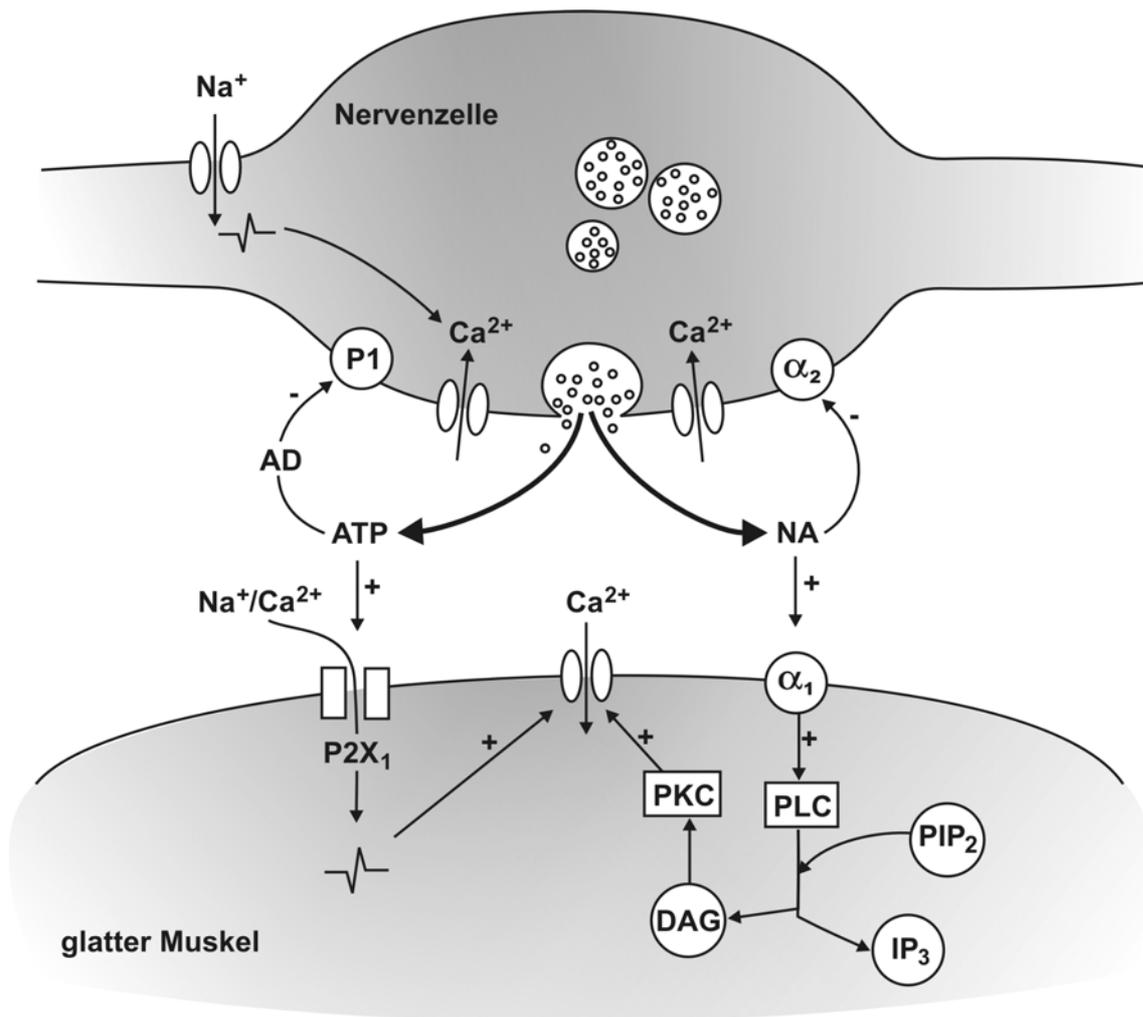


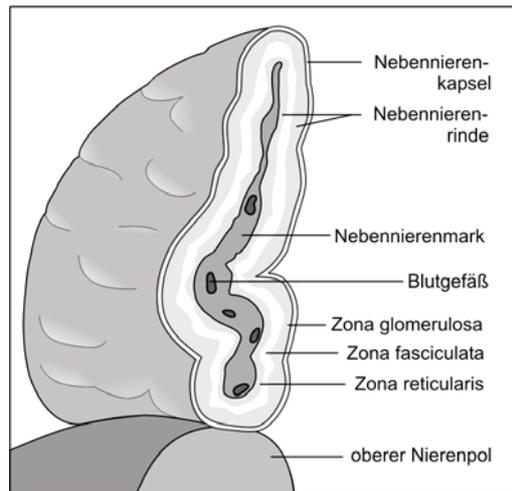
Abb. 5

Vorgänge an der neuromuskulären Verbindung am Ductus deferens (modifiziert nach Burnstock, 1995; Burt et al., 1996). AD: Adenosin; ATP: Adenosintrisphosphat; DAG: Diacylglycerin; IP₃: Inositol-1,4,5-trisphosphat; PIP₂: Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat; PKC: Proteinkinase C; PLC: Phospholipase C.

1.3.3 Nebenniere

1.3.3.1 Aufbau und Funktion

Die Nebenniere besteht aus Kapsel, Rinde und Mark (Abb. 6). Rinde und Mark sind reich von Blutgefäßen durchzogen und sind für die Produktion und Abgabe zahlreicher Hormone in die Blutbahn verantwortlich. Während die Nebennierenrinde v.a. Mineralocortikoide, Glucocorticoide und Androgene produziert, besteht das Nebennierenmark zum größten Teil aus Adrenalin- und Noradrenalin-freisetzenden chromaffinen Zellen. Diese neuro-endokrinen Zellen sind modifizierte postganglionäre Zellen des Sympathikus (Faller et al., 1995) und stellen somit ein sehr gutes Modell zur Untersuchung sekretorischer Vorgänge dar.

**Abb. 6***Aufbau der Nebenniere*

Die chromaffinen Zellen sezernieren v.a. Katecholamine mittels Calcium-induzierter Exocytose und unterliegen ähnlichen Prozessen wie die sympathischen Neurone. NA wird wie unter 1.2.1 beschrieben, in den Vesikeln gebildet und gespeichert. Das Enzym zur Synthese von A ist allerdings im Zytoplasma lokalisiert. NA diffundiert zunächst aus den Vesikeln in das Zytoplasma und wird durch die Phenylethanolamin-N-Methyltransferase zu A umgewandelt, das dann wieder in die Vesikel aufgenommen wird (Starke, 2006a). Anders als bei neuronalen Zellen, kommt es bei chromaffinen Zellen nicht zur Wiederaufnahme der sezernierten Katecholamine (Borges, 1997).

Wie bei Neuronen werden auch von chromaffinen Zellen neben den Katecholaminen noch andere Substanzen als Cotransmitter freigesetzt. So wird z.B. ATP zusammen mit NA in den selben Vesikeln gespeichert (Burnstock, 1995; Conceicao *et al.*, 2005). NA und A scheint dagegen in verschiedenen Vesikeln gespeichert zu sein (de Diego *et al.*, 2007).

Auch in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks existiert ein schnell-freisetzender Vesikel-Pool und ein Reserve-Pool (Augustine *et al.*, 1992; Bittner *et al.*, 1988). Von Rüden und Neher (1993) wurde durch Kapazitätsmessungen und amperometrische Messungen an chromaffinen Zellen gezeigt, dass durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, z.B. durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern (Histamin-induziert) oder durch moderate Depolarisation, die Größe des schnell-freisetzenden Vesikelpools erhöht wird (gesteigerte Freisetzung bei gleichem Calcium-Signal).

Physiologisch wird das Nebennierenmark vom Nervus splanchnicus innerviert, der zum präsynaptischen Teil des Sympathikus gehört. Dieser setzt hauptsächlich Acetylcholin frei, welches Cholinozeptoren an den chromaffinen Zellen aktiviert. Dadurch wird in den chromaffinen Zellen ein Aktionspotential ausgelöst was zur Freisetzung von Katecholaminen führt. Cholinozeptoren lassen sich in nicotinsche

(N)- und muscarinische (M)-Cholinozeptoren unterteilen. N-Cholinozeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, während M-Cholinozeptoren G-Protein-gekoppelt sind. In chromaffinen Zellen sind beide Arten vorhanden.

Die N-Cholinozeptoren in chromaffinen Zellen sind vom neuronalen Typ und weisen neben einer Permeabilität für Natrium auch eine Permeabilität für Calcium auf (Le Novere *et al.*, 2002).

Außerdem werden verschiedene Subtypen der M-Cholinozeptoren exprimiert, darunter die Subtypen M1, M3 und M4 (Barbara *et al.*, 1998a; Olivos *et al.*, 2007).

Nichtselektive Agonisten wie Carbachol scheinen einen durch N-Cholinozeptoren getragenen schnellen Anstieg der Freisetzung und eine spätere lang andauernde Freisetzung, die M-Cholinozeptor-abhängig ist, zu induzieren (Borges, 1997). Die selektive Aktivierung von N-Cholinozeptoren führt zu einem starken und schnellen Anstieg der Freisetzung, an dem auch TTX-sensitive Natriumkanäle und L-Typ-Calcium-Kanäle beteiligt zu sein scheinen. Es kommt zum Einstrom von Natrium, was zu einer Depolarisation und somit zur Öffnung von spannungsabhängigen Natrium-Kanälen und Calcium-Kanälen und zum Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration führt. Die intrazelluläre Calcium-Konzentration der chromaffinen Zellen kann aber auch durch den direkten Einstrom von Calcium über die neuronalen N-Cholinozeptoren erhöht werden.

Bei der selektiven Aktivierung von M-Cholinozeptoren kommt es zu einer geringeren Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration als bei Aktivierung von N-Cholinozeptoren. Ob darauf eine Freisetzung folgt, scheint v.a. vom basalen Calcium-Level der Zelle abhängig zu sein. M-Cholinozeptoren spielen wahrscheinlich eine wichtigere Rolle bei der Calcium-Homöostase der Zelle und beeinflussen die Freisetzung eher indirekt als direkt. Der M-Cholinozeptor-vermittelte Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration wird durch Aktivierung intrazellulärer Speicher induziert. Aber auch extrazelluläres Calcium scheint eine Rolle zu spielen, da die durch M-Cholinozeptor-Aktivierung induzierte Freisetzung in Calcium-freier Lösung reduziert wird. Dieser Effekt ist nicht Nifedipin-sensitiv (Borges, 1997).

1.3.3.2 Calcium-Kanäle in chromaffinen Zellen der Ratte

In den chromaffinen Zellen werden alle Arten von Calcium-Kanälen (L-, P/Q-, N-, R-, und T-Typ) exprimiert. Die Funktion der T-Typ- und R-Typ-Calcium-Kanäle ist dabei allerdings nur wenig untersucht. Der jeweilige Anteil an vorherrschenden Calcium-Kanälen ist in den verschiedenen Spezies unterschiedlich (Garcia *et al.*, 2006; Marcantoni *et al.*, 2007). In der Ratte ist hauptsächlich der L-Typ mit einem Anteil von 50% vorhanden, der N-Typ ist zu ca. 30%, der P/Q-Typ und der R-Typ sind zu ca. 20% vorhanden (Abb. 7).

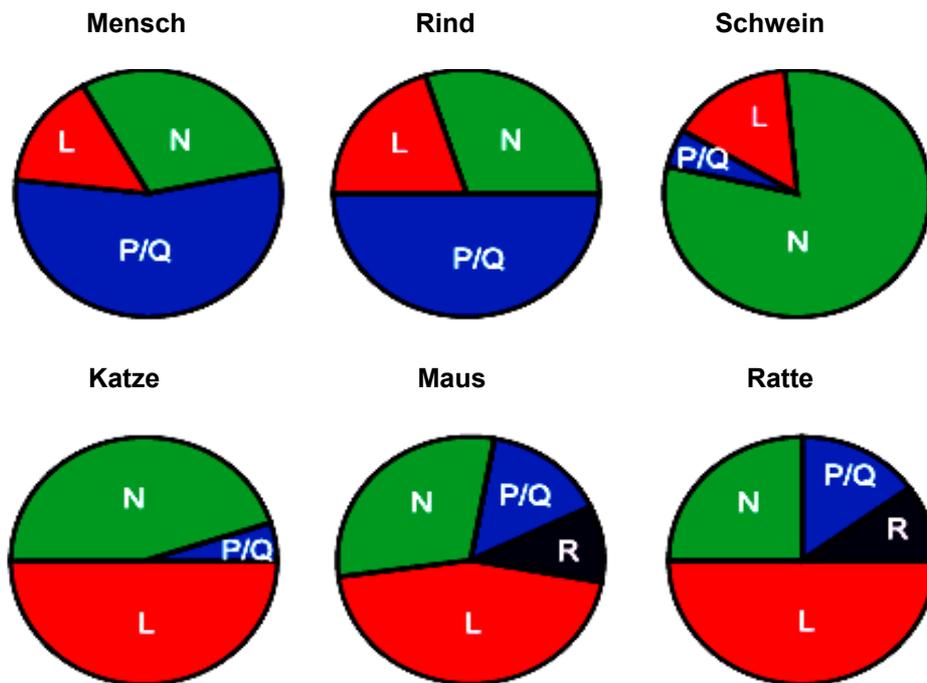


Abb. 7

Relative Verteilung verschiedener Calcium-Kanal-Subtypen in chromaffinen Zellen aus Primärkulturen des Menschen, des Rindes, des Schweines, der Katze, der Maus und der Ratte (aus Garcia et al., 2006)

Die Beteiligung von N-, L- und P/Q-Kanälen an der Freisetzung scheint dabei allerdings nicht von deren Expressionsmuster abzuhängen. Während am gesamten Calcium-Einstrom in die Zelle L-, P/Q-, und N-Typ-Calcium-Kanäle beteiligt sind, scheint der N-Typ-Calcium-Kanal die Freisetzung nur wenig zu beeinflussen. So wurde z.B. bei Kalium-induzierter Freisetzung (70 mM) an bovinen chromaffinen Zellen eine Aktivierung von L- und P/Q-Typ-Calcium-Kanälen gefunden. Das durch den N-Typ-Calcium-Kanal einströmende Calcium hatte offenbar auf diese Freisetzung keinen Einfluss, obwohl es am mittels Patch Clamp-Technik gemessenen gesamten Calcium-Einstrom in die Zelle beteiligt war (Lopez *et al.*, 1994). Auch Santana *et al.* (1999) und Marcantoni *et al.* (2007) fanden, dass v.a. der L-Typ-Calcium-Kanal die Freisetzung direkt zu kontrollieren scheint. Der N-Typ-Calcium-Kanal könnte dagegen eher zur Aufrechterhaltung des Calciumhaushaltes und somit zur Regulation der Größe des freisetzungsbereiten Vesikelpools beitragen. Die unterschiedliche Beteiligung der Calcium-Kanäle am Freisetzung-Mechanismus könnte an deren unterschiedlichen Eigenschaften, wie z.B. Inaktivierungs-Kinetik liegen. Auch eine unterschiedliche Verteilung der Calcium-Kanäle in der Zelle (Lokalisation am synaptischen Spalt oder nicht) könnte z.B. bewirken, dass die Aktivierung von L- und P/Q-Typ-Calcium-Kanälen eine Freisetzung induziert, die Aktivierung von N-Typ-Calcium-Kanälen dagegen nicht.

1.3.4 PC12-Zellen

PC12-Zellen sind Phäochromozytom-Zellen der Ratte und ähneln unter normalen Bedingungen chromaffinen Zellen in ihren physiologischen und biochemischen Eigenschaften. Sie speichern Noradrenalin, Dopamin und Acetylcholin in Vesikeln und setzen diese bei Depolarisation und Stimulation mit N- und M-Cholinozeptor-Agonisten frei. Adrenalin wird dagegen in PC12-Zellen nicht synthetisiert. Außerdem exprimieren PC12-Zellen einen Noradrenalin-Transporter, der zur Wiederaufnahme von freigesetztem Noradrenalin dient. In diesem Punkt entsprechen sie somit eher sympathischen Neuronen als chromaffinen Zellen. PC12-Zellen besitzen L- und N-Typ-Calcium-Kanäle. Dabei ist in undifferenzierten PC12-Zellen der Anteil an L-Typ-Calcium-Kanälen wesentlich größer als der Anteil an N-Typ-Calcium-Kanälen (vgl. Shafer *et al.*, 1991).

1.4 Eigenschaften der untersuchten Substanzen

In der vorliegenden Arbeit sollten Substanzen untersucht werden, die die Katecholamin-Freisetzung beeinflussen können. Diese wurden dabei aufgrund bereits bekannter Wirkungen auf Calcium-Kanäle oder andere Ionenkanäle ausgesucht, die auf eine mögliche Beeinflussung der Katecholamin-Freisetzung hindeuten. Bei einem Teil der Substanzen gab es bereits Hinweise, dass sie die Katecholamin-Freisetzung beeinflussen können. Im Folgenden sollen die Substanzen kurz vorgestellt und die relevanten Wirkungen dargestellt werden.

1.4.1 Veratrum-Alkaloide

1.4.1.1 Verwendung von *Veratrum album* und Veratrum-Alkaloiden

Veratrum-Alkaloide sind Inhaltsstoffe der in Europa heimischen Pflanze *Veratrum album* (Weißer Germer). Volksmedizinisch wurde *Veratrum album* bei zahlreichen Krankheiten bei Mensch und Tier eingesetzt. Verwendet wurde dabei v.a. die Wurzel, die die höchste Konzentration an Alkaloiden enthält. Sie wurde getrocknet und pulverisiert und bei Schwermut, Kolik, Lähmungen, Asthma, Rheuma und Fieber verwendet. Darüber hinaus wurden aus der Wurzel Salben hergestellt und bei Hautausschlägen und Schuppenflechte eingesetzt (Pahlow, 1999, Hirsch und Grünberger, 2000). Da die Inhaltsstoffe von *Veratrum album* auch auf Insekten und Milben tödlich wirken, kamen Zubereitungen aus *Veratrum album* auch gegen Ektoparasiten bei Haustieren zum Einsatz (Stichmann, 1996).

In den 50er Jahren wurde ein Gemisch von Protoveratrin A und B bei akuter Hypertonie verwendet. Protoveratrin kann über die Reizung afferenter Vagusfasern im linken Ventrikel, Karotis-Sinus und im Aortenbogen den sogenannten Bezold-Jarisch-Reflex auslösen. Es kommt dabei in Folge einer Dilatation der peripheren Gefäße und einer Verlangsamung der Herzfrequenz zum Abfall des systolischen und diastolischen Blutdrucks (Kraye, 1950).

Pflanzenzubereitungen bzw. Inhaltsstoffe von *Veratrum album* weisen allerdings eine geringe therapeutische Breite auf. *Veratrum album* wird zu den giftigsten Pflanzen Europas gezählt. Zu Vergiftungen beim Menschen kommt es v.a. durch Verwechslung des weißen Germers im nichtblühenden Zustand mit dem gelben Enzian (*Gentiana lutea*). Dabei können bereits 1-2 g der Wurzel tödlich sein. Erste Vergiftungserscheinungen sind Brennen im Mund-Rachenraum und Niesreiz, gefolgt von Erbrechen, Taubheitsgefühl und Durchfall. Außerdem kann es zu schwachem, bradykardem Puls, Atemstörungen und Arrhythmien kommen. Bei schweren

Intoxikationen kann bereits nach drei Stunden der Tod eintreten und auch bei leichten Vergiftungen können Arrhythmien entstehen, die noch tagelang andauern.

Aufgrund der geringen therapeutischen Breite werden Pflanz Zubereitungen und Inhaltsstoffe heute in der Schulmedizin nicht mehr eingesetzt. *Veratrum album* kommt allerdings noch als Homöopathikum bei Indikationen wie drohendes Kreislaufversagen, Infektionskrankheiten, Durchfall-Erkrankungen, Nervenschmerzen und Gemütsleiden mit Antriebssteigerung zum Einsatz (vgl. Hiller *et al.*, 2006; Pahlow, 1989; Wagner, 1999).

1.4.1.2 Botanische Charakterisierung von *Veratrum album*



Abb. 8
Veratrum album (Weißer Germer).

Veratrum album (Abb. 8) ist eine kräftige, aufrecht wachsende Pflanze mit gelbgrünen, oft auch weißlichen Blüten in einer endständigen, länglichen Rispe. Die Pflanze erreicht eine Höhe von 0,5 bis 1,5 m und blüht zwischen Juni und August. Die Blätter sind wechselständig angeordnet, breit-oval, stark gerieft und an der Unterseite flaumig. Der Wurzelstock ist kurz und walzenförmig und es gehen zahlreiche Seitenwurzeln von ihm aus (Pahlow, 1989). Verbreitet ist *Veratrum album* in den Alpen und den Voralpen in Höhenlagen zwischen 500 und 2500 m. Die Pflanze bevorzugt stickstoffreiche Böden wie z.B. feuchte Wiesen oder Flachmoore (Aichele *et al.*, 1997).

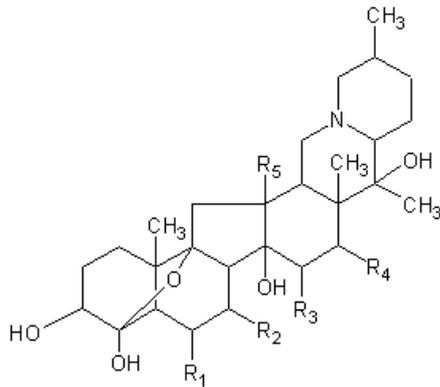
In der botanischen Systematik wird die Pflanze wie folgt eingeordnet (Frohne *et al.*, 1998):

Überabteilung:	Spermatophyta
Abteilung:	Magnoliophyta
Klasse:	Liliopsida
Unterklasse:	Liliidae
Ordnung:	Liliales
Familie:	Melanthiaceae

1.4.1.3 Chemische Einteilung und Charakterisierung der Veratrum-Alkaloide

Die Veratrum-Alkaloide sind aus einem C27-Steroidgerüst aufgebaut und lassen sich chemisch und pharmakologisch in zwei Gruppen unterteilen: Die Ceveratrum-Alkaloide und die Jerveratrum-Alkaloide:

Ceveratrum-Alkaloide sind tertiäre Amine deren Grundstrukturen zahlreiche (7 bis 9), meist mit unterschiedlichen Säuren veresterte Hydroxylgruppen enthalten (Honerjäger, 1982). Eine Übersicht über die Grundstrukturen Veracevin und Germin bietet Abb. 9. In dieser Arbeit wurden als Vertreter der Ceveratrum-Alkaloide Veratridin, Cevadin, Germitrin und Germin-3-Acetat (Strukturformeln s. Abb. 10) untersucht. Veratridin und Cevadin leiten sich von der gleichen Grundstruktur ab und sind beide Veracevin-Ester. Sie unterscheiden sich nur in ihrer Estergruppe am C3-Atom. Veratridin trägt hier eine Veratroyl-, Cevadin eine Angeloyl-Gruppe. Germitrin und Germin-3-Acetat leiten sich vom Germin ab. Germitrin ist ein Triester und ist am C3-Atom mit einem 1,2-Methylbutyryl-Rest, am C7-Atom mit einem Acetyl-Rest und am C15-Atom mit einem Erythro-2-hydroxy-2-methyl-3-acetoxybutyryl-Rest verbunden. Germin-3-Acetat wird synthetisch aus Germin hergestellt und ist ein Monoester. Es ist am C3-Atom mit einem Acetyl-Rest verbunden.

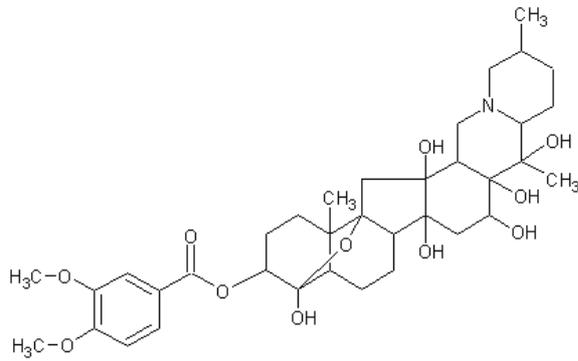
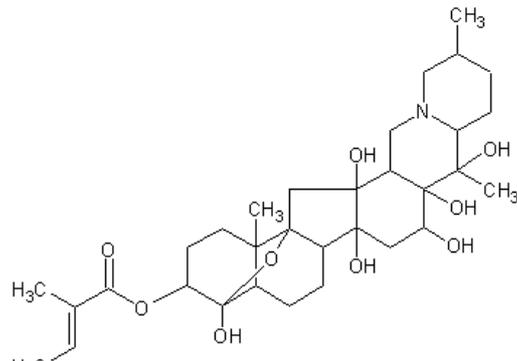
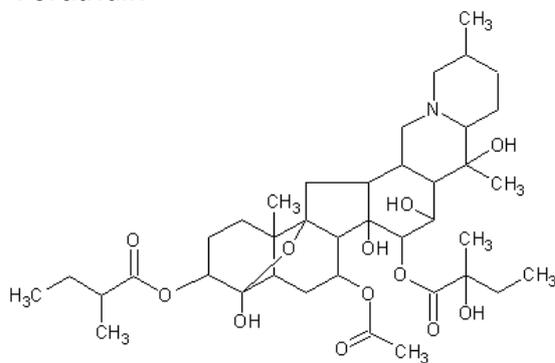
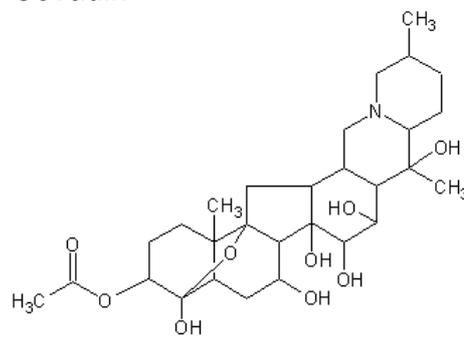
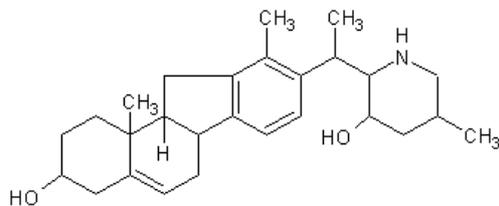


	R1	R2	R3	R4	R5
Germin	H	OH	OH	H	H
Veracevin	H	H	H	OH	OH

Abb. 9

Grundstrukturen der untersuchten Cerveratrum-Alkaloide. Veratridin und Cevadin leiten sich vom Veracevin ab, Germitrin und Germin-3-Acetat leiten sich vom Germin ab.

Jerveratrum-Alkaloide sind sekundäre Amine, deren Grundstrukturen bedeutend weniger Hydroxylgruppen enthalten (1 bis 3). Sie finden sich in unhydrolysierten Pflanzenextrakten als freie Amine oder als Glukoalkaloide, d.h. in Kombination mit einem Molekül D-Glukose. Aus der Gruppe der Jerveratrum-Alkaloide wurde Veratramin untersucht (Strukturformel s. Abb. 10).

Ceveratrum-Alkaloide:**Veratridin****Cevadin****Germitrin****Germin-3-acetat****Jerveratrum-Alkaloide:****Veratramin****Abb. 10**

Strukturformeln der untersuchten Ceveratrum- und Jerveratrum-Alkaloide.

1.4.1.4 Pharmakologische Charakterisierung der Veratrum-Alkaloide

Pharmakologisch haben Ceveratrum-Alkaloide und Jerveratrum-Alkaloide grundlegend unterschiedliche Wirkungen. Ceveratrum-Alkaloide modulieren sehr spezifisch spannungsabhängige Natrium-Kanäle, während Jerveratrum-Alkaloide andersartige Wirkungen zeigen.

Unter den **Ceveratrum-Alkaloiden** ist Veratridin am besten untersucht. In niedrigeren Konzentrationen (im nanomolaren Bereich) führt Veratridin zu

Nachdepolarisationen indem es die Inaktivierung der Natriumkanäle während der Depolarisation und Repolarisation verzögert. Andere Ceveratrum-Alkaloide haben eine ähnliche Wirkung. Dabei scheinen die Art und Anzahl der Estergruppen eine Rolle zu spielen. Germin-3-Acetat führt zu einer relativ kurzen, Veratridin und Cevadin zu einer länger andauernden Nachdepolarisation. Außerdem scheint auch durch eine steigende Anzahl an Estergruppen die Wirkung verstärkt und die Dauer der Nachdepolarisation verlängert zu werden. In sehr hohen Konzentrationen zeigt Veratridin zwei Effekte: Es verschiebt die Aktivierung des Natrium-Kanals zu negativeren Potentialen und blockiert dessen Inaktivierung. Das führt zu einer spontanen Öffnung des Natrium-Kanals bereits beim Ruhemembranpotential (Ulbricht, 1969).

Am Herzen wirken die Ceveratrum-Alkaloide durch die Modulation des Natrium-Kanals positiv inotrop (Honerjäger, 1982).

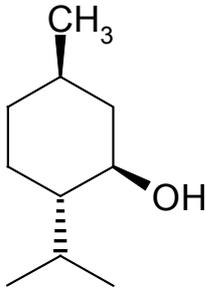
Einige **Jerveratrum-Alkaloide**, darunter Veratramin, können dagegen die Wirkung von Ceveratrum-Alkaloide antagonisieren (Honerjäger, 1982). Am Herzen wirkt Veratramin negativ inotrop (Gödecke, 1997). Mit Veratramin kann die durch Adrenalin und Noradrenalin am Herzen erzeugte Frequenzsteigerung wieder aufgehoben werden (Kraye, 1950). Außerdem können höhere Dosen einen besonderen periodischen Rhythmus am Sinusknoten induzieren, der von Phasen ohne elektrischer Aktivität und Phasen mit normalem Sinus-Rhythmus geprägt ist (Sures *et al.*, 1979; Thron *et al.*, 1999; Thron *et al.*, 1998).

Von Gödecke wurde gezeigt, dass Veratramin glattmuskuläre und vermutlich auch kardiale Calcium-Kanäle blockieren kann. Außerdem wurde von Gödecke aufgrund von Versuchen am Herzmuskel geschlossen, dass Veratramin auch eine Kalium-Kanal-blockierende Wirkung besitzt (Gödecke, 1997).

1.4.2 Menthol

Abb. 11

Strukturformel von (-)-Menthol



(-)-Menthol ((1R, 2S, 5R)-2-Isopropyl-5-methylcyclohexanol) ist das natürlich vorkommende Isomer des Menthols und ein Hauptbestandteil des Pfefferminzöls (Wagner, 1999). Es existieren mentholhaltige Arzneipräparate, denen u.a. eine spasmolytische, choleretische und schmerzstillende Wirkung zugeschrieben wird. Zum Beispiel kann sich Pfefferminzöl, das in magensaftresistenten Kapseln verabreicht wird, positiv bei Colon irritabile auswirken (Dew *et al.*, 1984; Pittler *et al.*, 1998; Rees *et al.*, 1979). Es wirkt spasmolytisch auf die glatte Muskulatur des Gastrointestinal-Traktes und der Trachea (Reiter *et al.*, 1985; Taylor *et al.*, 1985). Die spasmolytische Wirkung auf die Muskulatur der Atemwege macht man sich bei Erkältungen zunutze. Lokale Applikation mentholhaltige Zubereitungen führen durch das Hervorrufen eines Kältegefühls zu einer subjektiven Verbesserung erkältungsbedingter Beschwerden (Hänsel, 1991).

1.4.2.1 Pharmakologische Charakterisierung von (-)-Menthol

Auf pharmakologischer Ebene wurde für (-)-Menthol im μM -Bereich eine Calcium-Kanal-hemmende Wirkung gefunden. So hemmte (-)-Menthol z.B. die Kalium-induzierte Calcium-Aufnahme an neuronalen Präparaten und reduzierte die Kalium- und/oder elektrisch induzierten Kontraktionen am Ileum und am Herzen des Meerschweinchens (Hawthorn *et al.*, 1988). Von Swandulla *et al.* (1987; 1986) konnte durch elektrophysiologische Messungen gezeigt werden, dass (-)-Menthol die Inaktivierung von HVA-Calcium-Kanälen beschleunigt und den Calcium-Einstrom über LVA-Calcium-Kanäle hemmt. Gödecke (Gödecke, 1997) fand, dass Menthol den Calcium-Strom durch kardiale und glattmuskuläre Calcium-Kanäle vermindert und zusätzlich eine hemmende Wirkung auf Kalium-Kanäle besitzt. Auf die Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern scheint (-)-Menthol dagegen keinen Einfluss zu haben (Taylor *et al.*, 1985). Am isolierten sarkoplasmatischen Retikulum allerdings induzierte (-)-Menthol in Konzentrationen über $700 \mu\text{M}$ eine Calcium-Freisetzung (Palade, 1987). Tsuzuki *et al.* (2004) beobachteten eine durch (-)-Menthol ($200 \mu\text{M}$) induzierte Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration an kultivierten Neuronen des Spinalganglions, die sowohl durch Einstrom von extrazellulärem Calcium als auch durch Mobilisierung von Calcium aus intrazellulären Speichern zustande zu kommen scheint.

Eine weitere wichtige und interessante Wirkung von (-)-Menthol besteht in der Beeinflussung von TRP-Kanälen. Die pharmakologische Beeinflussung von TRP-Kanälen könnte ein weites Feld von Behandlungsmöglichkeiten eröffnen, weshalb das wissenschaftliche Interesse an der Erforschung dieses Gebietes in letzter Zeit immer mehr gestiegen ist.

TRP-Kanäle zeigen eine große Vielfalt und lassen sich in 6 Unterfamilien unterteilen (TRPM, TRPC, TRPV, TRPA, TRPP, TRPML). Es sind teilweise recht spezifische, teilweise aber auch unspezifische Ionenkanäle, die in den unterschiedlichsten Zellen (erregbar und nicht erregbar) exprimiert werden. TRP-Kanäle haben 6 Transmembran-Domänen, 4 Untereinheiten formen eine Pore. Trotz struktureller Ähnlichkeit haben sie auch innerhalb der Unterfamilien unterschiedlichste Funktionen (vgl. Clapham, 2007; Fleig *et al.*, 2004).

Für (-)-Menthol ist v.a. bekannt, dass es durch Aktivierung des TRPM8-Kanals ein Kältegefühl hervorrufen kann (McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002). Dieser TRPM8-Kanal wird ab Temperaturen unter 26°C aktiviert und ist besonders für Ca^{2+} permeabel, aber auch für Na^+ und K^+ . Er wird in verschiedenen Geweben exprimiert, z.B. in sensorischen Nervenbahnen, aber auch in der Prostata und der Blase. In der Prostata spielt er eine Rolle als Marker für die Progression des Prostata-Karzinoms (Bidaux *et al.*, 2007; Bidaux *et al.*, 2005).

Menthol kann allerdings auch auf andere TRP-Kanäle wirken: So kann es z.B. den TRPV3-Kanal aktivieren (Macpherson *et al.*, 2006). Dieser Kanal ist auch Temperatur-sensitiv. Er wird zwischen 23°C und 29°C aktiviert und ist ein unselektiver Ionenkanal. Vermutlich ist er an der Temperaturempfindung der Haut beteiligt (Clapham, 2007).

Am TRPA1-Kanal zeigte (-)-Menthol eine bivalente Wirkung: Bei Konzentrationen im unteren mikromolaren Bereich wirkt es als Agonist, in höheren Konzentrationen dagegen als Antagonist (Karashima *et al.*, 2007). Der TRPA1-Kanal wird von Scharfstoffen wie Zimtaldehyd, Gingerol und Eugenol und eventuell auch bei Temperaturen unter 18°C aktiviert. Außerdem spielt er eine Rolle bei entzündungsbedingten Schmerzen.

Die Wirkung auf andere TRP-Kanäle als den TRPM8-Kanal könnte auch eine Art von brennendem Schmerz erklären, den (-)-Menthol neben dem Kältegefühl hervorrufen kann. Die Hemmung des TRPA1-Kanals in höheren Konzentrationen könnte zu der schmerzstillenden Wirkung von (-)-Menthol beitragen (Karashima *et al.*, 2007; Macpherson *et al.*, 2006).

1.4.3 Protonen

Es ist bekannt, dass die extrazelluläre Protonen-Konzentration Ionenkanäle beeinflussen kann.

So zeigen Protonen eine hemmende Wirkung auf spannungsabhängige Ionen-Kanäle. Als Ursache für diese hemmende Wirkung werden in der Literatur verschiedene Mechanismen diskutiert: Protonen können an negative Gruppen binden und so das Oberflächenpotential herabsetzen oder Bindungsstellen für andere positiv geladene Ionen an den entsprechenden Ionen-Kanälen besetzen. Eine weitere Theorie ist, dass Protonen direkt in der Pore der Ionen-Kanäle an negative Gruppen binden und so den Ionen-Einstrom blockieren. Außerdem könnte eine Protonen-bedingte Konformationsänderung die Öffnung von Ionen-Kanälen beeinflussen. Spannungsabhängige Calcium-Kanäle scheinen besonders sensitiv gegenüber Änderungen im pH-Wert zu sein. Neben Unterschieden in der Beeinflussung der Wirkstärke an verschiedene Ionen-Kanälen wurden auch Unterschiede an verschiedenen Subtypen von Calcium-Kanälen gefunden (Döring *et al.*, 2007). Eine allgemeine Herabsetzung des Oberflächen-Potentials als alleinige Ursache ist somit eher unwahrscheinlich. In Übereinstimmung mit dem hemmenden Effekt auf spannungsabhängige Ionen-Kanal wurde ein hemmender Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit und Neurotransmitter-Freisetzung im ZNS gefunden (Tombaugh *et al.*, 1996).

Am Nebennieren-Mark führt eine Verminderung des extrazellulären pH-Wertes allerdings zu einem Anstieg der Katecholamin-Freisetzung. Fujiwara *et al.* (1994) fanden am Nebennieren-Mark der Ratte eine pH-induzierte Freisetzung im Bereich von pH 7,0 bis pH 6,4, die mit einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration in chromaffinen Zellen einherging, aber nicht durch Dihydropyridin-sensitive Calcium-Kanäle beeinflusst wurde. In diesem Zusammenhang könnten auch pH-sensitive Ionenkanäle, die nicht spannungsabhängig sind und bei niedrigem pH-Wert öffnen, eine Rolle spielen.

1.4.4 Magnesium

Im menschlichen Körper ist ca. 24 bis 28 g Magnesium vorhanden. Etwa 50% davon befinden sich in den Knochen, wovon ein großer Teil als rasch austauschbarer Magnesium-Speicher dient. Dadurch wird u.a. der Serummagnesium-Spiegel (0,7 bis 1,0 mM) aufrechterhalten. Ein Teil (ca. 66%) des Serum-Magnesiums liegt ionisiert, der andere Teil gebunden vor. Bei Magnesium-Mangel können zahlreiche Symptome auftreten, so dass man von einem Magnesium-Mangel-Syndrom sprechen kann. Zu den Symptomen gehören neuromuskuläre, gastrointestinale und kardiovaskuläre Beschwerden. So kann es z.B. zu gesteigerter Erregbarkeit, Tetanie mit

Muskelkrämpfen, Nervosität oder Depression kommen. Gastrointestinal können Spasmen im Magen-Darmtrakt auftreten. Außerdem kann ein zu niedriger Magnesium-Spiegel zu Hypertonie und Herzrhythmusstörungen führen. Eine Gesamt-Magnesium-Konzentration von 0,7 – 1,0 mM im Serum gilt als normal. Studien zeigen aber, dass eine Konzentration von 0,8 mM angestrebt werden sollte. So zeigt z.B. die „Arteriosclerosis Risk in Communities“ – Studie (ARIC - Studie), dass bei einem Magnesium-Spiegel von 0,8 mM seltener Angina Pectoris auftritt. Eine Hypomagnesiämie kann primär durch eine angeborene Magnesium-Verlusterkrankung entstehen. Ein sekundär erworbener Magnesium-Mangel kann z.B. durch mangelnde Zufuhr über die Nahrung, durch verminderte Resorption oder vermehrte renale Ausscheidung z.B. bei Diabetes mellitus oder auch durch Diuretika-Gabe entstehen. Auch Stress und ein damit verbundener hoher Katecholamin-Spiegel führt zu einer Verminderung des Magnesium-Spiegels. Andererseits haben zahlreiche Untersuchungen gezeigt, dass sich ein hoher Magnesium-Spiegel auf stressbedingte Symptome positiv auswirken kann. Zum Beispiel kann dadurch stressbedingten kardiovaskulären Symptomen vorgebeugt oder die Entstehung von Stress-Ulzera vermindert werden (Classen, 1982; Jacob, 1979). Eine Hypermagnesiämie ist eher selten und wird v.a. bei Nierenerkrankungen, die zu einer verminderten Ausscheidung führen, beobachtet.

Oral wird Magnesium nicht nur als Laxans und bei Muskelverspannungen gegeben. Studien haben z.B. gezeigt, dass eine orale Magnesium-Substitution bei, funktionalen Herzbeschwerden (z.B. Tachykardien, Extrasystolen) (Antoni *et al.*, 1989), Hypertonie (Sontia *et al.*, 2007) Osteoporose (Stendig-Lindberg *et al.*, 1993) und zur Migräneprophylaxe (Peikert *et al.*, 1996; Taubert, 1994) sinnvoll sein kann. Bei oraler Magnesium-Gabe ist aufgrund der sehr stabilen Regulation nicht zu erwarten, dass die Serumkonzentration über 1,0 mM ansteigt. Dadurch ist außer bei schweren Nierenleiden, die zu einer verminderten Ausscheidung von Magnesium führen, nicht mit Nebenwirkungen zu rechnen. Eine orale Magnesium-Substitution ist v.a. bei Lebensumständen oder Krankheiten, die eine eher niedrige Magnesium-Bilanz zur Folge haben, sinnvoll.

Parenteral angewendet hat Magnesium seinen festen Platz bei der Therapie von Arrhythmien wie Torsade-de-Pointes-Tachycardien und bei der Behandlung von Eklampsie (Fawcett *et al.*, 1999).

Magnesium spielt eine entscheidende Rolle als Cofaktor von Enzymen und ist an allen ATP-abhängigen Stoffwechsel-Vorgängen beteiligt. Darüber hinaus stellt Magnesium den natürlichen Antagonisten des Calciums dar. Sowohl Magnesium als auch Calcium sind Elemente der zweiten Hauptgruppe und liegen im Körper als zweiwertige Ionen vor. Magnesium hat aber einen kleineren Radius als Calcium und ist somit auch stärker hydratisiert. Es konkurriert mit Calcium an verschiedenen Calcium-Bindungsstellen, zeigt dabei aber unterschiedliche Wirkstärke. Am spannungsabhängigen L-Typ-Calcium-Kanal hat Magnesium eine direkte Wirkung (Dichtl *et al.*, 1991). Es kann sich extrazellulär locker an den Kanal anlagern und durch seine große Hydrathülle den Zugang versperren oder die Hydrathülle

abstreifen und an eine spezifische Bindungsstelle in der Pore des Calcium-Kanals binden. Als zweiwertiges Ion kann es Chelat-Komplexe mit den Phospholipiden der Zellmembran eingehen und wirkt so membranstabilisierend. Dabei kann Magnesium das Mikropotential an der Zellmembran beeinflussen. Es neutralisiert negative Ladungen an der Membranoberfläche, die von negativ geladenen Phospholipiden herrühren. Dadurch wird die Potentialdifferenz zwischen Intra- und Extrazellulärraum (innen negativ, außen positiv) erhöht. Um eine Öffnung von spannungsabhängigen Ionenkanälen zu bewirken, muss das Membranpotential dadurch stärker vermindert werden. Somit wird die Erregbarkeit der Zelle reduziert. (Muller *et al.*, 1974; Sontia, 2005; Vierling *et al.*, 1987).

1.4.5 Hypothetische Beeinflussung der Katecholamin-Freisetzung

Ceveratrum-Alkaloide führen zu einer Verstärkung des Natrium-Einstroms in die Zelle und so z.B. zu einer positiv inotropen Wirkung am Herzen. Durch die Verstärkung des Natrium-Einstroms könnte es auch an sympathischen Nervenbahnen oder am Nebennieren-Mark zu einer Steigerung der intrazellulären Calcium-Konzentration und somit zu einer verstärkten Katecholamin-Freisetzung kommen. Am Ductus deferens der Ratte konnte bereits gezeigt werden, dass Veratridin die Freisetzung von Noradrenalin induzieren kann (Bönisch *et al.*, 1983). Hier wurden jedoch hohe Konzentrationen (bis 100 µM) verwendet, bei denen es wahrscheinlich zu einer Depolarisation der Zelle kommt. Deshalb sollten in dieser Arbeit die Wirkung bei niedrigem Konzentrationsbereich untersucht werden, in dem die Verzögerung der Inaktivierung des Natrium-Kanals relevant ist. Das **Jerveratrum-Alkaloid** Veratramin zeigte dagegen in bisherigen Untersuchungen hemmende Eigenschaften am Calcium-Kanal wodurch die Freisetzung eher vermindert werden könnte. Außerdem ist aufgrund der gegensätzlichen Wirkungen von Ceveratrum- und Jerveratrum-Alkaloiden von Interesse, wie sich der **Gesamtextrakt** auf die Freisetzung auswirkt.

(-)-Menthol könnte die Freisetzung sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Als Folge einer Calcium-Kanal-hemmenden Wirkung könnte die Katecholamin-Freisetzung vermindert werden. Aufgrund der Wirkung auf TRP-Kanäle wäre aber auch eine steigernde Wirkung von (-)-Menthol auf die Katecholamin-Freisetzung denkbar.

Die **extrazelluläre Protonen-Konzentration** könnte aufgrund der bekannten hemmenden Wirkung auf spannungsabhängige Ionen-Kanäle die Katecholamin-Freisetzung an sympathischen Neuronen vermindern. Am Nebennieren-Mark konnte ein niedriger pH-Wert allerdings eine Katecholamin-Freisetzung induzieren. Somit wäre auch bei einer Erhöhung der Protonen-Konzentration sowohl eine hemmende als auch eine steigernde Wirkung auf die Freisetzung denkbar.

Magnesium als physiologischer Calcium-Antagonist kann die Freisetzung von Neurotransmittern hemmen. So ist es bereits seit langem bekannt, dass es die Acetylcholin-Freisetzung an der motorischen Endplatte reduziert (Hubbard *et al.*, 1968). Aufgrund der Wirkung von Magnesium gibt es außerdem zahlreiche Hinweise, dass auch die Katecholamin-Freisetzung beeinflusst wird. Allerdings existieren nur wenige Studien, die sich direkt mit diesem Effekt beschäftigen (Douglas *et al.*, 1963). Hier wäre es auch von Interesse, wie sich eine Beeinflussung der Katecholamin-Freisetzung von einem direkten Einfluss auf die glatte Muskulatur unterscheidet und ob auch eine Calcium-Kanal-unabhängige Freisetzung moduliert werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Herstellung der verwendeten Lösungen

2.1.1 Nährlösungen und Stimulationslösungen

Bei den Nährlösungen handelt es sich um modifizierte Krebs-Henseleit-Lösungen (Krebs, 1932). Die Herstellung erfolgte durch Auflösen der Salze und Substanzen in demineralisiertem Wasser. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die Zusammensetzung der Lösungen.

	A	B	C	D	E	F
NaCl	114,9	114,9	4,7	40,8	50,8	140
KCl	4,7	4,7	114,9	78,8	68,8	4,7
CaCl ₂	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
NaHCO ₃	24,9	24,9	24,9	24,9	24,9	--
KH ₂ PO ₄	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
MgCl ₂	--	1,2	--	--	--	--
HEPES	--	--	--	--	--	0,005
Glucose	10	10	10	10	10	10

Tabelle 1

Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Nährlösungen variiert nach Krebs-Henseleit in mM. Lösungen A bis E wurden mit Carbogen begast, Lösung E wurde mit Sauerstoff begast.

Lösung A enthielt kein Magnesium und diente als Standardlösung für die Kontraktionskraft-Messungen am Ductus deferens, für die Perfusion der Nebennieren-Schnitte zur Untersuchung der Katecholamin-Freisetzung mittels HPLC und für die elektrochemischen Messungen an chromaffinen Zellen. Falls nicht anders angegeben, wurde diese Lösung als Ausgangslösung für die oben genannten Versuche verwendet.

Lösung B enthielt 1,2 mM Magnesium und diente zur Präparation der Nebennieren-Schnitte und zur Aufbewahrung dieser Präparate bis zu ihrer Verwendung.

Für **Lösung C** wurde gegenüber der Standardlösung (Lösung A) die Konzentration von NaCl und KCl ausgetauscht. Diese Lösung diente zur Stimulation der

Katecholamin-Freisetzung bei der Voltammetrie an Nebennieren-Schnitten und bei der HPLC-gestützten Untersuchung der Katecholamin-Freisetzung.

Lösung D und E wiesen jeweils eine erhöhte KCl und eine erniedrigte NaCl Konzentration gegenüber Lösung A auf und wurden zur Stimulation der Freisetzung an PC12-Zellen verwendet.

Für **Lösung F** wurde HEPES als Puffersystem verwendet. Dadurch konnte mit 0,1 M Natronlauge und/oder 0,1 M Salzsäure ein definierter pH-Wert unter Verwendung eines pH-Meters der Firma Beckmann eingestellt werden. Sie dienten deshalb zur Untersuchung des pH-Einflusses bei Kontraktionskraft-Messungen am Ductus deferens und bei elektrochemischen Messungen an chromaffinen Zellen. Um eine Eigenwirkung von HEPES zu vermeiden, wurde eine niedrige HEPES-Konzentration verwendet. Durch mehrmaliges Nachmessen des pH-Wertes nach der Durchführung der Kontraktionskraft-Messungen am Ductus deferens wurde überprüft, ob eine ausreichende Stabilisierung des pH-Wertes gegeben war. Hier ergab sich eine maximale Abweichung des pH-Wertes um 0,07 gegenüber dem zuvor eingestellten pH-Wert.

Außerdem kamen noch Lösungen folgender Substanzen zur Stimulation der Katecholamin-Freisetzung an Nebennieren-Schnitten und an PC12-Zellen und/oder zur Kontraktionsauslösung am Ductus deferens zum Einsatz:

- Carbachol
- DMPP
- Oxotremorin
- Noradrenalin-Hydrochlorid
- Tyramin-Hydrochlorid

Für die elektrochemischen Messungen und die HPLC-Untersuchungen wurden die Substanzen in der gewünschten Endkonzentration direkt in Lösung A gelöst. Bei den Kontraktionskraft-Messungen am Ductus deferens wurden höher konzentrierte Stammlösungen mit demineralisiertem Wasser angefertigt und in die Organbäder zupipettiert. Die Noradrenalin-Stammlösung enthielt zusätzlich 0,28 mM Ascorbinsäure als Antioxidans.

2.1.2 Testlösungen

Zunächst wurden konzentrierte Stammlösungen der Testsubstanzen in der Regel mit demineralisiertem Wasser ggf. unter Verwendung von DMSO als Lösungsvermittler hergestellt. Bei den Stammlösungen der Veratrum-Alkaloide wurde zunächst die entsprechende Substanz mit einer equimolaren Menge 1 M HCl gelöst und anschließend auf das gewünschte Volumen aufgefüllt.

Bei den Kontraktionskraft-Messungen am Ductus deferens wurden die höher konzentrierten Stammlösungen (Übersicht s. Tabelle 2) sequenziell oder kumulativ in die Organbäder zupipettiert.

Für die elektrochemischen Messungen und die HPLC-Untersuchungen wurden Verdünnungen in den gewünschten Endkonzentrationen (Übersicht s. Tabelle 3) mit den entsprechenden Stimulationslösungen hergestellt.

A

	MgCl	(-)-Menthol (Lösungsmittel)	Veratridin	Veratramin	Cevadin	Germin-3-Monoacetat	Germitrin	ω -Conotoxin GVIA
Stammlösung 1	600	20 (100% DMSO)	0,1	1	1	100	0,01	0,01
Stammlösung 2	--	2 (10% DMSO)	1	--	0,1	--	0,1	0,001
Stammlösung 3	--	--	--	-	--	--	--	0,0001

B

	Amlodipin (Lösungsmittel)	Icilin (Lösungsmittel)	NF 279	Prazosin (Lösungsmittel)
Stammlösung 1	1 (100% DMSO)	0,01 (0,2% DMSO)	1	4 (50% DMSO)
Stammlösung 2	0,1 (10% DMSO)	0,1 (0,4% DMSO)	--	0,1 (1% DMSO)
Stammlösung 3	0,01 (1% DMSO)	0,2 (0,8% DMSO)	--	0,2 (2% DMSO)

Tabelle 2

A und B: Bei Kontraktionskraft-Messungen am Ductus deferens verwendete Stammlösungen der untersuchten Substanzen. Angegeben sind die Konzentrationen in mM. Die gewünschte Endkonzentration im Organbad wurde durch zupipettieren entsprechender Volumina erreicht. Falls nicht anders dargestellt, wurde als Lösungsmittel demineralisiertes Wasser verwendet.

Tubocurarin	MgCl	Veratridin	Veratramin	(-)-Menthol	Icilin	Capsazepin
50	600	0,5	10	100	0,5	30
--	1200	--	80	500	2,5	--
--	9600	--	--	--	--	--

Tabelle 3

Übersicht über verwendete Substanzen und Endkonzentrationen in μ M bei elektrochemischen Messungen und/oder bei HPLC-Untersuchungen.

2.1.3 Standardlösungen für voltammetrische Untersuchungen

Die Standardlösungen für die arbeitstägliche Drei-Punkt-Kalibrierung wurden folgendermaßen hergestellt:

Stammlösung:

0,00229 g Adrenalin (genau gewogen) wurden in einem Messkolben zunächst in 70 μ l 1M HCl gelöst und auf 25,0 ml mit Nährlösung ohne Magnesium (Lösung A, Tabelle 1) aufgefüllt.

Aus dieser Stammlösung wurden folgende Standardlösungen durch Verdünnung mit Nährlösung (Lösung A, Tabelle 1) hergestellt

Standardlösung 1: 2 ml Stammlösung ad 25,0 ml

Standardlösung 2: 5 ml Stammlösung ad 50,0 ml

Standardlösung 3: 15 ml Stammlösung ad 25,0 ml

Die Standardlösungen wurden sofort nach Herstellung vermessen, um eine Oxidation des Adrenalins zu vermeiden.

2.1.4 Lösungen für die Zellkultur

Poly-D-Lysin-Lösung:

10 mg wurden in 100 ml gereinigtem (MilliQ-Anlage, Firma Millipore, Schwalbach, Deutschland) und autoklaviertem Wasser gelöst und anschließend steril filtriert.

PBS – Puffer:

Der verwendete PBS-Puffer hatte folgende Zusammensetzung:

NaCl	4 g
HCl	0,1 g
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	0,72 g
KH ₂ PO ₄	0,12 g
H ₂ O (gereinigt, autoklaviert)	ad 500 ml

Mit 1M HCl wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und der PBS-Puffer anschließend autoklaviert.

2.1.5 Lösungen für SDS-Gelelektrophorese und Westernblot

Folgende Lösungen wurden durch Auflösen der Substanzen in gereinigtem Wasser (Milli-Q-Anlage, Firma Millipore) hergestellt. Der pH-Wert wurde mit 1M NaOH bzw. 1M HCl eingestellt.

4 x Tris/HCl/SDS (pH 8,8):	
Tris	18,2 g
SDS	0,4 g
Wasser	ad 100 ml

4 x Tris/HCl/SDS (pH 6,8):	
Tris	3,02 g
SDS	0,2 g
Wasser	ad 50 ml

10 x Elektrophoresepuffer	
Tris	30,2 g
Glycin	144 g
Natriumdodecylsulfat	10 g
Wasser	ad 1000 ml

10 x TBS (pH 8,2):	
Tris	12,1 g
NaCl	87,6 g
Wasser	ad 1000 ml

1 x TBST	
10x TBS	100 ml
Tween 20	1 ml
Wasser	ad 1000 ml

6 x Denaturierungspuffer (Laemmli, 1970):	
4x Tris/HCl/SDS (pH 6,8)	7 ml
Bromphenolblau	1,2 mg
Glycerol	3,6 ml
DTT	0,93 g
Wasser	ad 10 ml

Anoden-Lösung 1 (pH 10,4)	
Tris	36,3 g
Methanol	200 ml
Wasser	ad 1000 ml

Anoden-Lösung 2 (pH 10,4):	
Tris	3,03 g
Methanol	200 ml
Wasser	ad 1000 ml

Kathoden-Lösung (pH 7,6)	
Tris	3,03 g
6-Aminohexansäure	5,2 g
Methanol	200 ml

Verdünnungslösung für Antikörper	
BSA	2,5 g
NaN ₃	25 µl
TBST	ad 50 ml

2.2 Chemikalienverzeichnis

Acrylamide/Bis-AA, 30% sol.	Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Adrenalin	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
6-Aminohexansäure	Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Amlodipin	Fa. Biomole, Hamburg, Deutschland
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Bromphenolblau	Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
BSA (Bovine serum albumin)	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Capsazepin	Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Carbachol (Carbamoylcholin-Chlorid)	Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Cevadin	Überlassen von Prof. Dr. Otto Kraye, Boston, USA
Collagen G	Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland
ω-Conotoxin GVIA	Fa. Bachem Distribution, Weil am Rhein, Deutschland
DMPP (1,1-Dimethyl-4-Phenylpiperaziniumiodid)	Fa. Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
DTT (Dithiothreitol)	Fa. Gerbu Biochemicals GmbH, Gaiberg, Deutschland
Dulbecco`s MEM 1x (modified eagle medium)	Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland
FCS (fetal calf serum)	Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland
Germin-3-Monoacetat	Fa. Merck Sharp & Dohme Research Lab., Rathway, N.J.
Germitrin	Fa. Ayerst, McKenna & Harrison, Ltd., Montreal, Quebec
Glyoxylsäure	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure)	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Horse Serum	Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland
Icilin	Fa. Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Kaliumchlorid	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Kalium-Dihydrogenphosphat	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
(-)-Menthol	Fa. Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
NaN₃ (Natriumazid)	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid:	Fa. Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Hydrogencarbonat	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
NF 279	Fa. Tocris Bioscience, Ellisville, USA
Noradrenalin	Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Oxotremorin	Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland
Poly-D-Lysin	Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Prazosin Hydrochlorid	Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris (α,α,α-Tris-(hydroxymethyl)-methylamin)	Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
d-Tubocurarin	California Corporation for Chemical Research, USA
Tyramin-Hydrochlorid	
Urtinktur Veratrum album	Fa. Spagyra, Grödig, Österreich
Veratramin	Squibb Institute for Medical Research, New Brunswick, N.J.
Veratridin	Überlassen von Prof. Dr. Otto Kraye, Boston, USA

2.3 Kontraktionskraft-Messungen am isolierten Ductus deferens

2.3.1 Präparation des Ductus deferens

Männliche Ratten (Eigenzucht des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, TU München oder von Charles River, Kisslegg, Deutschland) im Alter von ca. 3-5 Monaten und mit einem Gewicht von 300-500 g wurden mit Ether betäubt und durch Dekapitation getötet. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurden die Hoden und Nebenhoden, wie in Abb. 12 dargestellt, herausgelagert. Dadurch war der Ductus deferens frei zugänglich und ein ca. 1 cm langer Abschnitt konnte unter Vermeidung von mechanischer Belastung herauspräpariert werden. Verwendet wurde der dem Nebenhoden nahegelegene Abschnitt des Ductus deferens.

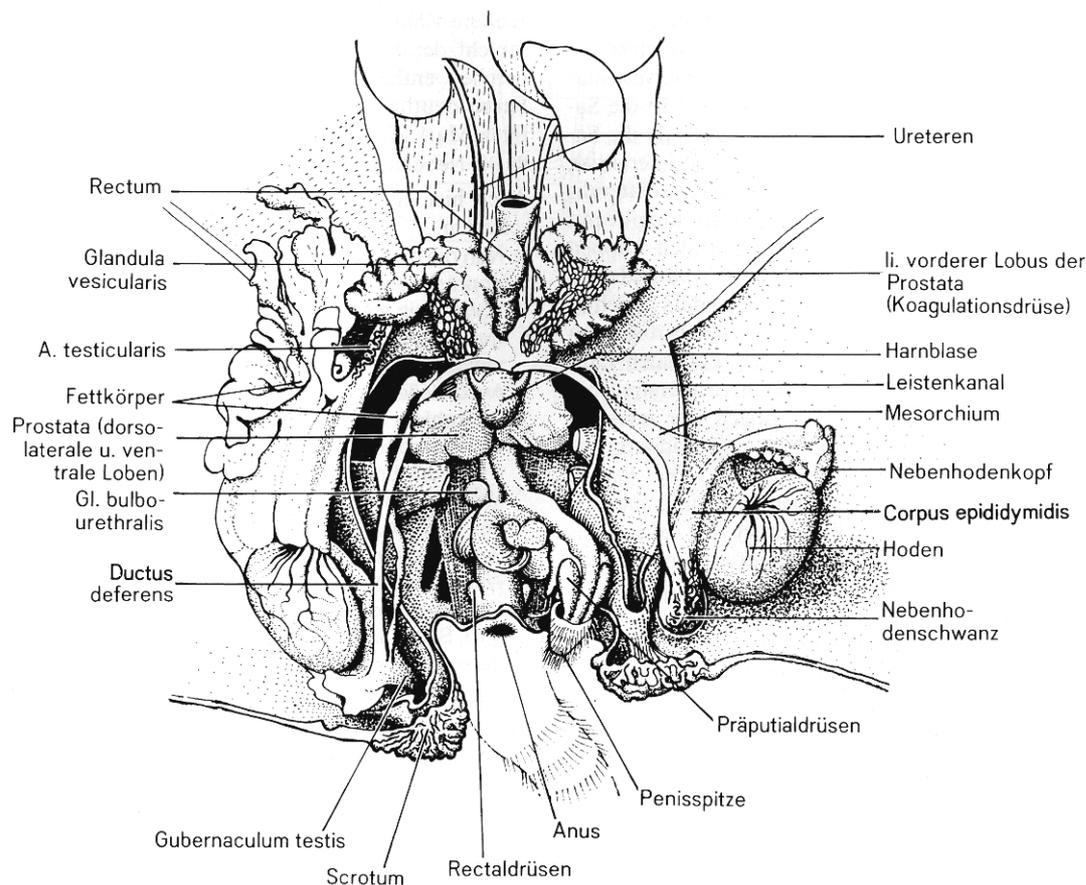


Abb. 12

Schematische Darstellung der Geschlechtsorgane der männlichen Ratte (nach Storch et al., 1999).

2.3.2 Versuchsaufbau

Das für die Kontraktionskraft-Messungen des Ductus deferens verwendete Organbad bestand aus einem Einkammergefäß mit 7 ml Inhalt. Über eine am Boden angebrachte Glasfritte konnte die Kammer ständig mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) durchperlt werden, wodurch der pH-Wert der Badlösung und die Sauerstoffversorgung des Präparats kontrolliert wurde. Das Versuchsgefäß war in einem Wasserbad montiert, das mit Hilfe eines Kontaktthermometers auf konstante 35,0 ± 0,5°C temperiert wurde. Zur Messung der Kontraktionskraft wurden induktive Kraftaufnehmer der Firma Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt, Deutschland verwendet. Durch ein Metallplättchen aus V2A-Stahl an einem Reizfuß aus Plexiglas konnte der Ductus deferens mit der dem Nebenhoden nächsten Seite fixiert werden. Das andere Ende wurde mit einer Mikroklammer aus V2A-Stahl befestigt, die über eine Goldkette mit dem induktiven Kraftaufnehmer verbunden war. Ein mechanischer Feintrieb, mit dem der Abstand zwischen Reizfuß und Mikroklammer variiert werden konnte, ermöglichte das Einstellen einer definierten Vorspannung. Gemessen wurden isometrische Kontraktionen, die durch elektrische Stimulation oder Pharmaka induziert wurden. Die Registrierung erfolgte mit Hilfe des Kraftaufnehmers und Übertragung der Signale auf ein Oszilloskop Typ R5103N der Firma Tektronix, Köln, Deutschland. Gleichzeitig wurden die Kontraktionen mit einem Pigmentschreiber (Firma Hellige, Freiburg, Deutschland) oder mit Hilfe eines AD-Wandlers und zugehöriger Software (Firma Data Translation, Bietigheim Bissingen, Deutschland) am Computer aufgezeichnet.

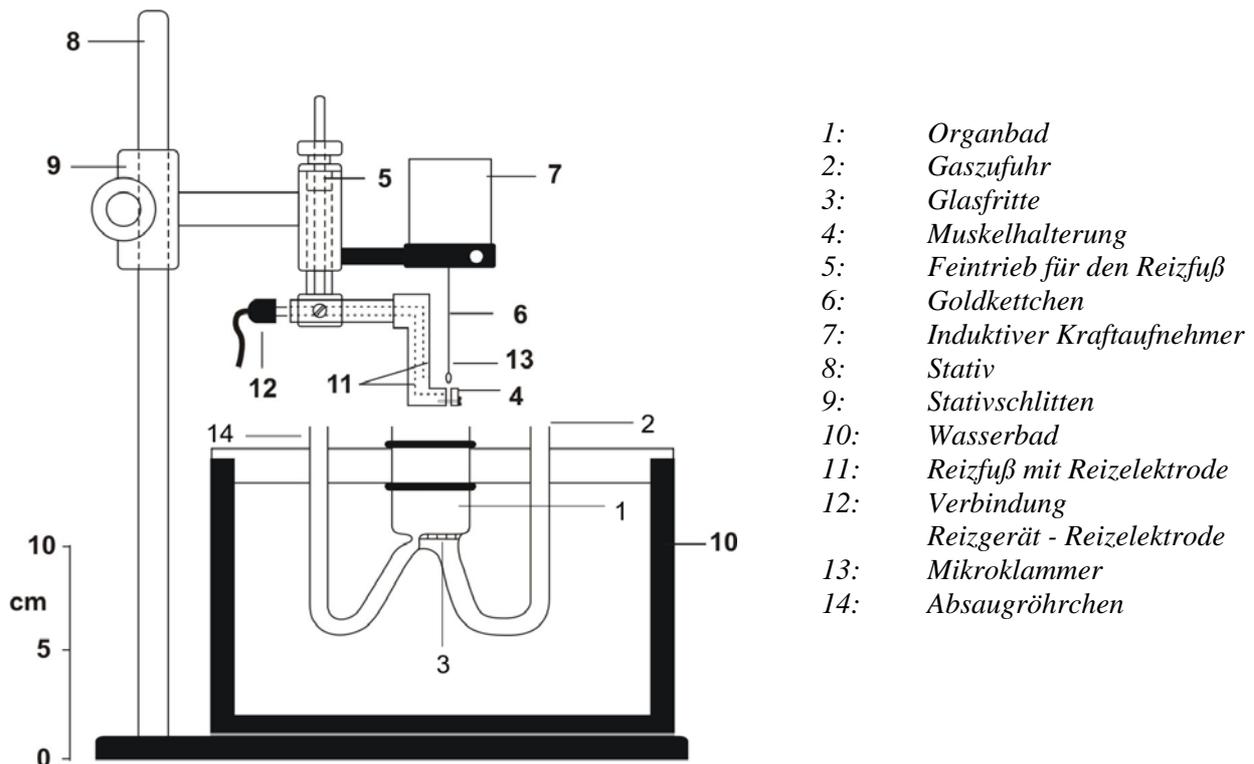


Abb. 13

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für Kontraktionskraft-Messungen.

2.3.3 Versuchsdurchführung

Der Ductus deferens wurde wie oben beschrieben in der Versuchsanordnung fixiert und auf eine Vorlast von 9,8 mN vorgespannt (Blattner *et al.*, 1978). Durch gelegentliches Nachspannen konnte diese Vorlast während des gesamten Versuchs konstant gehalten werden.

2.3.3.1 Elektrische Stimulation

Ein am Institut selbst konstruiertes Reizgerät erzeugte einen Rechteck-Impuls von definierter Stärke und Dauer der über zwei Platin-Elektroden im Reizfuß auf den Muskel übertragen wurde. Sowohl Reizfrequenz als auch Reizstärke und -dauer konnten über Kippschalter und Regler variiert werden. Falls nicht anders beschrieben betrug die Reizstärke 30 V, die Reizfrequenz 0,1 Hz und die Reizdauer 10 ms.

Vor Beginn jedes Versuches äquilibrierten die vorgespannten Muskeln ca. eine halbe Stunde in Nährlösung ohne Magnesium (Lösung A, Tabelle 1), bis sich eine konstante Kontraktionskraft einstellte. Anschließend erfolgte die kumulative Zugabe der zu untersuchenden Substanzen direkt in das Organbad.

Dabei wurde entweder das Erreichen eines steady-state-Zustandes abgewartet oder es wurde nach einem definierten Zeitprotokoll vorgegangen.

2.3.3.2 Stimulation mit Kalium oder durch Zugabe von Pharmaka

Neben der elektrischen Stimulation wurde die Kontraktion durch Zugabe von KCl-, Noradrenalin HCl- oder Tyramin-Lösung (Zusammensetzung s. Tabelle 4) in das Organbad induziert.

Substanz	Konzentration der Lösung (mM)	Endkonzentration im Organbad (mM)
KCl	2000	45
Noradrenalin HCl	10	0,01
Tyramin	10	0,05

Tabelle 4

Zusammensetzung der verwendeten Stimulationslösungen. Die Herstellung der Lösungen erfolgte durch Auflösen der Substanzen in demineralisiertem Wasser. Die Noradrenalin HCl-Lösung wurde zusätzlich mit 0,25 mg/ml Ascorbinsäure versetzt, um einen oxidativen Abbau des Noradrenalins zu verhindern.

Nach Auswaschen der entsprechenden Stimulationslösung und Erreichen der Grundspannung war eine erneute Stimulation möglich. Eine sequenzielle Zugabe der zu untersuchenden Test-Substanzen 5 bis 10 Minuten vor der jeweiligen Stimulation

ermöglichte die Erstellung von Konzentrations-Wirkungskurven. Eine schematische Darstellung des Versuchsprotokolls zeigt Abb. 14.

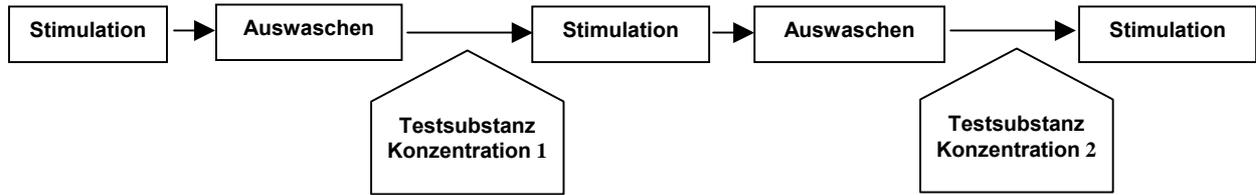


Abb. 14

Schematische Übersicht des bei Stimulation mit KCl oder Pharmaka verwendeten Versuchsprotokolls

Vor Beginn jedes Versuches wurde stets mehrmals mit Kalium, Noradrenalin oder Tyramin stimuliert (in der Regel dreimal) bis zwei aufeinanderfolgende Kontraktionen einen konstanten Wert aufwiesen.

2.3.3.3 Auswertung

Ausgewertet wurde sowohl bei der elektrischen Stimulation, als auch bei der durch Ionen oder Pharmaka induzierten Stimulation die maximale Kontraktionskraft (F_{Cmax}), die sich aus der Differenz zwischen maximaler Zugkraft und Vorspannung ergab (Abb. 15).

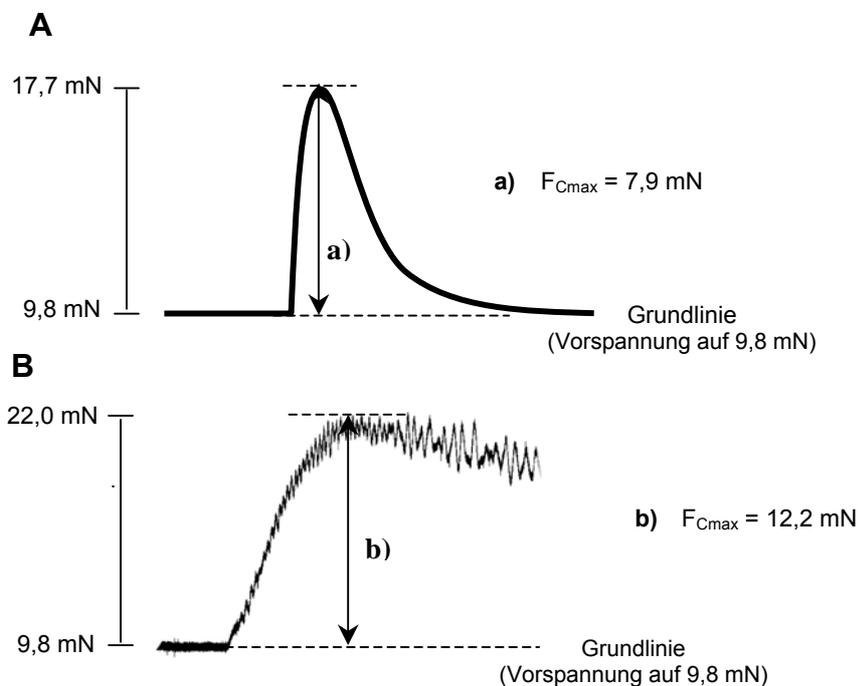


Abb. 15

Einzelbeispiele einer Kontraktion induziert durch elektrische Stimulation (A) und $10 \mu\text{M}$ NA (B). Die maximale Kontraktionskraft F_{Cmax} ergibt sich aus der Differenz zwischen der Peak-Kraft und der Grundspannung.

Bei Verwendung des Pigmentschreibers wurde zunächst die Peakhöhe in mm graphisch ermittelt. Durch eine nach jedem Versuch durchgeführte Kalibrierung mit einem 1000 mg Kalibriergewicht, das einer Kraft von 9,81 mN entspricht, konnte die Kontraktionskraft in mN nach folgender Formel berechnet werden:

$$F_{C_{\max}} = 9,81 \text{ mN} \cdot \frac{h_{\text{peak}}}{h_{\text{kal}}}$$

$h_{\text{peak}} =$ Peakhöhe in mm
 $h_{\text{kal}} =$ Auslenkung durch Kalibriergewicht (1000 mg) in mm

Formel 1

Berechnung der maximalen Kontraktionskraft $F_{C_{\max}}$.

Bei Aufzeichnung und Auswertung mittels des AD-Wandlers und der Software der Firma Data Translation wurde das von den induktiven Kraftaufnehmern erzeugte Mess-Signal direkt am Computer angezeigt. 0,4 V entsprachen dabei 1 g oder 9,81 mN.

2.4 Kontraktionskraft-Messungen am isolierten Papillarmuskel

2.4.1 Präparation des Papillarmuskels

Meerschweinchen (Charles River, Kisslegg, Deutschland) und Ratten (Eigenzucht des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, TU München und von Charles River, Kisslegg, Deutschland) beiderlei Geschlechts wurden durch zervikale Dislokation oder nach Betäubung mit Ether durch Dekapitation getötet. Der Thorax wurde sofort eröffnet, das Herz entnommen und in kalte Nährlösung mit 1,2 mM Mg^{2+} (Lösung B, Zusammensetzung s. Tabelle 1) überführt. Nachdem der Herzbeutel und die Vorhöfe entfernt wurden, wurde die rechte Kammer entlang des Septums geöffnet und der Papillarmuskel entnommen. Dabei wurde an der Basis ein Stück Kammermuskulatur und am anderen Ende ein Rest des Klappenrandes belassen.

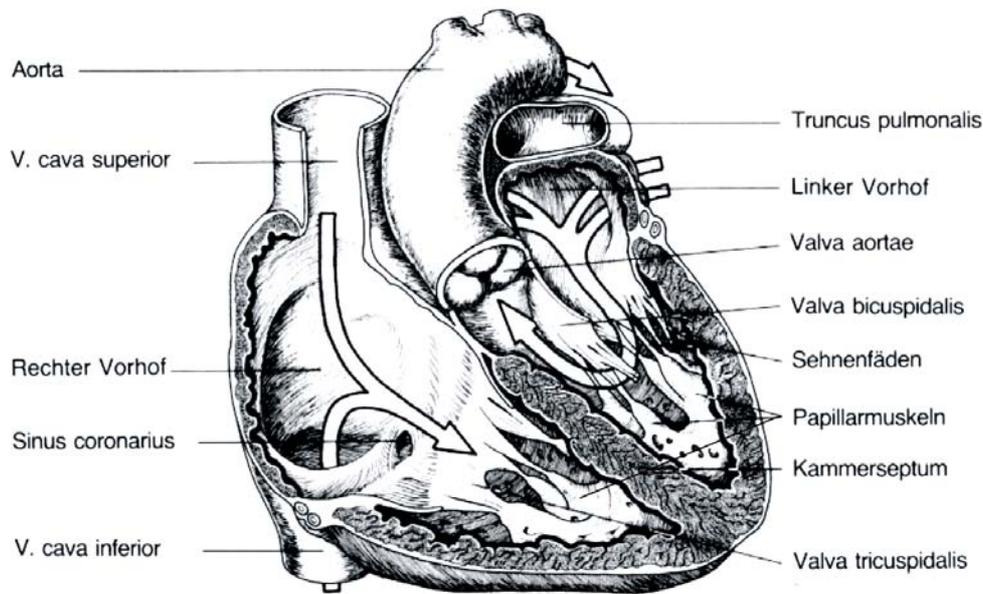


Abb. 16

Frontalschnitt durch das Herz mit eröffneten Vorhöfen und Kammern. Die Pfeile geben die Richtung des Blutstromes an (nach Thews et al., 1999). Für die Versuche wurden Papillarmuskeln der rechten Herzkammer verwendet.

2.4.2 Versuchsaufbau und –durchführung

Für die Versuche wurde die unter 2.3.2 beschriebene Versuchsanordnung verwendet (Abb. 13). Das Papillarmuskel-Ende mit dem Rest der Kammermuskulatur wurde mit dem Metallplättchen aus V2A-Stahl an dem Reizfuß befestigt, das andere Ende wurde analog zu den Versuchen mit dem Ductus deferens mit der Mikroklammer fixiert. Die Vorlast am Papillarmuskel wurde während des gesamten Versuchs konstant auf 3,9 mN gehalten. Die Kontraktion wurde wie unter 2.3.3.1 beschrieben durch elektrische Stimulation ausgelöst. Allerdings betrug die Reizfrequenz 1 Hz und die Reizdauer 2 ms. Die Reizstärke wurde so gewählt, dass sie jeweils knapp über der Reizschwelle des Muskels lag.

2.4.2.1 Kalibrierung und Auswertung

Die Kalibrierung und Auswertung der Versuche erfolgte analog zu den Kontraktionskraft-Messungen am Ductus deferens (siehe 2.3.3.3).

2.5 Elektrochemische Messverfahren an chromaffinen Zellen

2.5.1 Herstellung der Nebennieren-Schnitte

Ratten beiderlei Geschlechts (von Charles River, Kisslegg, Deutschland oder Eigenzucht des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, TU München) im Alter von ca. 3-5 Monaten und mit einem Gewicht von 300-500 g wurden mit Ether betäubt und durch Dekapitation getötet. Beide Nebennieren wurden rasch entnommen und sofort in Nährlösung mit 1,2 mM Mg^{2+} (Lösung B, Zusammensetzung s. Tabelle 1), begast mit Carbogen, überführt und anhängendes Fett und Bindegewebe entfernt.

Danach wurden mit Hilfe eines Mikrotoms, Typ HM 650V, Microm International, Walldorf, Deutschland, mit vibrierender Klinge (Frequenz 90 Hz, Amplitude 1,1 mm) 90 – 110 μm dicke Schnitte angefertigt (Abb. 17). Der Schneidevorgang wurde bei Raumtemperatur in Nährlösung mit 1,2 mM Mg^{2+} (Lösung B, Zusammensetzung s. Tabelle 1), begast mit Carbogen, durchgeführt. Die Schnitte wurden bis zur Verwendung in dieser Lösung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

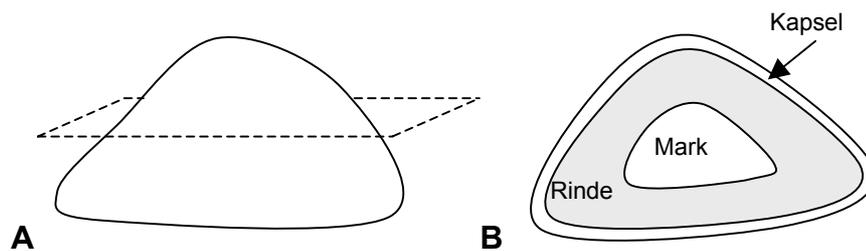


Abb. 17

A: Schnittebene (gestrichelte Linie) durch eine Nebenniere. **B:** Schematischer Aufbau eines Nebennieren-Schnittes (Dicke: 90-110 μm). Dargestellt sind, von außen nach innen, Kapsel, Rinde und Mark der Nebenniere.

2.5.2 Kultivierung von PC12-Zellen

Alle sterilen Arbeitsschritte wurden unter Verwendung von sterilen Einmal-Geräten in einer Werkbank der Firma Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland, durchgeführt.

2.5.2.1 Beschichtung mit Poly-D-Lysin

Durch eine Beschichtung der Zellkulturflaschen und Deckgläschen mit Poly-D-Lysin konnte eine bessere Haftung der PC12-Zellen erzielt werden.

Dazu wurde die zu beschichtende Oberfläche zunächst mit Poly-D-Lysin-Lösung für 20 Minuten im Brutschrank inkubiert und anschließend die Poly-D-Lysin-Lösung durch mehrmaliges Waschen mit PBS-Puffer wieder entfernt.

2.5.2.2 Kultivierung

PC12 Zellen der Firma DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland) wurden in einem Brutschrank (Firma Flow Laboratories) bei 37°C und 6% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Dazu wurden sterile, Poly-D-Lysin-beschichtete Zellkulturflaschen der Firma Biochrom, Berlin, Deutschland mit einem Volumen von 20 ml verwendet. Die Kultivierung erfolgte in Dulbeccos 1x MEM-Medium, das mit 10% Pferde-Serum, 5% FCS, 0,2% Penicillin/Streptomycin und 1% Collagen angereichert wurde.

Bei ca. 90% Konfluenz (alle 2-3 Tage) wurden die Zellen passagiert, wobei der Grad der Konfluenz visuell mit einem inversen Mikroskop (IM 35) der Firma Zeiss, Oberkochen, Deutschland beurteilt werden konnte. Unter Verwendung eines sterilen Zellschabers wurde der Zellrasen vom Flaschenboden gelöst. Die so entstandene Zellsuspension wurde mit einer sterilen Einmalpipette abgesaugt und so lange im Brutschrank in einem Zentrifugenröhrchen in Ruhe stehen gelassen, bis sich ein Großteil der Zellen am Boden des Röhrchens abgesetzt hatte. Überschüssiges Medium wurde entfernt und die Zellen zur Vereinzelung mehrmals mit einer Tuberkulinspritze und einer Kanüle trituriert. Anschließend wurde die konzentrierte Zellsuspension im Verhältnis 1 zu 10 auf die Kulturflaschen verteilt.

Für die Versuche wurde ein Teil der bei der Passage gewonnenen konzentrierten Zellsuspension auf beschichtete Deckgläschen aufgebracht. Um eine ausreichende Haftung der Zellen zu erzielen, lagerten die Deckgläschen für mindestens 24 Stunden vor Verwendung im Brutschrank in Petrischalen mit Nährmedium.

2.5.3 Elektrochemische Messverfahren

2.5.3.1 Herstellung der Kohlefaser-Mikroelektroden

Als Arbeitselektroden wurden für die elektrochemischen Messverfahren selbst hergestellte Kohlefaser-Mikroelektroden verwendet. Kohlefasern sind in biologischer Umgebung elektrochemisch stabil (Wightman *et al.*, 1991), stellen ein gut leitendes Material dar und weisen ein geringes Hintergrundrauschen auf.

Für die Herstellung wurden zunächst Glaskapillaren mit einer Länge von 80,0 mm und einem Innendurchmesser von 0,86 mm mit einem vertikalen Pipettenziehgerät, Model 720, der Firma David Kopf Instruments, Tujunga, Kalifornien, gezogen. Die dabei entstandene Spitze wurde mit einem Skalpell leicht aufgebrochen. In jede Kapillare wurde dann eine Kohlefaser (Firma van den Hul, Vaassen, Niederlande) so eingeführt, dass an der Spitze der Glaskapillare die Faser heraus stand. Der Vier-Komponenten-Kleber Durcupan[®] ACM der Fa. Fluka Chemie, Seelze, Deutschland diente zur Isolierung der Elektrodenspitze. Dazu wurden die Komponenten in einem Eppendorf-Röhrchen vermischt, auf 80°C erwärmt und die Elektroden für jeweils 30 s mit der Spitze eingetaucht. Dabei füllte sich die Elektrodenspitze durch Kapillarkräfte

mit der Isoliermasse. Anschließend wurden die Elektroden für mindestens zwei Stunden bei 80°C im Trockenschrank zur Aushärtung des Vier-Komponenten-Klebers gelagert. Unmittelbar vor Verwendung wurde die Elektrode mit gesättigter KCl-Lösung oder Kontaktspray befüllt und die Faserspitze mit einem Schleifgerät, Typ 1300M Beveler, der Firma WPI, Berlin, Deutschland und einer Diamantschleifscheibe im 45° Winkel abgeschliffen. Eine Elektrode wurde mehrmals verwendet. Dabei wurde bei den voltammetrischen Messungen die Elektrodenspitze nach jeder Verwendung mit Isopropanol im Ultraschallbad (ca. 30 s) von Rückständen gereinigt. Bei den amperometrischen Messungen wurde die Oberfläche der Faserspitze nach jeder Verwendung erneut abgeschliffen.

2.5.3.2 Prinzip der Messung

Bei den elektrochemischen Messverfahren kommt es durch Anlegen einer bestimmten Spannung an der Kohlefaser-Mikroelektrode zur Oxidation von Katecholaminen zum ortho-Chinon (Abb. 18). Durch die dabei freiwerdenden Elektronen fließt ein Strom, der eine quantitative Erfassung der Katecholamine ermöglicht.

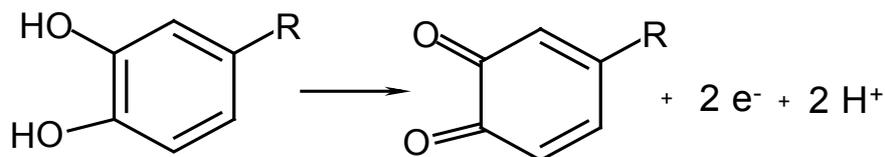


Abb. 18

Bei den elektrochemischen Messverfahren ablaufende Oxidation der Katecholamine zum ortho-Chinon.

2.5.3.3 Allgemeiner Aufbau

Im Allgemeinen wurde ein Versuchsaufbau wie in Abb. 19 dargestellt verwendet. Bei dieser Versuchsanordnung konnte ein zuvor definierter Spannungsimpuls an der Kohlefaser-Mikroelektrode angelegt und der durch die Elektrode fließende Strom gemessen werden. Die Position der Kohlefaser-Mikroelektrode konnte mit Hilfe eines hydraulischen Mikromanipulators der Firma Narishige, Osaka, Japan mikrometergenau gesteuert werden, wobei die richtige Platzierung der Elektrode mit einem inversen Mikroskop IM 35 der Firma Zeiss, Oberkochen, Deutschland beobachtet wurde. Auf einem frei beweglichen Objektisch befand sich ein Badgefäß mit ca. 1,5 ml Volumen. In dieses Badgefäß wurde das zu untersuchende Präparat platziert. Über eine extra angefertigte, beheizbare Zuflussvorrichtung konnte das Präparat kontinuierlich mit frischer, temperierter (35°C) Lösung superfundiert werden. Dabei war der Versuchsaufbau so konstruiert, dass abwechselnd bis zu 4 verschiedene Lösungen über separate Leitungen allein durch die Schwerkraft in das Badgefäß fließen konnten. In die Zuflussleitungen waren Ventile integriert, die mit

einer Steuerung und Fernbedienung der Firma npi, Tamm, Deutschland geöffnet und geschlossen wurden. So war ein Wechsel zwischen den einzelnen Lösungen innerhalb von Sekunden möglich. Überschüssige Badlösung wurde mit einer Membranpumpe über eine Woulff'sche Flasche kontinuierlich abgesaugt.

Um störende elektrische Signale zu minimieren, befand sich der gesamte Versuchsaufbau in einem Faraday-Käfig. Außerdem waren sowohl Mikroskop als auch Objektträger geerdet. Für amperometrische Messungen wurde die Kohlefaser-Mikroelektrode zusätzlich mit einem geerdeten Aluminiumröhrchen, das mit Hilfe einer Klemmschraube am Pipettenhalter befestigt war, abgeschirmt.

Der Spannungsimpuls wurde mit Hilfe eines Computers und eines Verstärkers (Patch Clamp L/M-EPC7, Firma List Electronic, Darmstadt, Deutschland) generiert und durch einen DA-Wandler in ein analoges Signal umgewandelt. Der an der Arbeitselektrode gemessene Strom wurde mit Hilfe des Verstärkers und eines AD-Wandlers am Computer sichtbar gemacht. Dafür wurde das Programm ISO3-Multitasking-Patch-Clamp-Software und eine AD/DA-Wandler Karte der Firma MFK, Niedernhausen, Deutschland verwendet. Alle Signale wurden über einen in den Verstärker integrierten 3 kHz 3-Pol Bessel Filter gefiltert.

Durch Befestigung der Elektrode am Elektrodenhalter konnte über einen Silberdraht eine Verbindung zwischen der Kohlefaser und dem Verstärker hergestellt werden.

Als Erdungselektrode diente ein chlorierter Silberdraht.

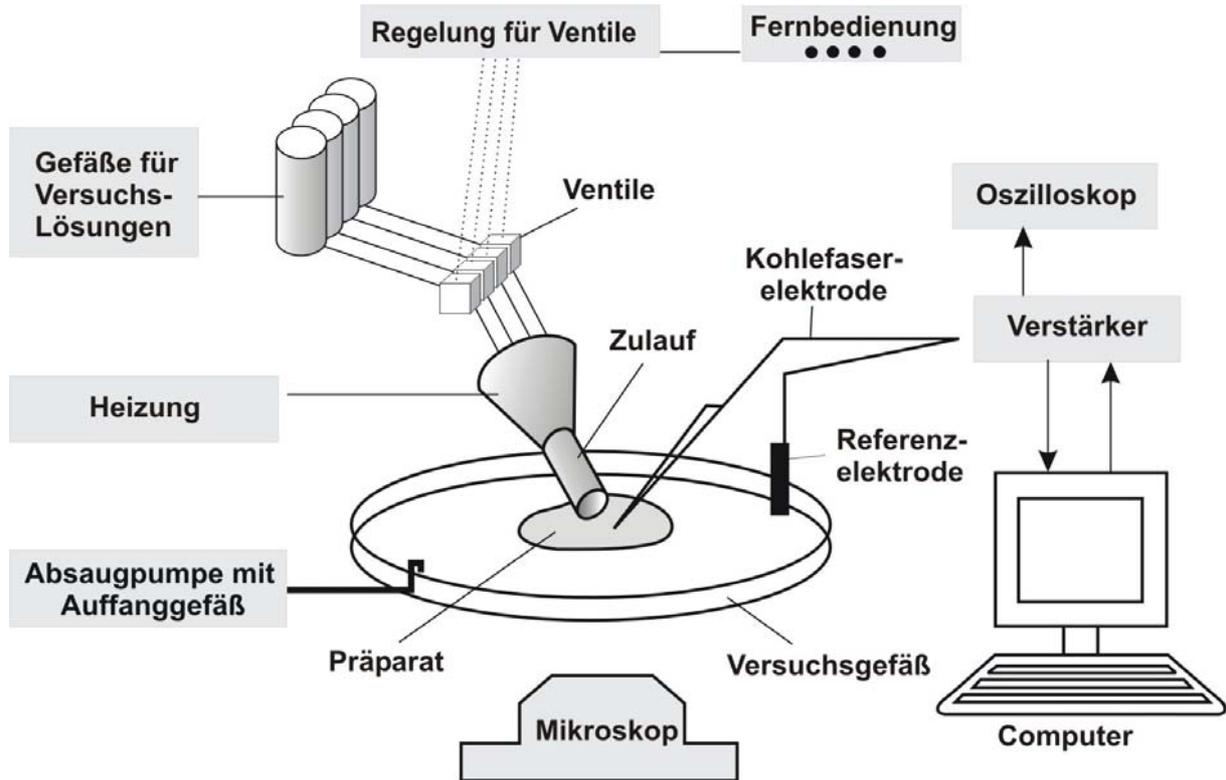
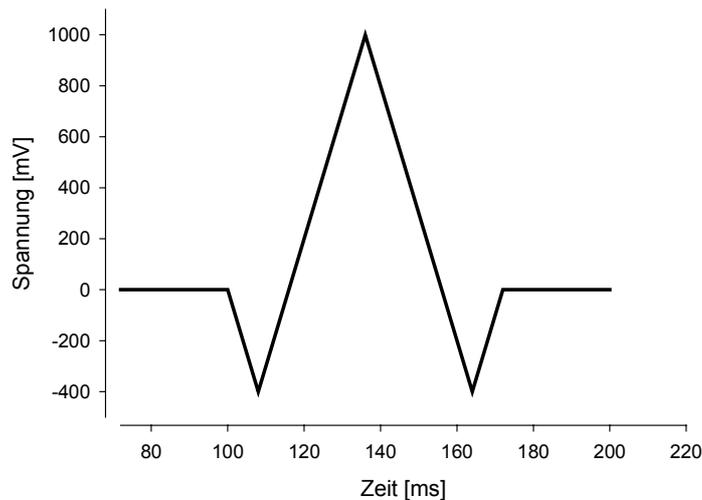


Abb. 19

Schematisch dargestellte Versuchsanordnung bei elektrochemischen Messungen.

2.5.3.4 Voltammetrie an Nebennieren-Schnitten

Durch die voltammetrischen Untersuchungen konnte der Verlauf der Katecholamin-Freisetzung an den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks direkt dargestellt werden. Dabei wurde der Nebennierenschnitt mit einem feinen Gitter im Badgefäß fixiert. Mit Hilfe des Mikromanipulators konnte dann die Kohlefaser-Mikroelektrode direkt auf der Oberfläche des Schnittes im Markbereich platziert werden. Damit sich das Präparat äquilibrieren konnte, wurde vor Beginn der eigentlichen Messung mindestens 5 Minuten gewartet. Durch Anlegen eines Spannungs-Dreiecksimpulses (Abb. 20) an der Elektrode mit einer Scan-Rate von 50 V/s und einer Scan-Frequenz von 1 Hz wurde zunächst ein typischer Hintergrundstrom erzeugt. Dieser ist von der Elektrodenoberfläche und Zusammensetzung der Badlösung abhängig. Bei jeder Messung wurde zunächst der individuelle Hintergrund-Strom bestimmt, indem unmittelbar vor der Stimulation mindestens 20 Scans aufgenommen wurden und der Mittelwert daraus gebildet wurde (Abb. 21).

**Abb. 20**

Dreiecksimpuls, der bei den voltammetrischen Messungen an der Kohlefaser-Mikroelektrode angelegt wurde.

Die Katecholamin-Freisetzung am Nebennieren-Schnitt wurde durch Superfusion mit verschiedenen Superfusionslösungen oder durch Einwaschen dieser Lösungen induziert.

Die freigesetzten Katecholamine werden an der Elektrodenoberfläche oxidiert (vgl. Abb. 18) und der Hintergrundstrom wird von einem Oxidations- bzw. Reduktionsstrom überlagert (Abb. 21). Dieser ist proportional zur umgesetzten Menge an Katecholaminen.

Vor jedem Versuch wurde eine Drei-Punkt-Kalibrierung mit definierten Konzentrationen Adrenalin (Herstellung der Stammlösungen s. 2.1.3) vorgenommen. Dabei lag der Korrelationskoeffizient der linearen Regression (erstellt mit Excel, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) stets zwischen 0,97 und 1. So konnte bei jeder verwendeten Elektrode von einem linearen Messverfahren ausgegangen werden. Die weitere Charakterisierung der Methode, wie z.B. Daten zur Linearität sind unter Punkt 3.3.1.1 beschrieben.

2.5.3.4.1 Auswertung

Zur Auswertung wurde zunächst für jeden Scan die Differenz zwischen dem tatsächlich gemessenen Strom und dem zuvor ermittelten Hintergrundstrom gebildet. Dadurch konnte der Stromfluss im Oxidationsmaximum ermittelt werden, der der maximalen Abweichung vom Hintergrundstrom während der ansteigenden Flanke des Dreiecksimpulses entspricht (Abb. 21, vergrößerter Ausschnitt).

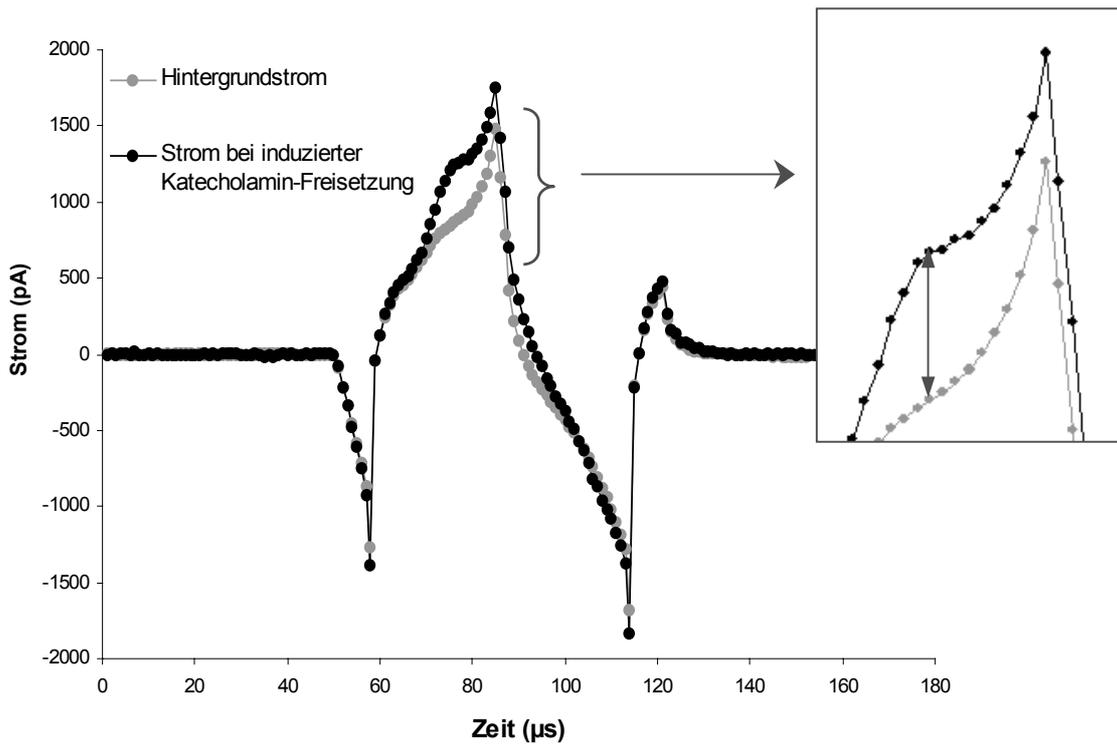


Abb. 21

Hintergrundstrom (Mittelwert aus 20 Messungen) und Strom bei Katecholamin-Freisetzung, induziert durch 116 mM Kalium. Dieser Stromverlauf wurde typischerweise bei Anlegen des in Abb. 20 dargestellten Dreiecksimpulses gemessen. Der Pfeil in dem vergrößerten Ausschnitt zeigt den Stromfluss am Oxidationsmaximum. Der maximale Oxidationsstrom wurde durch Bestimmung der maximalen Abweichung zwischen Strom bei induzierter Freisetzung und Hintergrundstrom ermittelt.

Durch Auftragen des jeweils ermittelten maximalen Oxidationsstroms im Zeitverlauf konnte der Freisetzungsverlauf dargestellt werden. Um schließlich die Menge der freigesetzten Katecholamine zu bestimmen, wurde die maximale Amplitude des Freisetzungsverlaufs und die Fläche unter der Kurve ausgewertet (Abb. 22)

Der Mittelwert des Hintergrundstroms wurde direkt mit der ISO3-Multitasking-Patch-Clamp-Software (MFK, Niedernhausen, Deutschland) berechnet. Der Stromfluss im Oxidationsmaximum, die Dreipunktkalibrierung und die maximale Amplitude des Freisetzungsverlaufes wurde mit dem Programm Excel ermittelt. Die Darstellung des Freisetzungsverlaufs und die Ermittlung der Fläche unter der Kurve erfolgte mit dem Programm SigmaPlot 8.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) mittels Trapezmethode: $(y_i(x_{i+1} - x_i) + 0,5(y_{i+1} - y_i)(x_{i+1} - x_i))$ mit $0 \leq i \leq n-1$ vom Zeitpunkt 0 bis zum Zeitpunkt 50 s.

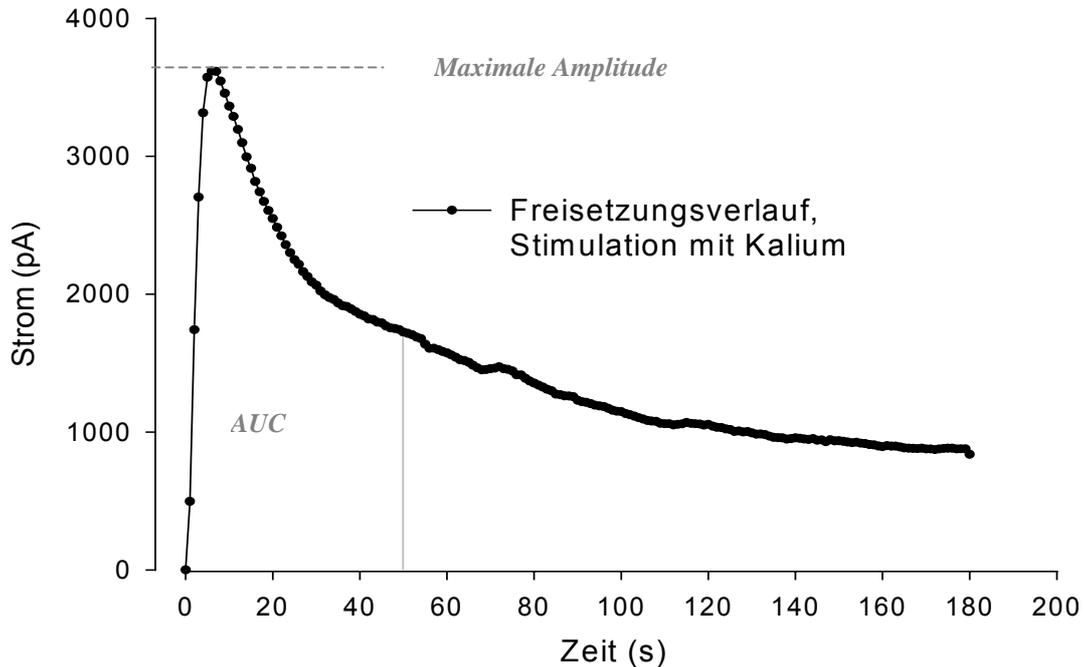


Abb. 22

Beispiel eines Freisetzungsvorganges bei Stimulation mit 116 mM Kalium. Der Freisetzungsvorgang wurde durch Auftragen des bei jedem einzelnen Scan ermittelten maximalen Oxidationsstroms gegen die Zeit dargestellt.

Zur Auswertung kamen die maximale Amplitude und die Fläche unter der Kurve (AUC), gemessen von Zeitpunkt 0 bis zum Zeitpunkt 50 s.

2.5.3.5 Amperometrie an PC12-Zellen

Mit der Amperometrie konnten Einzelfreisetzung an kultivierten PC12-Zellen aufgelöst werden. PC12-Zellen wurden verwendet, da Zellen in Kultur für die Messung von Einzelfreisetzung leichter zugänglich sind und eine genauer definierte biologische Umgebung zu erzielen ist. Im Gegensatz zur Voltammetrie wurde hier kontinuierlich ein konstanter Spannungsimpuls von 650 mV angelegt. Dadurch kann eine sehr gute zeitliche Auflösung erzielt werden (Wightman *et al.*, 1991). Die Kohlefaser-Mikroelektrode wurde mit Hilfe des Mikromanipulators so platziert, dass sie die Zelloberfläche leicht berührte. Von der Zelle freigesetzte Katecholamine werden bei angelegter Spannung an der Elektrodenoberfläche oxidiert, wodurch ein Strom fließt, der gemessen wurde. In Abb. 23 ist ein typisches Freisetzungsmuster bei Stimulation mit Kalium dargestellt. Das Faradaysche Gesetz besagt, dass die bei elektrolytischen Vorgängen übertragene Ladung (Q) direkt proportional zu der dabei umgesetzten Masse ist. Dabei entspricht das Zeitintegral des Stroms der Ladung (Q), die bei der elektrochemischen Umsetzung der Katecholamine an der Elektrodenoberfläche übertragen wird. So kann durch

Ermittlung der Fläche unter der Kurve die freigesetzte Menge an Katecholaminen nach folgender Formel direkt berechnet werden:

$$n = \frac{Q}{z \cdot F}$$

n = Katecholamin-Menge (mol)

Q = Ladung (C)

z = Elektronenzahl pro Teilchenumsatz (hier: 2)

F = Faraday-Konstante (96487 C mol⁻¹)

Formel 2

Berechnung der umgesetzten Menge an Katecholaminen.

Ausgewertet wurde die Frequenz der Einzelfreisetzung und die mittlere Katecholamin-Konzentration pro Freisetzung, wobei davon ausgegangen wurde, dass ein Peak (Abb. 23) der Freisetzung aus einem Vesikel entspricht. Mit Hilfe des Programms Igor Pro (Firma WaveMetrics, Portland, USA) wurden Einzelfreisetzung repräsentierende Peaks ausgewählt und die Peak-Fläche berechnet. Die Berechnung der Freisetzungsfrequenz und der Katecholamin-Menge pro Freisetzung erfolgte in Excel.

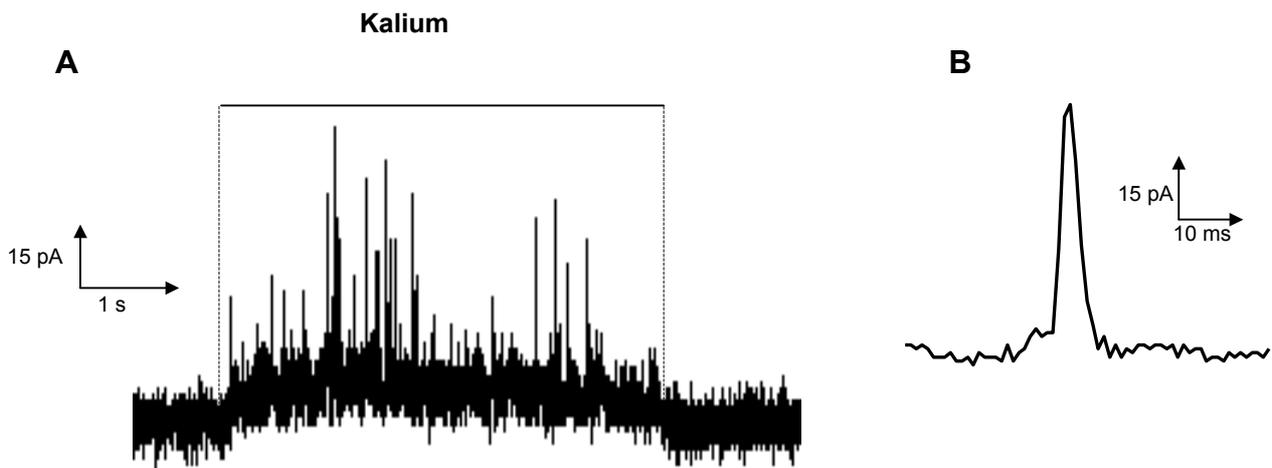


Abb. 23

Typisches Freisetzungsmuster (A) und Einzelpeak (B), gemessen bei Stimulation mit 80 mM Kalium.

2.6 HPLC-gestützte Katecholamin-Bestimmung an Nebennieren-Schnitten

Um den Einfluss verschiedener Substanzen auf die Adrenalin- und Noradrenalin-Freisetzung getrennt zu untersuchen, sollte die Katecholamin-Konzentration mittels HPLC bestimmt werden. Dazu wurde eine Filter-Vorrichtung, in der Nebennieren-Schnitte fixiert waren, perfundiert und die Katecholamin-Konzentration unter Verwendung des Chromsystems HPLC-Kits der Firma Chromsystems Instruments und Chemicals, München, Deutschland im Perfusat ermittelt.

2.6.1 Gewinnung des Perfusats

Zur Gewinnung des Perfusats wurde die in Abb. 24 dargestellte Perfusionsvorrichtung verwendet. Als Perfusionskammer diente ein Filterhalter der Firma Pall Life Sciences, an dem ein 3-Kanal-Zulauf befestigt war. Dadurch konnten über eine Rundläuferpumpe der Firma Gilson, Middleton, USA, drei verschiedene Lösungen aus verschiedenen Lösungsmittelreservoirs durch die Perfusionskammer gepumpt werden. Dabei wurde die Pumpe so eingestellt, dass die Lösungen mit einer mittleren Geschwindigkeit von $2,0 \text{ ml/min} \pm 0,1 \text{ ml/min}$ durch die Kammer flossen. Zwischen den verschiedenen Kanälen ergab sich ein maximaler Unterschied in der Fließgeschwindigkeit von $0,13 \text{ ml/min}$. Bei dieser Fließgeschwindigkeit wurde die Perfusionskammer innerhalb von $40 \text{ s} \pm 2 \text{ s}$ vollständig gefüllt.

Die Verwendung von Dreiwegehähnen ermöglichte das Wechseln zwischen den einzelnen Lösungen. Durch einen Durchflusserhitzer wurden die Lösungen vortemperiert, sodass in der Perfusionskammer eine Temperatur von 35°C erzielt werden konnte. Temperatur und Fließgeschwindigkeit wurden arbeitstäglich unter Verwendung eines 300 k Digitalthermometers der Firma Conrad, München, Deutschland eines 10 ml Messkolbens und einer Stoppuhr der Firma Junghans, Offenbach, Deutschland überprüft.

200 μm dicke Nebennieren-Schnitte wurden wie bereits beschrieben angefertigt, in die Perfusionsvorrichtung eingelegt und mit einem feinen Nylongitter fixiert (Abb. 24).

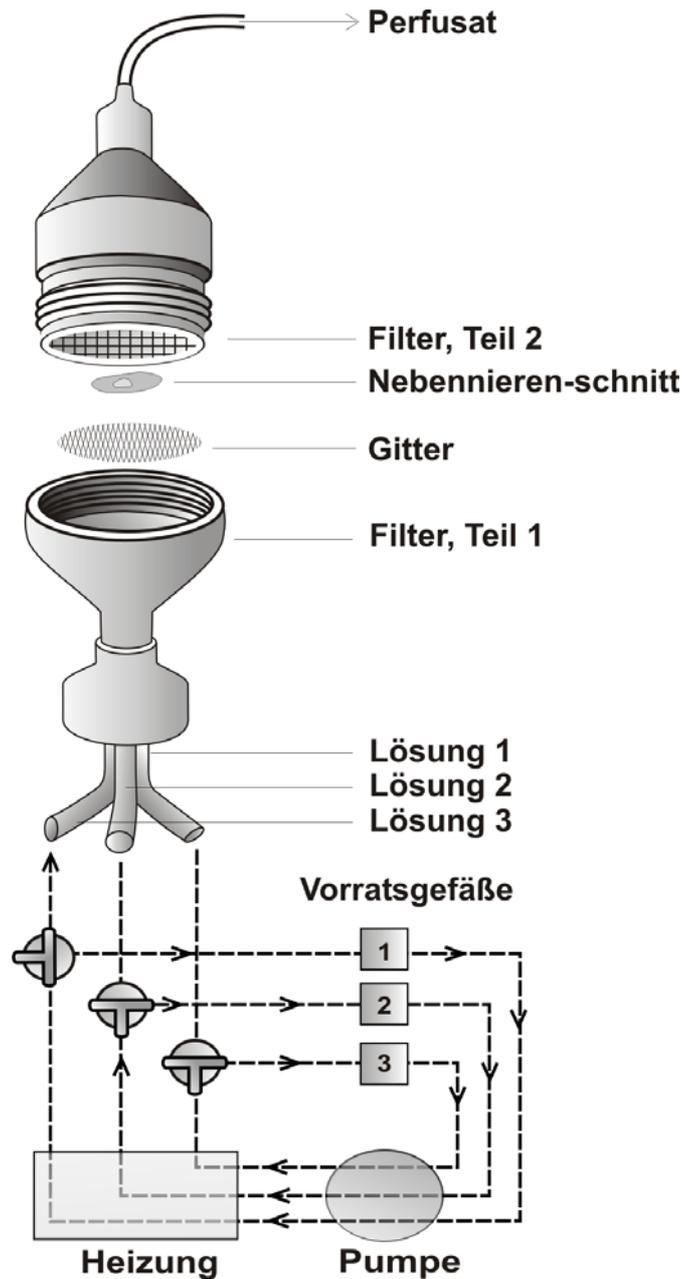


Abb. 24

Schematische Darstellung der Perfusionsvorrichtung.

Anschließend wurden die Schnitte nach einem genauen Zeitprotokoll (Abb. 25) mit einer Nährlösung ohne Magnesium (Lösung A, Zusammensetzung s. Tabelle 1), mit Kalium-reicher Lösung (Lösung C, Zusammensetzung s. Tabelle 1) oder mit Lösungen, die die zu untersuchenden Substanzen enthielten, perfundiert. Während der kontinuierlichen Perfusion wurden zu definierten Zeitpunkten Proben in Gefäßen zur Kapillarblutentnahme der Firma Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Eisenroth, Deutschland gesammelt und sofort bei -20°C eingefroren. Der Sammelzeitraum betrug stets 20 s. Das in den Gefäßen bereits enthaltene EDTA und das sofortige Einfrieren verhinderte eine Oxidation der Katecholamine.

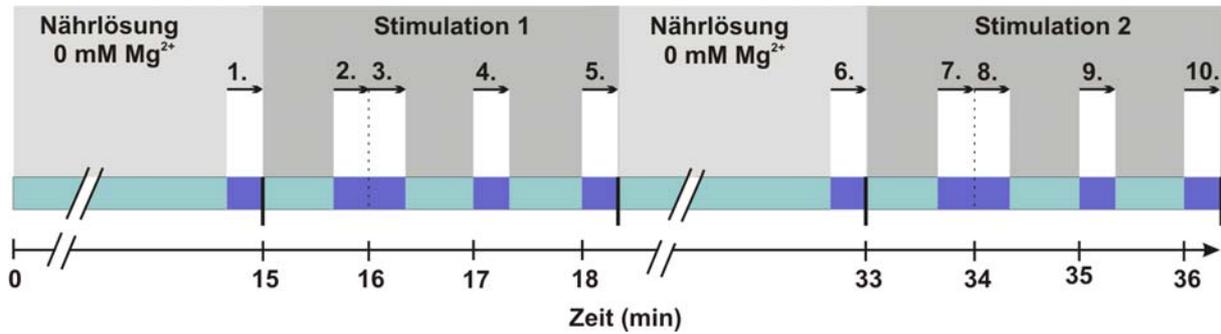


Abb. 25

Zeitprotokoll der Perfusionsversuche. Bei Stimulation 1 wurde stets mit Kalium-reicher Nährlösung ohne Magnesium (Lösung C, Tabelle 1) perfundiert. Bei Stimulation 2 wurde ebenfalls Kalium-reiche Nährlösung (Lösung C, Tabelle 1) verwendet, der die zu untersuchenden Substanz zugesetzt war, oder in Kontrollversuchen Kalium-reiche Nährlösung ohne Zusatz von Substanzen. Die Pfeile 1 bis 10 stellen die gesammelten Proben dar. Der Sammelzeitraum betrug stets 20 s. Zur Analyse kamen, je nach Bedarf, alle gesammelten Proben oder nur die Proben 1, 2, 3 und 6, 7, 8.

2.6.2 Prinzip der HPLC-Messung

In den Proben wurde die Adrenalin- und Noradrenalin-Konzentration bestimmt. Die Analyse führte die Abteilung Klinische Chemie des Klinikums Rechts der Isar, München unter Verwendung eines HPLC-Kits zur Bestimmung der Katecholamin-Konzentration im Plasma (Firma Chromsystems Instruments und Chemicals, München, Deutschland) durch. Eine detaillierte Beschreibung der Durchführung bietet die Arbeitsvorschrift „HPLC-Bestimmung Katecholamine im Plasma“ (AV 5000 CATP D Dez 2003 V1) der Firma Chromsystems Instruments und Chemicals. Hier soll nur ein Überblick über die Prinzipien und wesentlichen Arbeitsschritte der Bestimmung dargestellt werden. Abb. 26 zeigt ein Beispiel-Chromatogramm.

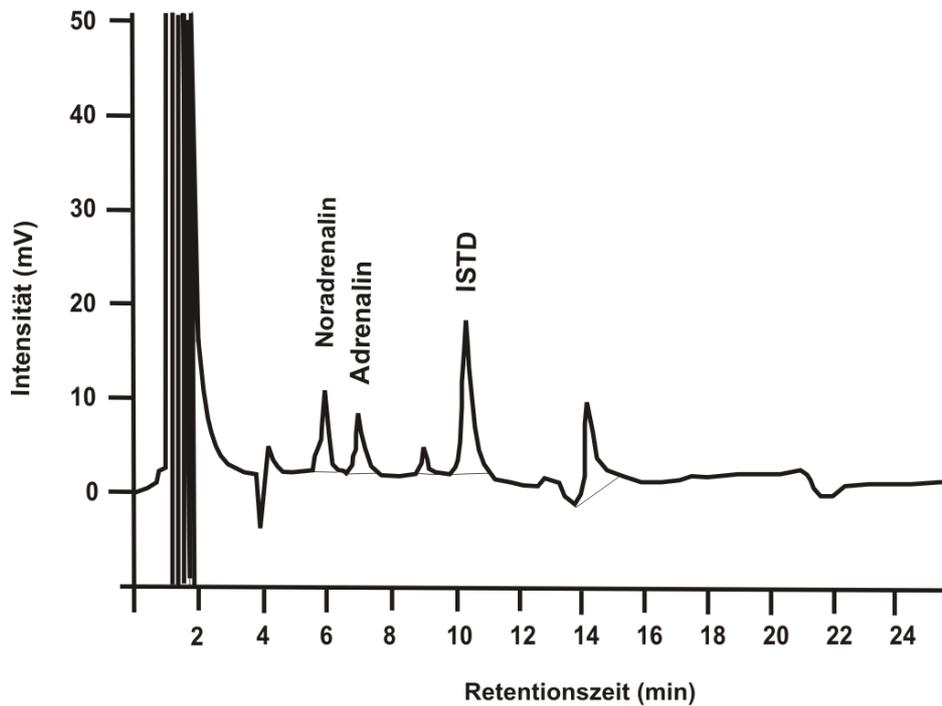


Abb. 26

Beispiel-Chromatogramm einer Analyse (abgezeichnet von Bildschirmdarstellung). ISTD = Interner Standard.

2.6.3 Materialien

Folgende Bestandteile des HPLC-Kits der Firma Chromsystems Instruments und Chemicals, München, Deutschland wurden verwendet:

- Probenvorbereitungskartusche
- Extraktions-Puffer
- Reinigungs-Puffer
- Elutions-Puffer
- Interner Standard Dihydroxybenzylamin
- Plasma-Kalibrationsstandard (lyophilisiert)
- HPLC-Säule
- Mobile Phase

2.6.4 Geräte

Die Messungen wurden an einer HPLC-Anlage der Firma Merck Hitachi mit einem elektrochemischen Detektor der Firma Chromsystems durchgeführt.

2.6.5 Geräteparameter

Arbeitspotential des Detektors:	0,48 V \pm 0,1 V
Flussrate:	1 ml/min
Temperatur:	Raumtemperatur
Injektionsvolumen:	20 – 50 μ l

2.6.6 Detektion

Als Detektor wurde ein elektrochemischer Detektor der Firma Chromsystems Instruments und Chemicals verwendet, dessen Prinzip auf der Amperometrie bei konstantem Arbeitspotential beruht. Der Detektor besteht aus einer Drei-Elektroden-Messzelle mit Referenzelektrode, Gegenelektrode und Arbeitselektrode, an der ein Potential von 0,48 V \pm 0,1 V angelegt wurde. Dabei kam es zur Oxidation der Katecholamine, wodurch ein Stromfluss entstand, der zur quantitativen Bestimmung herangezogen wurde. Das Arbeitspotential (0,48 V \pm 0,1 V) ist so gewählt, dass ein maximales Detektionssignal zu erwarten ist.

2.6.7 Probenaufbereitung

Vor Verwendung wurden die Proben 1:5 mit filtriertem und entgastem Wasser verdünnt, um eine Katecholamin-Konzentration im linearen Messbereich sicherzustellen.

Die Probenaufbereitung beruhte auf der Adsorption von Adrenalin und Noradrenalin an Aluminiumoxid. Proben wurden zusammen mit internem Standard und Extraktions-Puffer in einer Probenvorbereitungskartusche, die Aluminiumoxid enthielt, geschüttelt. Dadurch wurden die Katecholamine an das Aluminiumoxid adsorbiert und der restliche Überstand konnte verworfen werden. Anschließend wurde das Aluminiumoxid unter Verwendung des Wasch-Puffers von Rückständen gereinigt. Der Wasch-Puffer wurde durch Zentrifugation vollständig entfernt. Danach konnten unter Verwendung des Elutions-Puffers die Katecholamine wieder von dem Aluminiumoxid gelöst werden. Das Eluat wurde direkt in die HPLC-Anlage injiziert.

2.6.8 Verwendung von Plasma-Kalibrationsstandards und Kontrolle

Vor jeder Probenserie wurde ein Kalibrations-Chromatogramm erstellt. Zu diesem Zweck wurde der von Chromsystems Instruments und Chemicals GmbH gelieferte Plasma-Kalibrationsstandard in Wasser gelöst und analysiert. Die erhaltenen Werte dienten der Berechnung der Probenkonzentrationen. Außerdem wurden zur Überprüfung von Präzision und Richtigkeit bei jeder Untersuchung eine von Chromsystems gelieferte Plasma-Kontrolle mit definierten Katecholamin-

Konzentrationen mitanalysiert. Die ermittelten Werte mussten innerhalb der auf dem jeweiligen Beipackzettel angegebenen Bereiche liegen.

2.6.9 Quantitative Auswertung

Der interne Standard wurde der zu untersuchenden Probe zugesetzt und somit der gleichen Behandlung unterzogen. Dadurch konnten bei der Probenaufbereitung eventuell entstehende Verluste kompensiert werden. Mit Hilfe der Ergebnisse der zuvor durchgeführten Kalibrierung wurde die Konzentration der Katecholamine nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration} \left(\frac{\text{pg}}{\text{ml}} \right) = \frac{A_P \cdot IS_s}{A_S \cdot IS_P} F$$

Formel 3

Berechnung der Katecholamin-Konzentration in der Probe

A_P = Peak-Fläche der zu bestimmenden Substanz im Chromatogramm der Probe

A_S = Peak-Fläche der zu bestimmenden Substanz im Chromatogramm des Kalibrationsstandards

IS_P = Peak-Fläche des internen Standards im Chromatogramm der Probe

IS_S = Peak-Fläche des internen Standards im Chromatogramm des Kalibrationsstandards

F = Faktor für die Substanzen Noradrenalin und Adrenalin bei 1 ml Probenvolumen:

Noradrenalin: 600

Adrenalin: 300

2.6.10 Validierung

Eine Validierung der HPLC-Methode wurde von der Firma Chromsystems Instruments und Chemicals durchgeführt. Dabei wurde anhand von Plasma-Proben mit definierten Mengen an Noradrenalin und Adrenalin die Wiederfindungsrate (Tabelle 5), die Linearität, die Bestimmungsgrenze, die Intra-Assay-Reproduzierbarkeit (Tabelle 6) und die Inter-Assay-Reproduzierbarkeit (Tabelle 7) ermittelt. Der lineare Bereich liegt für Adrenalin und Noradrenalin zwischen 15 ng/l und 10 000 ng/l.

	Wiederfindungsrate	Wiederfindungsrate, korrigiert um Wiederfindung des Standards
Noradrenalin	72%	99%
Adrenalin	70%	96%
DHBA (Interner Standard)	73%	--

Tabelle 5

Wiederfindungsraten ermittelt aus Steigungen der Kalibrationsgeraden nach mehrfachem Aufstocken von Plasma-Proben und wässrigen Verdünnungen.

	Variationskoeffizient in % (Konzentration) Probe 1, n=10	Variationskoeffizient in % (Konzentration) Probe 2, n=10
Noradrenalin	3,9 (232 ng/l)	1,7 (1786 ng/l)
Adrenalin	7,9 (72 ng/l)	2,9 (579 ng/l)

Tabelle 6

Intra-Assay-Reproduzierbarkeit: Der Variationskoeffizient wurde durch jeweilige 10-fach Aufbereitung von 2 Proben in verschiedenen Katecholamin-Konzentrationsbereichen bestimmt.

	Variationskoeffizient in % (Konzentration) Konzentrationsbereich 1, n=10x2	Variationskoeffizient in % (Konzentration) Konzentrationsbereich 2, n=10x2
Noradrenalin	5,9 (239 ng/l)	3,7 (1760 ng/l)
Adrenalin	6,5 (78 ng/l)	4,0 (470 ng/l)

Tabelle 7

Inter-Assay-Reproduzierbarkeit: Der Variationskoeffizient wurde durch doppelte Aufarbeitung von jeweils 10 Proben in 2 verschiedenen Katecholamin-Konzentrationsbereichen bestimmt.

Ein detaillierter Validierungsbericht kann bei der Firma Chromsystems Instruments and Chemicals angefordert werden.

2.7 Histochemische Untersuchung von Nebennieren-Schnitten mittels Glyoxylsäure-Färbung

2.7.1 Anfertigung der Schnitte

90 bis 100 µM dicke Nebennieren-Schnitte wurden, wie unter 2.5.1 „Herstellung der Nebennieren-Schnitte“ beschrieben, angefertigt. Durch Behandlung der Schnitte mit Glyoxylsäure-Lösung entstand infolge einer Reaktion mit den darin enthaltenen Katecholaminen ein fluoreszierendes Produkt. Die Färbung erfolgte nach einer Variation der von Furness et al. (1975) beschriebenen Methode. Dabei wurden die frisch hergestellten Schnitte zunächst für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 2% Glyoxylsäure, gelöst in 0,1 M Phosphatpuffer, inkubiert. Der pH-Wert dieser Lösung wurde zuvor mit 1 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträgern ausgebreitet und überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier abgesaugt. Das Präparat trocknete zunächst für ca. 3 Minuten bei Raumtemperatur und wurde dann für 2 – 4 Minuten auf 100°C im Trockenschrank erhitzt. Abschließend wurde das Präparat in dickflüssigem Paraffin eingebettet und mit einem Deckgläschen bedeckt. Die so erhaltenen Präparate können bei Raumtemperatur bis zu 2 Monate gelagert werden (Furness et al., 1975). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden sie jedoch am Herstellungstag oder am darauf folgenden Tag untersucht.

2.7.2 Reaktionsprinzip

Die nach (Lindvall et al., 1974b) ablaufende Reaktion von Katecholaminen bei der Behandlung mit Glyoxylsäure ist in Abb. 27 dargestellt.

Im ersten Schritt reagieren Katecholamine (I) in einer Pictet-Spengler-Zyklisierung mit einem Molekül Glyoxylsäure, wodurch ein schwach fluoreszierendes Derivat der 6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-1-Carbonsäure (II) entsteht. Im Falle von Noradrenalin reagiert dieses Derivat, begünstigt durch Erhitzen des Präparats, unter Decarboxylierung mit einem weiteren Molekül Glyoxylsäure. Dabei wird ein stark fluoreszierendes 2-Carboxymethyl-6,7-Dihydroxy-3,4-Dihydroisochinolin (IIIa) gebildet. In Abhängigkeit vom pH Wert und den gewählten Versuchsbedingungen (Lindvall et al., 1974b) liegt ein Gleichgewicht zwischen den tautomeren Formen IIIb und IIIa vor. Unter sauren Bedingungen herrscht Form IIIb und unter neutralen Bedingungen Form IIIa vor.

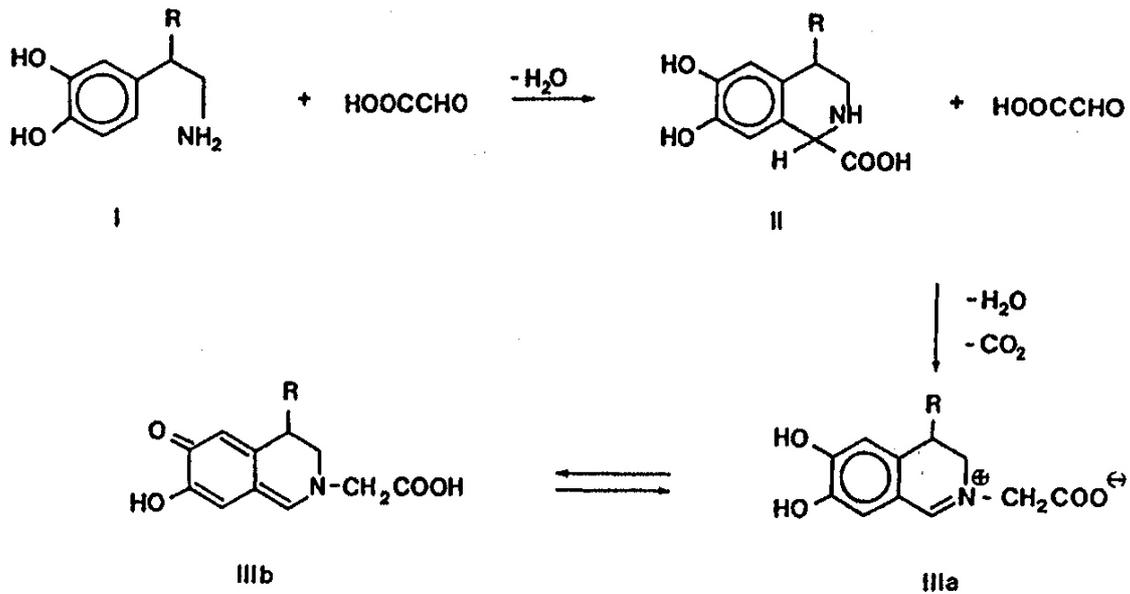


Abb. 27

Reaktion von Glyoxylsäure und Katecholaminen bei der Glyoxylsäure-Färbung von Nebennierenschnitten (nach Lindvall et al., 1974b).

2.7.3 Aufnahme der Bilder

Die Bilder wurden mit einem LSM 510, Laser Scanning Mikroskop der Firma Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland und/oder einer D1x-Digitalkamera von Nikon Corporation erstellt. Zunächst wurde mit der Nikon-Kamera von jedem Schnitt ein Durchlichtbild und ein Bild bei Anregung mit einer Quecksilberdampfampe aufgenommen. Danach wurde bei gleich bleibender Vergrößerung mit einem Enterprise II-Laser mit 364 nm angeregt. Das Emissionslicht wurde mit einem Langpass-Filter (LP 385 nm) gefiltert und das resultierende Bild konnte direkt auf dem Bildschirm des Computers angezeigt und gespeichert werden.

2.7.4 Prinzip der konfokalen Mikroskopie

Bei der konfokalen Mikroskopie wird das von einem Laser emittierte Anregungslicht an einem dichroitischen Spiegel reflektiert und durch das Objektiv auf die Probe fokussiert und kann dort z.B. Fluoreszenzfarbstoffe anregen. Im Fokuspunkt ist die Anregungsintensität am höchsten. Da nur der Fokuspunkt für das menschliche Auge scharf erscheint, wird bei der konventionellen Mikroskopie das Bild durch Licht außerhalb des Fokuspunktes unscharf. Bei der konfokalen Mikroskopie dagegen wird das von der Probe emittierte Licht mit dem Objektiv gesammelt und auf eine Blende, das Pinhole, fokussiert. Da Fokuspunkt und Pinhole in konjugierten Ebenen liegen, d.h. konfokal sind, gelangt nur Licht aus dem Fokuspunkt durch das Pinhole und kann anschließend vom Detektor registriert werden. Nicht vom Fokuspunkt stammendes Licht kann das Pinhole nicht passieren und wird so ausgeblendet. Die

gewünschte Wellenlänge des Emissionslichtes kann über einen Emissions-Filter gewählt werden, der zusätzlich verhindert, dass Anregungslicht auf den Detektor gelangt. Das Ergebnis ist eine scharfe, von Streulicht fast freie Abbildung des Fokuspunktes. Ein Scanner wandert auf diese Weise Punkt für Punkt über die Probe und erstellt so einen optischen Schnitt der Probe.

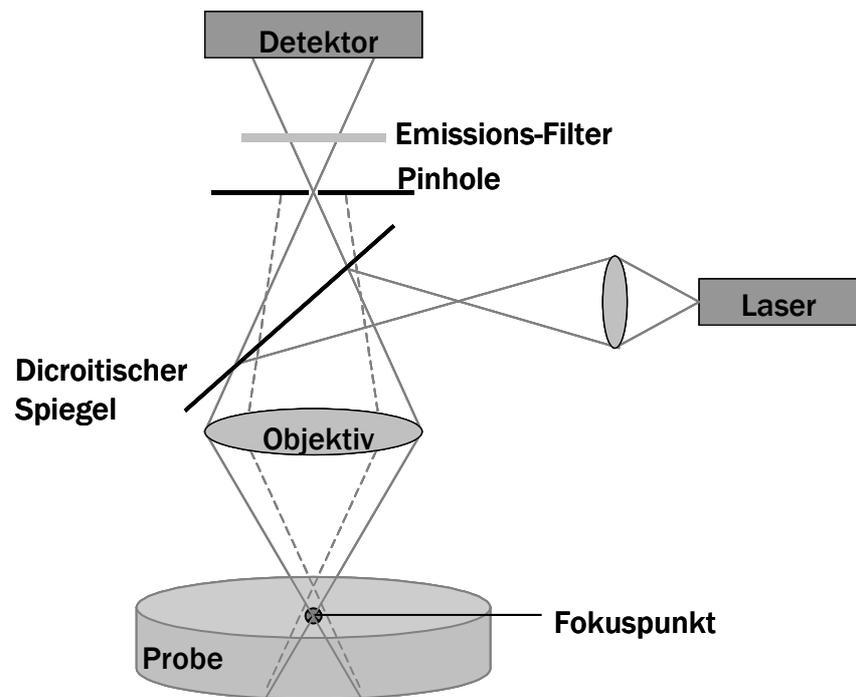


Abb. 28

Prinzip der konfokalen Mikroskopie.

2.8 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) und Westernblot

2.8.1 Prinzip

Das Prinzip der Gelelektrophorese beruht auf der Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts im elektrischen Feld.

Acrylamid polymerisiert unter Zugabe von Methylenbisacrylamid, eines Katalysators (TEMED) und eines Radikalstarters (APS) zu einem Gel aus, dessen Porengröße sich durch die Konzentration von Acrylamid und Bisacrylamid genau einstellen lässt.

Proteine werden mit SDS und DTT vorbehandelt, sodass es zum Aufbrechen ihrer Tertiär- und Sekundärstrukturen kommt. Das negativ geladene SDS lagerte sich an die Proteine an und verleiht ihnen eine negative Gesamtladung. Dadurch wird die Migrationsrichtung der Proteine im elektrischen Feld zur Anode hin festgelegt und eine Auftrennung rein nach Molekulargewicht ist möglich.

Unter einem Westernblot versteht man das Übertragen der in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Membran. Diese werden dort fixiert und können über verschiedene Methoden, z.B. mit spezifischen Antikörpern, nachgewiesen werden.

2.8.2 Sammel- und Trenngel

Sammelgel und Trenngel (Zusammensetzungen s. Tabelle 8) wurden unter Verwendung einer Gießvorrichtung der Firma BioRad, Hercules, USA hergestellt.

Die Gelapparatur wurde nach Vorschrift zusammengebaut und zunächst mit dem noch flüssigen Trenngel bis ca. 1,5 cm unterhalb der oberen Kante befüllt. Nach Aushärtung (ca. 30 Minuten) wurde das Trenngel mit noch flüssigem Sammelgel überschichtet. Durch Einstecken eines Probenkamms wurden die Probenaschen gebildet. Nach weiteren 15 Minuten war die Polymerisation abgeschlossen.

Trenngel		Sammelgel	
Acrylamid (30%)	4,0 ml	Acrylamid (30%)	325 µl
4x Tris/SDS pH 8,8	3,75 ml	4x Tris/SDS pH 8,8	625 µl
Wasser	1,25 ml	Wasser	1525 µl
APS	0,05 ml	APS	6,25 µl
TEMED	0,01 ml	TEMED	2,5 µl

Tabelle 8

Zusammensetzung des verwendeten Trenngels und des Sammelgels.

2.8.3 Präparation der Proben

Männliche Ratten (Charles River, Deutschland GmbH, Kisslegg, Deutschland) wurden wie beschrieben betäubt und getötet. Bauchhöhle und Thorax wurden eröffnet und Nebennieren, Herz, Ductus deferens (Nebenhoden-nahe Seite), und Blase wurden entnommen. Die Nebenniere wurde zunächst in eiskalter Nährlösung mit Magnesium (Lösung B, Zusammensetzung s. Tabelle 1) mit Hilfe einer Stereolupe grob von der Kapsel befreit und zusammen mit den anderen Geweben sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung lagerten die Gewebe bei -80°C .

Zur Proteinpräparation wurden die Gewebe zunächst auf Trockeneis mit Mörser und Pistill zerkleinert. Anschließend wurden sie mit 10-facher Menge 2% SDS, 50 mM Tris, pH 7,5 (100 μl pro 10 mg Gewebe) versetzt, mit einem Mikropistill homogenisiert und für 10 min bei 95°C gekocht. Durch Zentrifugieren konnte das Lysat von Geweberückständen gereinigt werden.

Die gewünschte Proteinmenge wurde mit autoklaviertem Wasser ad 10 μl aufgefüllt, mit 2 μl Denaturierungspuffer (6-fach konzentriert) vermischt und nochmals bei 95°C für 5 Minuten gekocht.

2.8.4 Proteinbestimmung

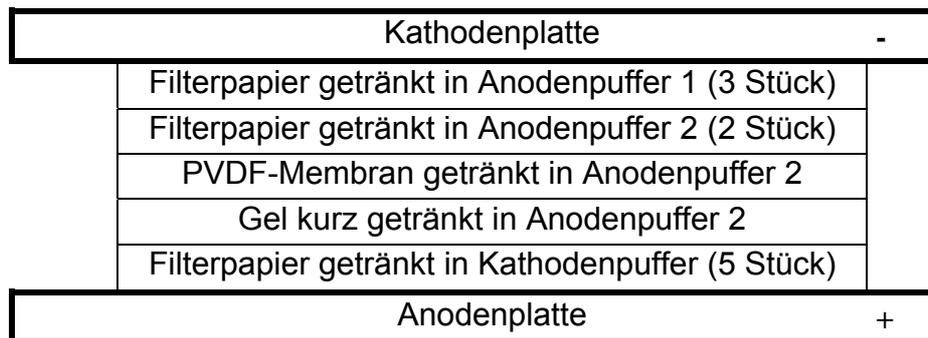
Der Proteingehalt der Lysate wurde mittels BC Protein Assay (Protein Quantitation Kit der Firma KMF, Lohmar, Deutschland) ermittelt. Hierbei werden zunächst Cu^{2+} -Ionen mit Proteinen zu Cu^{+} -Ionen reduziert. Cu^{+} bildet dann mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure (BC) einen wasserlöslichen Farbkomplex, der eine starke Lichtabsorption aufweist. Die Absorption kann photometrisch bestimmt werden und ist direkt proportional zur Proteinmenge. Für die Proteingehaltsbestimmung wurden die Proben 1:100 mit gereinigtem Wasser (MilliQ-Anlage, Firma Millipore, Schwalbach, Deutschland) verdünnt, mit den Reagenzien des BC Assay Kits versetzt und 60 Minuten bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption in einem Titertac Multiscan MCC/340 Photometer bei 540 nm gemessen. Zur Berechnung des Proteingehalts wurde vor jeder Bestimmung eine BSA (Bovine Serum Albumin)-Verdünnungsreihe hergestellt und eine Kalibriergerade erstellt.

2.8.5 Beladen des Gels, Gel-Lauf und Blotten

Nach Einsetzen der Gels in eine Elektrophoresekammer (BioRad) wurde diese mit Elektrophoresepuffer (1 zu 10 verdünnt) befüllt und die Proben mit einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen gespritzt. Als Proteingrößen-Standard diente der *Precision Plus Protein™ Standard All Blue* (BioRad, Hercules, USA). Bei einer Spannung von 50 V wurden die Proteine im Sammelgel fokussiert. und danach bei 150 V

aufgetrennt. Erreichte die Protein-Lauffront das Ende des Gels, wurde es entnommen und nach dem Semi-dry-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) geblottet. Dazu wurden eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF, Immobilon-P, Firma Millipore, Schwalbach, Deutschland) und Filterpapiere (GB003, Firma Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland) zunächst auf Gelgröße zugeschnitten und anschließend in Anodenlösungen oder Kathodenlösung getränkt.

Für den Blotting-Vorgang waren Gel, Filterpapier und Membran in folgender Reihenfolge in der Blotting-Apparatur (Semi-Dry-Blotter, Firma Biostep, Jahnsdorf, Deutschland) platziert, wobei darauf geachtet wurde, dass sich keine Luftblasen zwischen den Schichten bildeten:



Durch Anlegen einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ wanderten die negativ geladenen Proteine innerhalb von 60 Minuten in Richtung Anode auf die PVDF-Membran. Die mit den Puffern getränkten Filterpapiere dienten dabei als Ionenreservoir für die Elektrophorese. Methanol im Puffer entfernte das SDS aus den Protein-Detergens-Komplexen und erhöhte die Bindung der SDS-freien Proteine an die Membran.

2.8.5.1 Inkubation mit Antikörpern

Um zunächst unspezifische Bindungsstellen des Antikörpers auf der Membran zu blocken, wurde diese über Nacht bei 4°C in 5% Milchpulver in TBST inkubiert. Durch Waschen mit TBST wurde das Milchpulver anschließend wieder von der Membran entfernt. Nach Zerteilen der Membran wurde die untere Hälfte als Ladungskontrolle mit β -Actin-Antikörper der Firma Abcam (Verdünnung: 1:40000) und die obere Hälfte mit TRPM8-Antikörper der Firma Abcam (Verdünnung 1:2000) im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde durch erneutes Waschen mit 1% Milchpulver in TBST (3 x 15 min) überschüssiger primärer Antikörper wieder entfernt. Da es sich bei dem primären Antikörper um polyklonale Antikörper aus Kaninchen handelte, diente als sekundärer Antikörper ein polyklonaler „Anti-Kaninchen“-Antikörper aus Ziege (Firma Dianova), der mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert war. Durch Inkubation der Membran in einer verdünnten Lösung des sekundären Antikörpers (1:100000 mit 1% Milchpulver in TBST) für 60 min bei Raumtemperatur konnte dieser an die primären Antikörper (Anti- β -Aktin oder Anti-TRPM8) binden (Abb. 29).

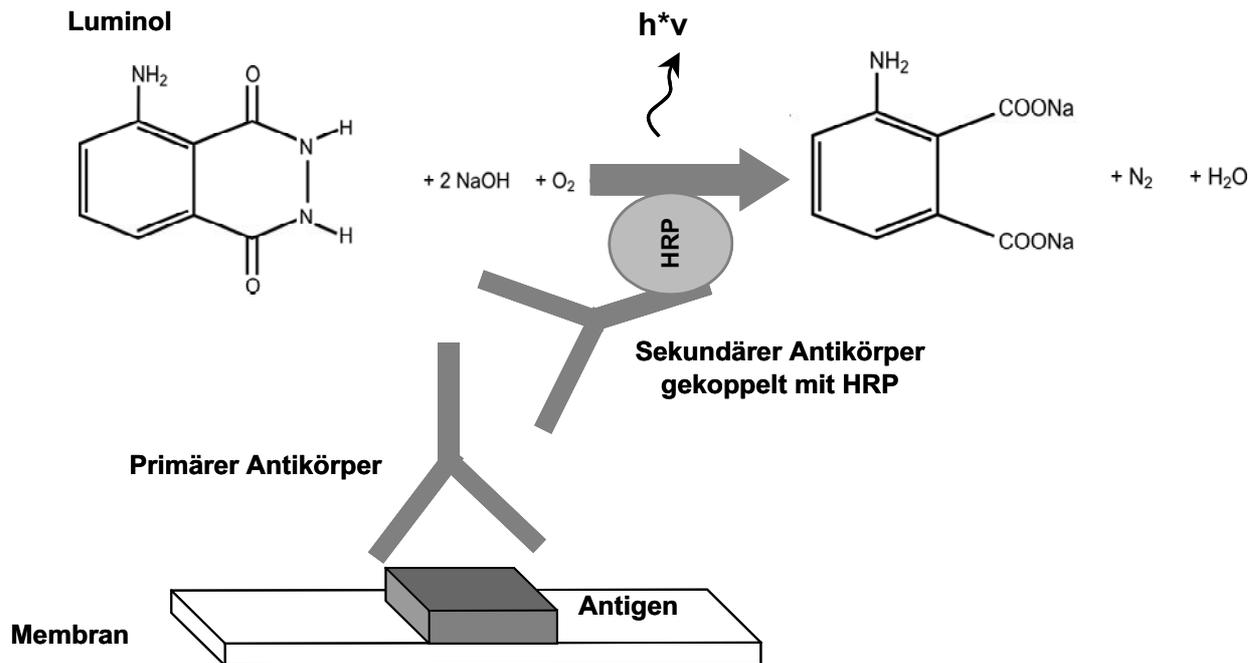


Abb. 29

Schema der Immundetektion: Der primäre Antikörper bindet an sein Antigen, welches auf einer Membran fixiert ist. An diese bindet der sekundäre Antikörper, der mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist. Durch Einfluss der Meerrettich-Peroxidase wird das Substrat Luminol umgesetzt und zur Lumineszenz angeregt.

2.8.6 Detektion mittels „Enhanced Chemiluminescence (ECL) System“

Das Prinzip des ECL-Systems beruht darauf, dass das Reagenz Luminol unter Einfluss der an den sekundären Antikörper konjugierten Meerrettich-Peroxidase umgesetzt und zur Lumineszenz angeregt wird (Abb. 29).

An den Bindungsstellen des sekundären Antikörpers kommt es zur Lichtemission, die zur Schwärzung des aufgelegten Röntgenfilmes führt.

Hier wurde der ECL-Kit der Firma Perkin-Elmer, Waltham, USA verwendet. Beide Komponenten des Detektions-Kits wurden 1:1 gemischt und die Membran mit der Lösung 1 Minute lang gleichmäßig benetzt. Anschließend wurde die Membran in halbtrockenem Zustand in eine Plastikfolie eingelegt und in einer Dunkelkammer 20 Sekunden lang auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm, Firma Amersham Biosciences, Piscataway, USA) aufgelegt. Der Film wurde in einer Entwicklermaschine (Curix 60, Firma Agfa, Jena, Deutschland) entwickelt.

2.9 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Es wurden die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM) berechnet. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde der T-Test nach Student durchgeführt. Bei einem errechneten P-Wert von $\leq 0,05$ wurden die Ergebnisse als signifikant unterschiedlich angesehen. Die Berechnung des Mittelwerts und der T-Tests wurde mit Excel und/oder Sigma Plot 8.0 durchgeführt.

Die EC_{50} -Werte wurden entweder mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 4.0 berechnet oder graphisch ermittelt.

Bei der Berechnung mittels GraphPad Prism wurde die folgende logistische Funktion durch sog. „Fitten“ an die Messwerte der Konzentrations-Wirkungskurven (relative Werte, Effekt ohne Zugabe der zu untersuchenden Substanz entsprach 100%) angenähert und daraus der EC_{50} -Wert berechnet:

$$E = K_2 + \frac{K_1 - K_2}{1 + 10^{(\log EC_{50} - C) \cdot K_3}}$$

- E:* *Effekt*
- K₁:* *asymptotischer Maximalwert*
- K₂:* *asymptotischer Minimalwert*
- K₃:* *Steigungsparameter*
- C:* *Log (Konzentration)*

Falls beim Fitten Anfangs- oder Endwerte ermittelt wurden, die nicht plausibel waren, erfolgte eine Festlegung auf bestimmte Werte.

Bei der graphischen Ermittlung wurden zunächst die relativen Effekte (Effekt ohne Zugabe der zu untersuchenden Substanz entsprach 100%) einer Substanz in Abhängigkeit zur Konzentration in einem Koordinatensystem dargestellt. Die Konzentration bei halbmaximaler Wirkung wurde anschließend graphisch interpoliert.

3 Ergebnisse

3.1 Kontraktionskraft-Messungen am Ductus deferens der Ratte

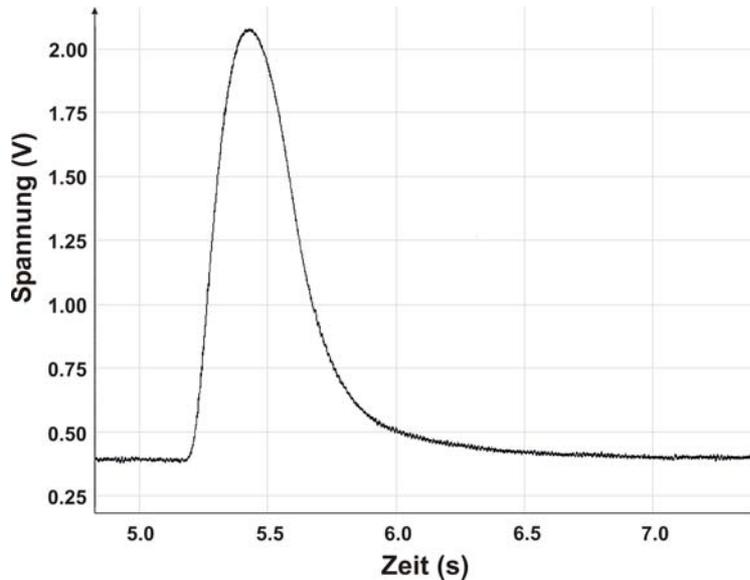
3.1.1 Etablierung des Versuchsmodells

Der Ductus deferens ist ein glattmuskuläres Organ, das reich von Nervenbahnen des Sympathikus innerviert ist. Er stellt somit ein gutes Modell zur Untersuchung sympathischer Vorgänge dar. Insbesondere kann hier die Wirkung von Substanzen sowohl auf die Neurotransmitter-Freisetzung als auch auf die glatte Muskulatur untersucht werden. Durch Aktivierung der sympathischen Nervenbahnen kommt es zur Freisetzung von Neurotransmittern, die dann wiederum Rezeptoren am glatten Muskel aktivieren und so die Kontraktion auslösen (vgl. Abschnitt 1.3.) Die Kontraktionskraft stellt somit einen Indikator für die Neurotransmitter-Freisetzung dar. Um eine differenzierte Aussage über die Wirkung verschiedener Substanzen auf die Freisetzung und auf die glatte Muskulatur treffen zu können, sollte zunächst das Modell Ductus deferens näher charakterisiert werden.

3.1.1.1 Kontraktion durch elektrische Stimulation

3.1.1.1.1 Auswirkung von Reizstärke, Reizfrequenz und Calcium-Konzentration auf die Kontraktionskraft des Ductus deferens

Um optimale Bedingungen zu finden, wurde zunächst die Auswirkung von Reizstärke, Reizfrequenz und Calcium-Konzentration in der Badlösung auf die Kontraktionskraft des Ductus deferens untersucht. Dabei wurde, ausgehend von den Grundparametern maximale Reizstärke (30 V), 0,1 Hz Reizfrequenz und 1,2 mM Calcium, jeweils ein Parameter variiert. Abb. 30 zeigt ein Beispiel eines typischen Kontraktionsverlaufs ausgelöst durch elektrische Stimulation bei einer Reizstärke von 30 V, einer Reizfrequenz von 0,1 Hz und einer Calcium-Konzentration von 4,8 mM.

**Abb. 30**

Kontraktionsverlauf bei elektrischer Stimulation mit maximaler Reizstärke (30 V), 0,1 Hz Reizfrequenz und 4,8 mM Calcium (registriertes Originalsignal). 0,4 V entsprechen einer Kraft von 9,81 mN.

Bei steigender Reizstärke (von 4 V bis gerätebedingt maximal möglichen 30 V) nahm die Kontraktionskraft kontinuierlich zu (Abb. 31 A). Die absolute Kontraktionskraft konnte so von $1,3 \text{ mN} \pm 0,3 \text{ mN}$ auf $8,8 \text{ mN} \pm 1,1 \text{ mN}$ gesteigert werden. Zur Untersuchung von Substanzen mit potentiell hemmender Wirkung wurde im Folgenden die maximale Stimulationsstärke (30 V) verwendet. Für Substanzen mit potentiell steigernder Wirkung wurde eine Stimulationsstärke von 22 V gewählt. Dadurch war zum einen eine ausreichende Kontraktionskraft ($6,8 \text{ mN} \pm 1,1 \text{ mN}$) vorhanden, zum anderen war eine steigernde Wirkung nicht durch maximale Stimulation behindert.

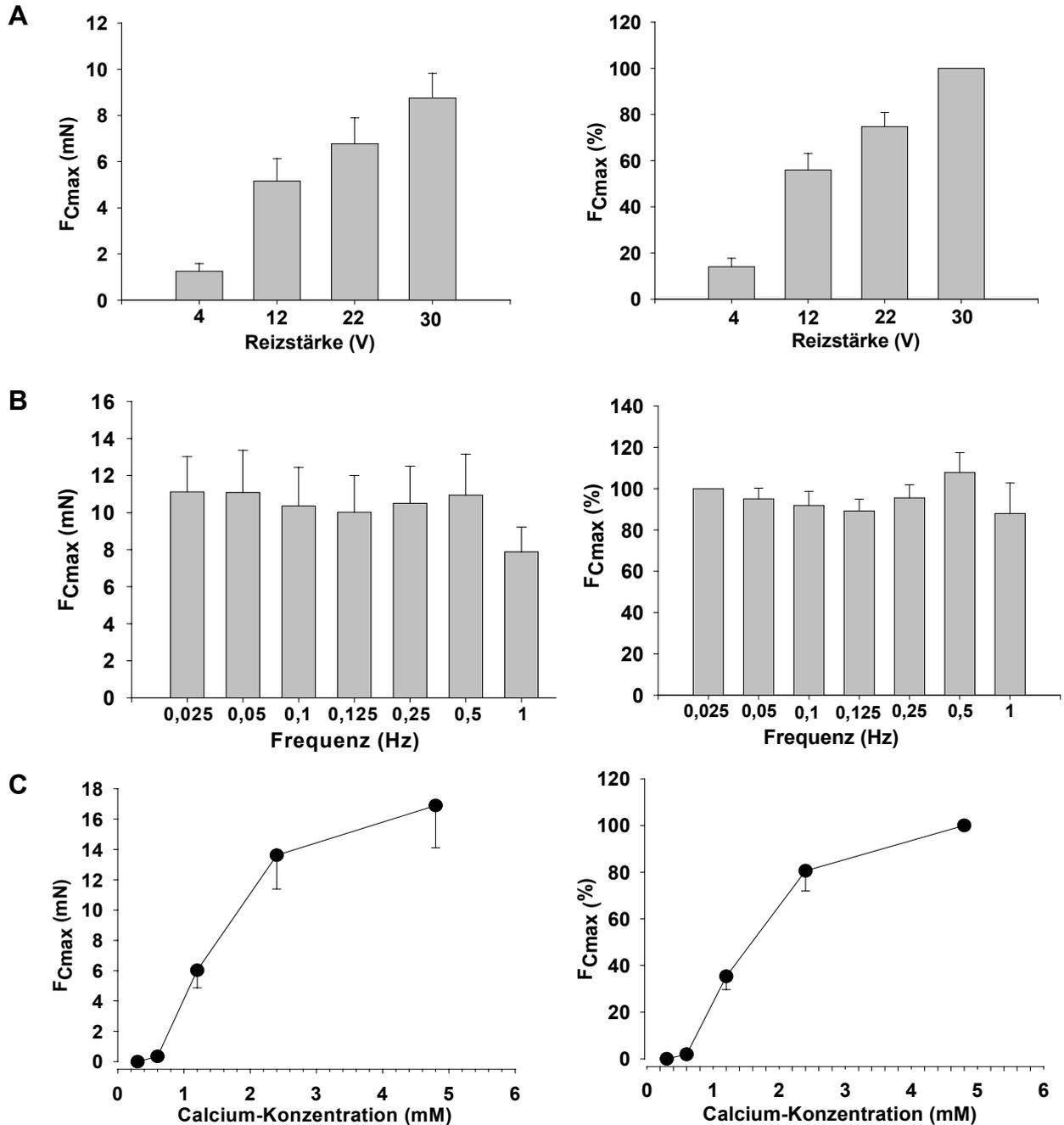


Abb. 31

A: Auswirkung einer Variation der **Reizstärke** auf die Kontraktionskraft bei einer Reizfrequenz von 0,1 Hz und einer Calcium-Konzentration von 1,2 mM. Absolut-Werte (links) und prozentuale Werte (rechts, F_{Cmax} bei 30 V entspricht 100%). Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM aus 6 Versuchen.

B: Auswirkung einer Variation der **Reizfrequenz** auf die Kontraktionskraft bei maximaler Reizstärke (30 V) und einer Calcium-Konzentration von 1,2 mM. Absolut-Werte (links) und prozentuale Werte (rechts, F_{Cmax} bei 0,025 Hz entspricht 100%). Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM aus 6 Versuchen.

C: Auswirkung einer Variation der **Calcium-Konzentration** auf die Kontraktionskraft bei maximaler Reizstärke (30 V) und einer Reizfrequenz von 0,1 Hz. Absolut-Werte (links) und prozentuale Werte (rechts, F_{Cmax} bei 4,8 mM Calcium entspricht 100%). Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM aus 7 Versuchen.

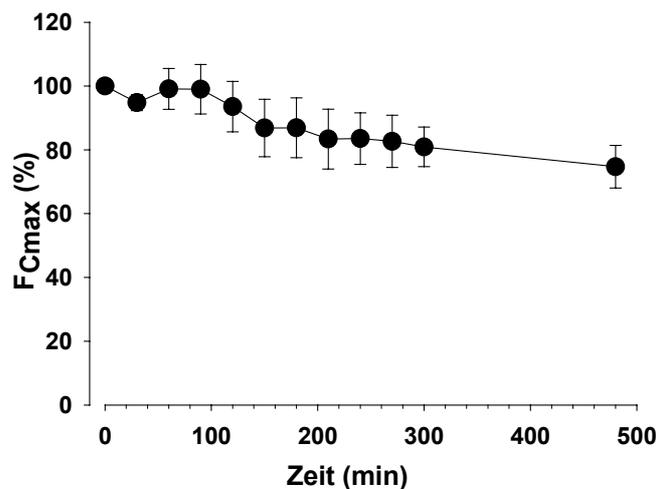
Die Reizfrequenz hatte nur wenig Einfluss auf die Kontraktionskraft (Abb. 31 B). Hier wurde die Frequenz von 0,025 Hz in einzelnen Schritten bis 1 Hz erhöht. Erst bei 1 Hz kam es zu einem leichten, allerdings nicht signifikanten Abfall der Kontraktionskraft. Für die folgenden Versuche wurde eine mittlere Frequenz von 0,1 Hz verwendet.

Außerdem wurde die Auswirkung einer Variation der Calcium-Konzentration auf die Kontraktionskraft untersucht. Die Kontraktionskraft nahm mit steigender Calcium-Konzentration zu. Dabei konnte der größte Anstieg der Kontraktionskraft zwischen den Konzentrationen 0,6 und 2,4 mM beobachtet werden (Abb. 31 C). Aus diesem Grund wurde für die folgenden Versuche die mittlere Calcium-Konzentration von 1,2 mM gewählt (absolute Kontraktionskraft: $6,03 \text{ mN} \pm 1,16 \text{ mN}$).

Im Folgenden sollte außerdem untersucht werden, ob bei elektrischer Stimulation eine konstante Kontraktionskraft über einen längeren Zeitraum erzielt werden kann. Die Versuche am Ductus deferens dauerten maximal 5 Stunden. Abb. 32 zeigt, dass es innerhalb dieser Zeit lediglich zu einer Abnahme der Kontraktionskraft um ca. 20% kommt.

Abb. 32

Kontraktionskraft bei elektrischer Stimulation (0,1 Hz, 30 V) über einen Zeitraum von 8 Stunden. Die Kontraktionskraft zum Zeitpunkt $T = 0$ entspricht 100% und betrug $11,6 \text{ mN} \pm 1,8 \text{ mN}$ (Mittelwerte mit SEM aus 3 Versuchen).



3.1.1.2 Wirkung von ω -Conotoxin GVIA und Amlodipin

Um die Kontraktion durch elektrische Stimulation näher zu charakterisieren, wurde zunächst die Wirkung von zwei Calciumkanal-Blockern, ω -Conotoxin GVIA und Amlodipin untersucht. ω -Conotoxin GVIA ist ein Peptid aus dem Gift der Pfeilgiftschnecke *Conus geographus* und blockiert selektiv neuronale Calcium-Kanäle. Auf glattmuskuläre Calcium-Kanäle hat es kaum einen Einfluss (McCleskey *et al.*, 1987). Amlodipin ist ein Dihydropyridin und blockiert hauptsächlich glattmuskuläre Calcium-Kanäle, wirkt aber auch auf neuronale Calcium-Kanäle (Furukawa *et al.*, 1999). Amlodipin wurde ausgewählt, da es im Gegensatz zu anderen Dihydropyridinen kaum lichtempfindlich und gut wasserlöslich ist. Durch den Vergleich mit der Wirkung von ω -Conotoxin GVIA kann trotz der geringeren

Selektivität eine Aussage über die Aktivierung der glatten Muskulatur bzw. der Neurotransmitter-Freisetzung bei elektrischer Stimulation getroffen werden. Bei einer Aktivierung der Nervenbahnen sollte sowohl ω -Conotoxin GVIA als auch Amlodipin eine hemmende Wirkung haben. Wird die elektrisch induzierte Kontraktion selektiv durch die Freisetzung von Neurotransmittern getragen, sollte die elektrisch induzierte Kontraktion durch ω -Conotoxin GVIA vollständig unterdrückt werden. Bei einer Aktivierung der glatten Muskulatur dagegen sollte nur Amlodipin die Kontraktionskraft reduzieren und ω -Conotoxin GVIA kaum Wirkung haben.

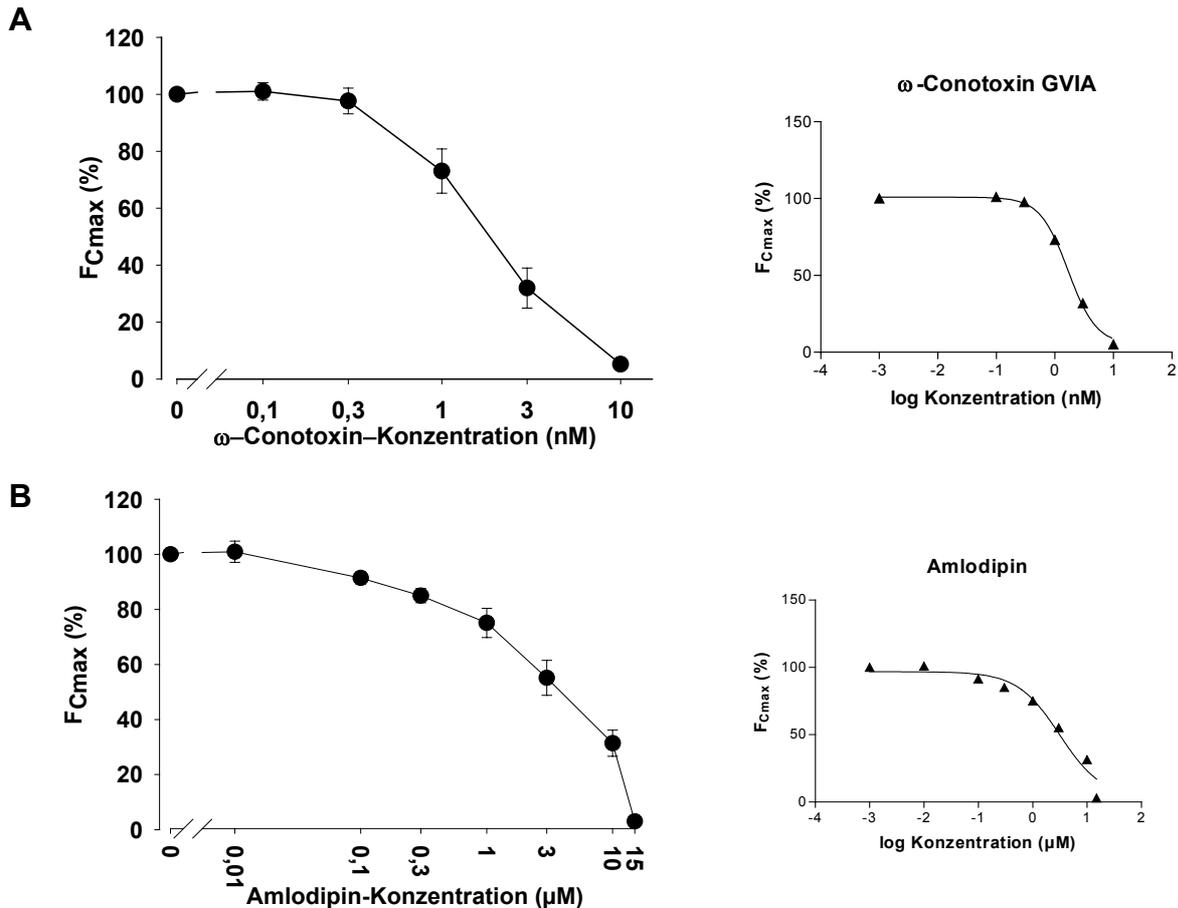


Abb. 33

A: Wirkung von ω -Conotoxin GVIA auf die elektrisch (0,1 Hz, 30 V) induzierte Kontraktion am isolierten Ductus deferens. Die initiale Kontraktion ohne ω -Conotoxin GVIA entspricht 100% und betrug $18,7 \text{ mN} \pm 4,5 \text{ mN}$ (Mittelwerte mit SEM aus 7 Versuchen). Das rechte Bild stellt die gefittete Konzentrations-Wirkungskurve dar: $\log EC_{50} = 0,23 \pm 0,03 \text{ nM}$, $EC_{50} = 1,7 \text{ nM}$. Der untere Endpunkt wurde dabei auf 5,2% festgelegt.

B: Wirkung von Amlodipin auf die elektrisch (0,1 Hz, 30 V) induzierte Kontraktion am isolierten Ductus deferens. Die initiale Kontraktion ohne Amlodipin entspricht 100% und betrug $9,5 \text{ mN} \pm 2,9 \text{ mN}$ (Mittelwerte mit SEM aus 6 Versuchen). Das rechte Bild stellt die gefittete Konzentrations-Wirkungskurve dar: $\log EC_{50} = 0,50 \pm 0,11 \text{ } \mu\text{M}$, $EC_{50} = 3,14 \text{ } \mu\text{M}$. Der untere Endpunkt wurde dabei auf 3,0% festgelegt.

Abb. 33 A zeigt, dass durch den Einfluss von ω -Conotoxin GVIA bereits im nanomolaren Bereich ($EC_{50} = 1,7 \text{ nM}$, $\log EC_{50} = 0,23 \pm 0,03 \text{ nM}$) die Kontraktion bei elektrischer Stimulation fast vollständig gehemmt wird. Hier scheint es also nicht zu einer direkten Beeinflussung der glatten Muskulatur zu kommen, sondern zur Aktivierung neuronaler Calcium-Kanäle und so zur Freisetzung von Neurotransmittern. Diese wiederum aktivieren postsynaptische Rezeptoren und lösen so die Kontraktion der glatten Muskulatur aus. Wie erwartet, zeigt auch Amlodipin eine deutlich hemmende Wirkung (Abb. 33 B) mit einem EC_{50} -Wert von $3,1 \text{ }\mu\text{M}$ ($\log EC_{50} = 0,50 \pm 0,11 \text{ }\mu\text{M}$).

3.1.1.1.3 Wirkung von Prazosin und NF279

Der Ductus deferens wird vom Nervus hypogastricus mit postsynaptischen Fasern des Sympathikus innerviert. Die elektrisch induzierte Kontraktion sollte hauptsächlich durch die Freisetzung von NA bestimmt sein. Allerdings scheint auch ATP als Cotransmitter von NA (Burnstock, 1995; Sneddon *et al.*, 1984) eine nicht unbedeutende Rolle bei der Kontraktion am Ductus deferens zu spielen. Aus diesem Grund wurde die Wirkung des α_1 -Rezeptor-Antagonisten Prazosin (Starke, 2006b) und des selektiven P2X-Rezeptor-Antagonisten, NF279 (Damer *et al.*, 1998), auf die durch elektrische Stimulation ausgelöste Kontraktion untersucht.

Zunächst wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve für Prazosin erstellt (Abb. 34). Mit $8 \text{ }\mu\text{M}$ Prazosin wurde die Kontraktionskraft auf $42,1 \pm 8,7\%$ vom Ausgangswert reduziert.

Um einen genaueren Überblick über die adrenerge und purinerge Komponente an der elektrisch induzierten Kontraktion am Ductus deferens zu erhalten, wurde die kombinierte Wirkung von Prazosin und NF279 untersucht. Als Konzentration wurde für Prazosin $8 \text{ }\mu\text{M}$ gewählt. Nach Damer *et al.* (1998) führten $5 \text{ }\mu\text{M}$ NF279 am Ductus deferens der Ratte zu einer fast vollständigen Unterdrückung der durch α, β -Methylen-ATP induzierten Kontraktion. Um eine vollständige Blockade der P2X-Rezeptoren sicherzustellen, wurde hier die doppelte Konzentration ($10 \text{ }\mu\text{M}$) an NF279 gewählt.

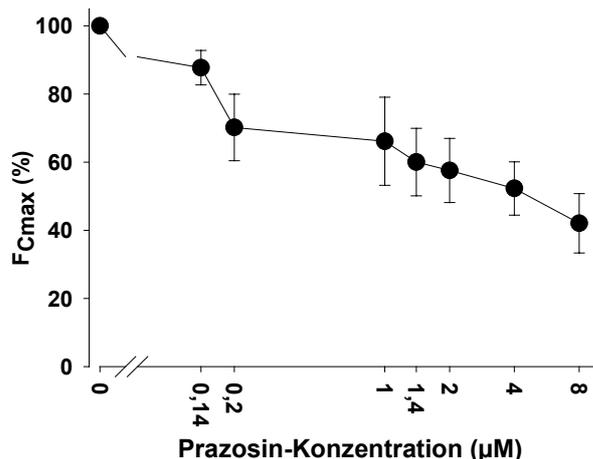


Abb. 34

Wirkung von Prazosin auf die elektrisch ($0,1 \text{ Hz}$, 30 V) induzierte Kontraktion am isolierten Ductus deferens. Die initiale Kontraktion ohne Prazosin entspricht 100% und betrug $4,8 \text{ mN} \pm 1,3 \text{ mN}$ (Mittelwerte mit SEM aus 6 Versuchen).

Bei dem Versuch wurden zunächst 10 μM NF279 vorgelegt und der steady state - Zustand abgewartet (120 Minuten). Anschließend wurden 8 μM Prazosin zugegeben und wiederum der steady state - Zustand (ca. 40 Minuten) abgewartet. Dabei kam es mit NF279 zu einer Reduktion der Kontraktionskraft von $11,3 \text{ mN} \pm 1,5 \text{ mN}$ (ohne Substanz) auf $7,5 \text{ mN} \pm 0,9 \text{ mN}$ was einer Verminderung um 33,6% entspricht (Abb. 35 A und B). Mit Prazosin und NF279 wurde die Kontraktionskraft auf $3,8 \text{ mN} \pm 0,3 \text{ mN}$, d.h. um 79,7% gesenkt.

Der Hauptteil der elektrisch induzierten Kontraktion scheint also durch adrenerge Transmission getragen zu sein. Etwa 30% der Kontraktionskraft scheinen dagegen auf purinerge Transmission zurückzuführen zu sein. Es verbleibt eine Kontraktion von ca. 20%, die weder durch Aktivierung von α 1-Adrenozeptoren, noch durch P2X-Rezeptoren vermittelt ist.

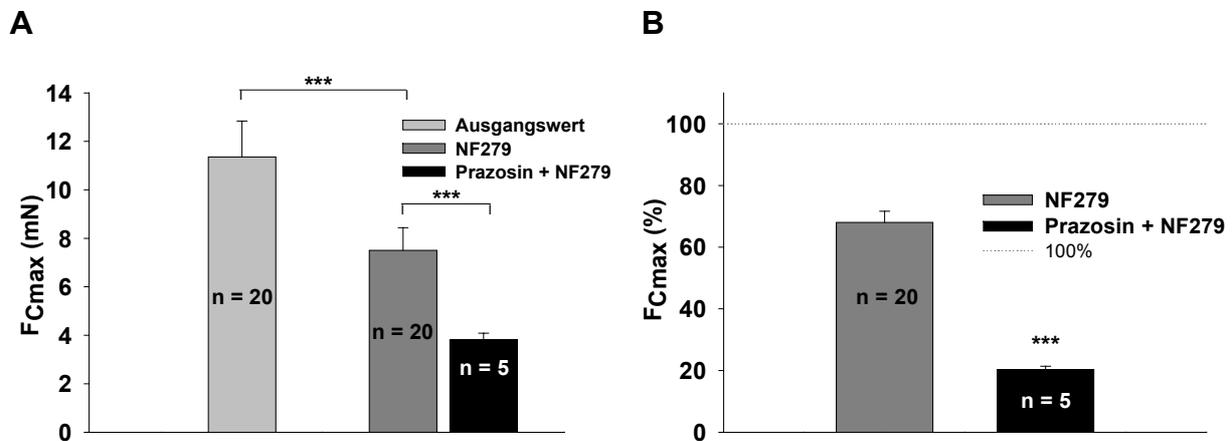


Abb. 35

A: Kontraktionskraft (Mittelwerte mit SEM aus n Versuchen) bei elektrischer Stimulation (0,1 Hz, 30 V) ohne Substanz (Ausgangswertwert) und mit 10 μM NF279 bzw. 8 μM Prazosin plus 10 μM NF279.
B: Prozentuale Werte der Wirkung von 10 μM NF279 bzw. 8 μM Prazosin plus 10 μM NF279 bezogen auf die jeweilige initiale Kontraktion ohne Substanz (Ausgangswertwert). Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM aus n Versuchen. *** $p < 0,001$

3.1.1.1.4 Vorbehandlung mit Reserpin

Reserpin hemmt den vesikulären Monoamin-Transporter und führt so zu einer Hemmung der Aufnahme von Katecholaminen in die Monoamin-Speicher und zur Entleerung der Speicher. Monoamine verbleiben im Axoplasma und werden schließlich von dem Enzym Monoaminoxidase abgebaut (Dorfman *et al.*, 1953; Martinez-Olivares *et al.*, 2006). In höheren Konzentrationen kann es zu einer Zerstörung von Vesikeln kommen.

In einer Versuchsserie wurde den Ratten 24 h vor Versuchsbeginn 5 mg/kg Reserpin injiziert. Abb. 36 zeigt, dass durch die Vorbehandlung mit Reserpin die absolute Kontraktionskraft von $7,9 \text{ mN} \pm 1,8 \text{ mN}$ auf $0,5 \text{ mN} \pm 0,5 \text{ mN}$ reduziert wurde (Abb. 36), was einer Verminderung um 93,7% entspricht. Diese deutliche Reduktion würde für einen erheblichen Noradrenalin-Anteil bei der elektrisch induzierten Kontraktion

sprechen. Allerdings wurde für Reserpin auch eine direkte Wirkung als Calcium-Antagonist am glatten Muskel gefunden (Casteels *et al.*, 1983), was auch zu einer Verminderung der Kontraktionskraft führen könnte. Dass bei der hier gewählten Reserpin-Konzentration auch die glatte Muskulatur beeinflusst wurde, bestätigte sich durch die hemmende Wirkung auf die NA-induzierte Kontraktion (Abb. 39, Verminderung der Kontraktionskraft um 72,6%). Der hier beobachtete Reserpin-Effekt setzt sich deshalb vermutlich aus verminderter Katecholamin-Freisetzung und verminderter Kontraktionskraft des glatten Muskel zusammen.

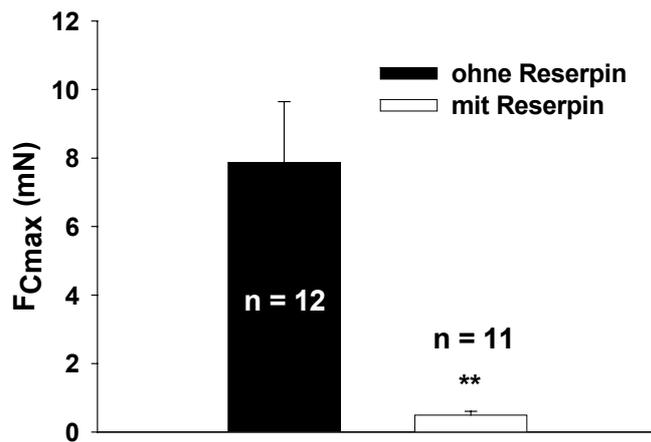


Abb. 36

Vergleich der absoluten Kontraktionskraft bei elektrischer Stimulation (0,1 Hz, 21 V) ohne und nach Vorbehandlung mit Reserpin (5 mg/kg). Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM aus *n* Versuchen. ** $P < 0,01$

3.1.1.2 Kontraktion durch Zugabe von Noradrenalin

Um die Wirkung einer Substanz auf die glatte Muskulatur direkt untersuchen zu können, wurde die Kontraktion am Ductus deferens durch Zugabe von Noradrenalin (NA) ausgelöst. In einem Vorversuch wurde durch kumulative Erhöhung der NA-Konzentration im Organbad die Konzentration von 10 μM ermittelt, die typischerweise eine in Abb. 37 A dargestellte Kontraktion auslöst. Nach Boselli (1998; 1997) lässt sich die NA-induzierte Kontraktion des Ductus deferens in drei Phasen aufteilen: Eine schnelle phasische Komponente, eine langsamere tonische Komponente und periodische Spikes, die die tonische Phase überlagern. Am Ductus deferens scheint die Kontraktion primär durch den Einstrom von extrazellulärem Calcium über L-Typ-Calcium-Kanäle vermittelt zu sein. Sekundär kommt es dann zur Calcium-vermittelten Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, was für die rhythmische Komponente und die Aufrechterhaltung der tonischen Phase verantwortlich ist. Nach Burt *et al.* (1996) ist die initiale, phasische Kontraktion vermutlich von der durch DAG aktivierten Phospholipase C abhängig, was zu einem Calcium-Einstrom über spannungsabhängige Calcium-Kanäle führt. Intrazelluläre Calcium-Speicher scheinen hier eine geringe Rolle zu spielen.

Zur Auswertung kam stets die maximale durch NA induzierte Kontraktionskraft (schnelle, phasische Komponente), da diese in späteren Versuchen mit der Peak-Kraft bei elektrischer Stimulation verglichen werden sollte.

Abb. 37 B zeigt, dass es bei wiederholter Stimulation mit NA zu einem leichten Anstieg der Kontraktionskraft kam. Dieser Anstieg könnte dadurch zustande kommen, dass es zunächst zu einer präsynaptischen Aufnahme des zugegebenen NA über einen Natrium-Cotransporter und dadurch zu einer Minderung der Konzentration an den postsynaptischen Rezeptoren kommt. Bei wiederholter Stimulation kann dieser Mechanismus zunehmend gesättigt werden.

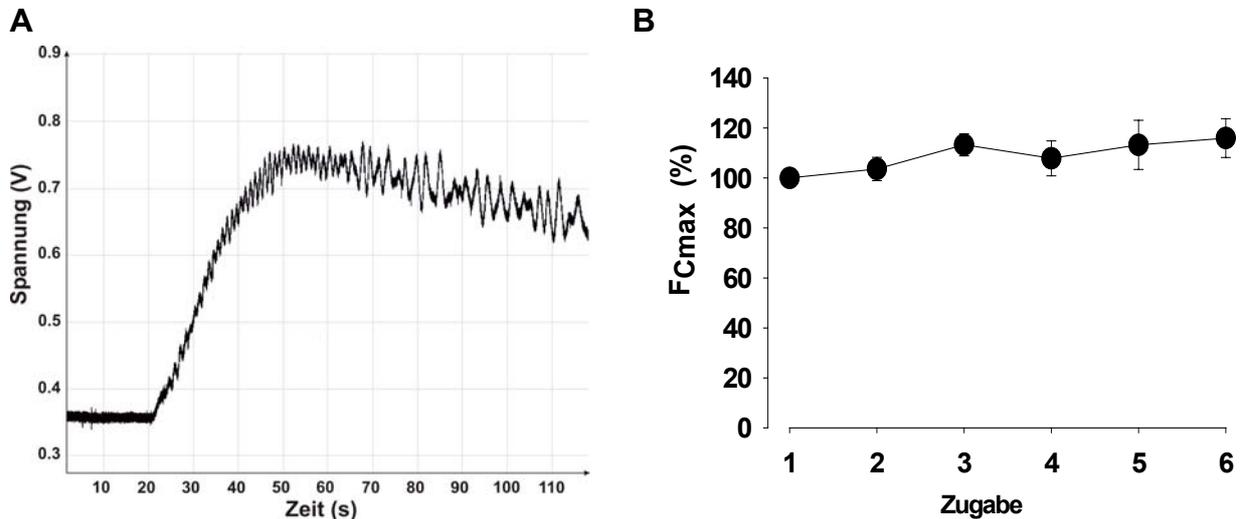


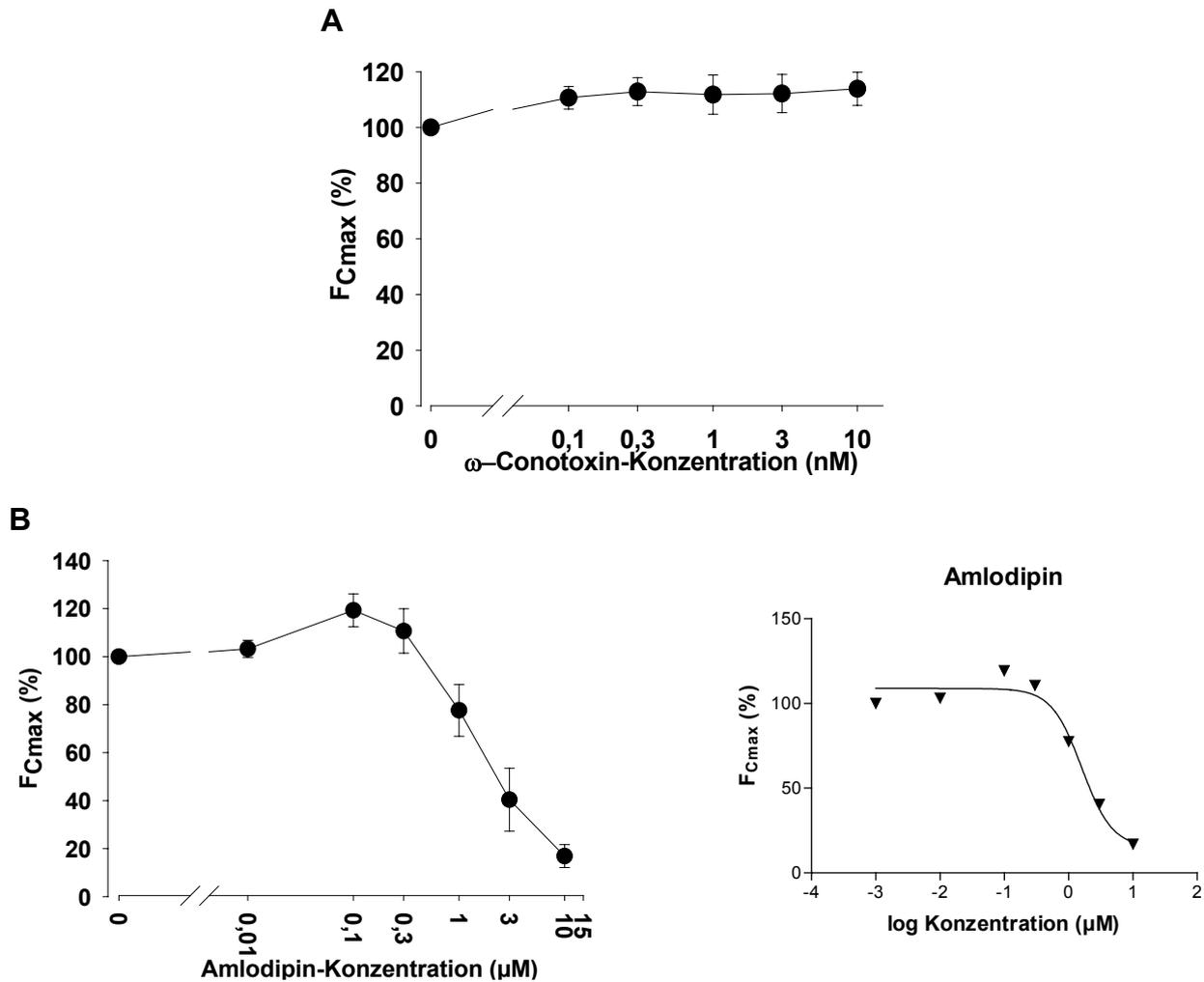
Abb. 37

A: Typischer Kontraktionsverlauf bei Stimulation mit $10 \mu\text{M}$ NA (registriertes Originalsignal). $0,4 \text{ V}$ entsprechen einer Kraft von $9,81 \text{ mN}$.

B: Maximale Kontraktionskraft bei wiederholter Stimulation mit $10 \mu\text{M}$ NA. Die erste mit NA induzierte Kontraktion entspricht 100% und betrug $12,2 \text{ mN} \pm 1,5 \text{ mN}$ (Mittelwerte mit SEM aus 8 Versuchen).

3.1.1.2.1 Wirkung von ω -Conotoxin GVIA und Amlodipin

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei elektrischer Stimulation zeigte ω -Conotoxin GVIA, der selektive Blocker von neuronalen Calcium-Kanälen, bei der NA-induzierten Kontraktion keine Wirkung (Abb. 38 A). Hier kommt es zu einer direkten Stimulation des glatten Muskels ohne Beteiligung der sympathischen Nervenbahnen. Amlodipin dagegen wirkt sowohl auf neuronale als auch auf glattmuskuläre Calcium-Kanäle und hatte hier, wie auch bei der elektrischen Stimulation, eine hemmende Wirkung auf die maximale Kontraktionskraft ($\text{EC}_{50} = 1,6 \mu\text{M}$, $\log \text{EC}_{50} = 0,21 \pm 0,14 \mu\text{M}$). Diese Ergebnisse bestätigen die Beteiligung von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen an der schnellen, phasischen Komponente der NA-induzierten Kontraktion. Die vollständige Hemmung der Kontraktionskraft durch Amlodipin könnte ein Hinweis darauf sein, dass es am Ductus deferens bei Stimulation mit NA primär zur Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle und weniger zu G-Protein gekoppelter Aktivierung intrazellulärer Calcium-Speicher kommt.

**Abb. 38**

A: Wirkung von ω -Conotoxin GVIA auf die mit 10 μ M NA induzierte Kontraktion am Ductus deferens. Die initiale Kontraktion ohne ω -Conotoxin GVIA entspricht 100% und betrug 15,7 mN \pm 0,6 mN (Mittelwerte mit SEM aus 6 Versuchen).

B: Wirkung von Amlodipin auf die durch 10 μ M NA induzierte Kontraktion am Ductus deferens. Die initiale Kontraktion ohne Amlodipin entspricht 100% und betrug 16,0 mN \pm 3,2 mN (Mittelwerte mit SEM aus 6 Versuchen). Das rechte Bild stellt die gefittete Konzentrations-Wirkungskurve dar: $\log EC_{50} = 0,21 \pm 0,14 \mu$ M, $EC_{50} = 1,6 \mu$ M

3.1.1.2.2 Vorbehandlung mit Reserpin

Wie bei der elektrischen Stimulation wurde bei der NA-induzierten Kontraktion die Wirkung von Reserpin untersucht. Dazu wurden die Ratten wie unter 3.1.1.1.4 beschrieben mit Reserpin vorbehandelt. Auch die direkte Stimulation der glatten Muskulatur durch 10 μ M NA wurde durch Reserpin beeinflusst (Abb. 39). Die absolute Kontraktionskraft wurde dabei von 12,4 mN \pm 1,1 mN auf 3,4 mN \pm 0,9 mN reduziert, was einer Verminderung um 72,6% entspricht. Damit ist die Reserpin-Wirkung auf die NA-induzierte Kontraktion nicht so ausgeprägt wie auf die elektrisch induzierte Kontraktion (Verminderung um 93,7%). Wie bereits unter 3.1.1.1.4 beschrieben, kann Reserpin neben der Entleerung der Monoamin-Speicher als Folge eines Calcium-antagonistischen Effekts auch eine direkte Wirkung auf die

Kontraktionskraft der glatten Muskulatur ausüben. Dadurch könnte es zur Hemmung der NA-induzierten Kontraktion kommen.

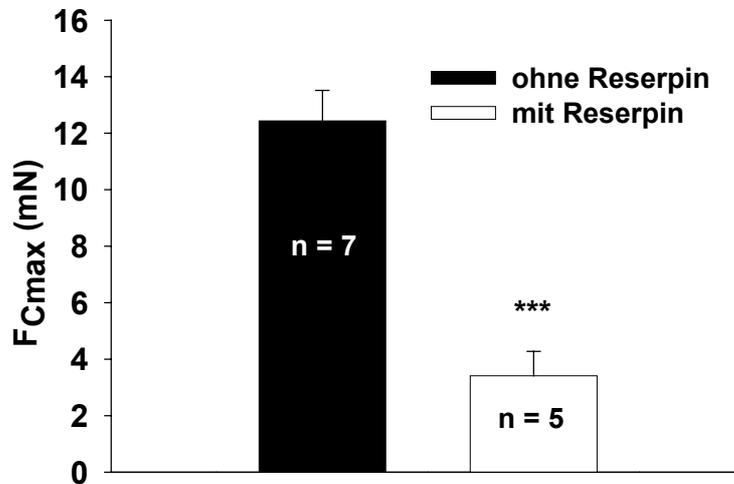


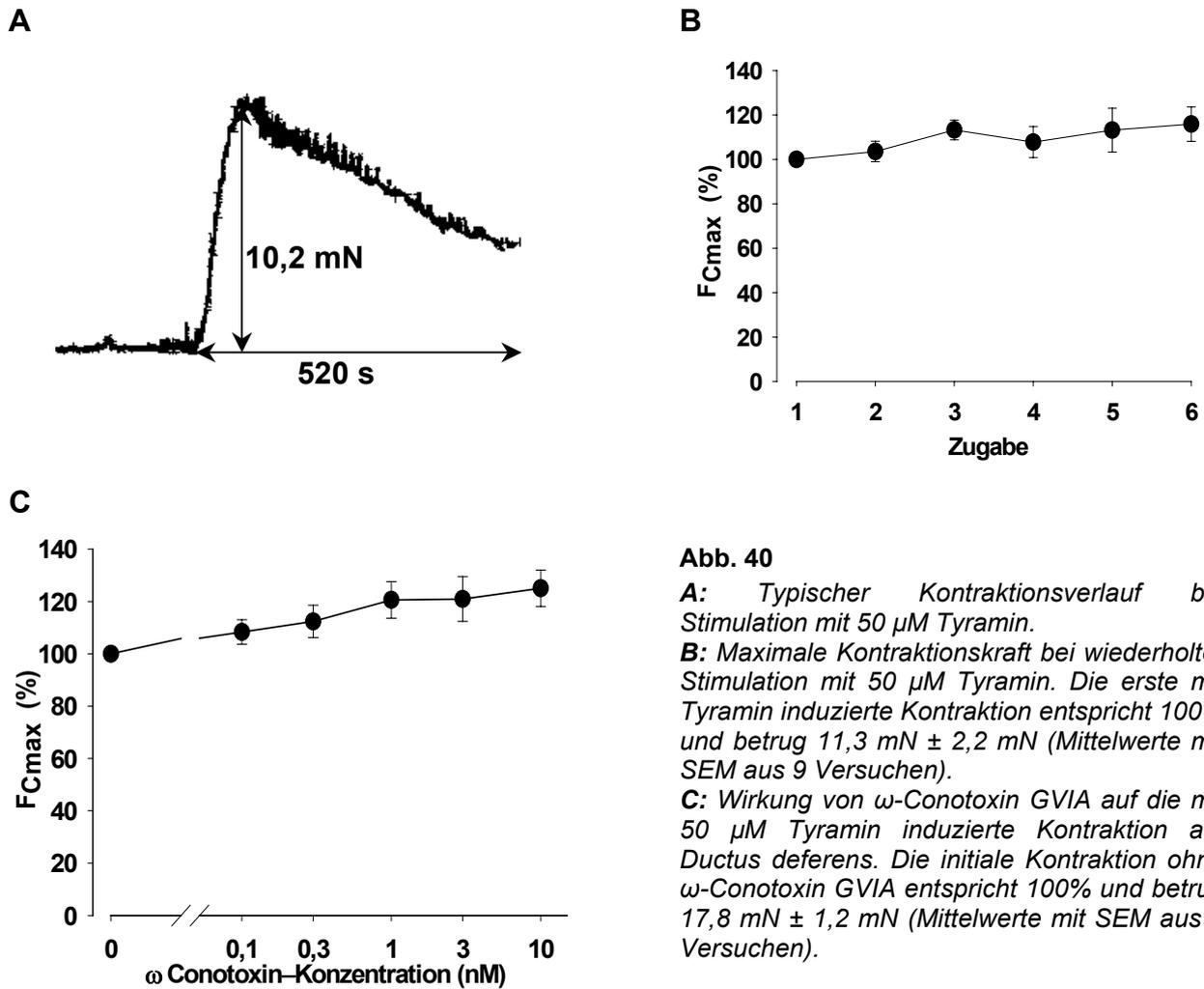
Abb. 39

Vergleich der absoluten Kontraktionskraft bei Stimulation mit 10 μM Noradrenalin ohne und nach Vorbehandlung mit Reserpin (5 mg/kg). Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM aus n Versuchen. *** $P < 0,001$.

3.1.1.3 Kontraktion durch Zugabe von Tyramin

Tyramin ist ein indirektes Sympathomimetikum und führt Calcium-Kanal-unabhängig zur Freisetzung von NA. Es ist in seiner Struktur dem NA sehr ähnlich und wird zunächst im Cotransport mit Na^+ ins Axoplasma aufgenommen. Dort hemmt es kompetitiv sowohl die Aufnahme von freiem NA in die Speichervesikel als auch den Abbau von NA über die Monoaminoxidase. Dadurch steigt sowohl die Konzentration von freiem NA als auch von Na^+ im Axoplasma. Freigesetzt wird NA schließlich zusammen mit Na^+ durch die Umkehr der Transportrichtung des Noradrenalin-Natrium-Cotransporters. Weiter hemmt Tyramin kompetitiv die Wiederaufnahme von NA aus dem synaptischen Spalt (Starke, 2006a).

Die durch 50 μM Tyramin induzierte Kontraktion ist also NA-vermittelt und gleicht deshalb in ihrem Verlauf der durch NA induzierten Kontraktion (Abb. 40 A). Auch mit Tyramin kam es wie mit NA zu einem leichten Anstieg der Kontraktionskraft bei wiederholter Stimulation (Abb. 40 B). Da der Tyramin-induzierten Kontraktion zwar eine NA-Freisetzung aus sympathischen Nervenfasern zugrunde liegt, diese aber unabhängig von neuronalen Calcium-Kanälen ist, blieb die Kontraktion erwartungsgemäß von ω -Conotoxin GVIA unbeeinflusst (Abb. 40 C).



3.1.1.4 Kontraktion durch Erhöhung der Kalium-Ionen-Konzentration

Durch Erhöhung der Kalium-Ionen- (K^+) Konzentration kommt es zu einer Depolarisation und somit zur Öffnung spannungsabhängiger Natrium- und Calcium-Kanäle sowohl am Nerven als auch am glatten Muskel. Um die optimale K^+ -Konzentration zu ermitteln wurde zunächst eine Konzentrations-Wirkungskurve mit K^+ erstellt. Dazu wurde durch sequenzielle Zugabe einer konzentrierten KCl-Lösung in das Organbad die K^+ -Konzentrationen im Bereich von 15 bis 75 mM kontinuierlich erhöht. Da die K^+ -Konzentration der Nährlösung im Organbad bereits 5,9 mM betrug (s. Tabelle 1), variierte die K^+ -Endkonzentration zwischen 20,9 und 80,9 mM. In Abb. 41 B ist zu erkennen, dass es bei einer Zugabe von 45 mM K^+ zu einem deutlichen Anstieg der Kontraktionskraft kam, die durch weitere Erhöhung der K^+ -Konzentration allerdings nur noch wenig gesteigert werden konnte. Aus diesem Grund wurde für weitere Untersuchungen eine Stimulation mit 45 mM K^+ gewählt (Endkonzentration im Organbad: 50,9 mM). Ein typischer durch 45 mM K^+ induzierter Kontraktionsverlauf ist in Abb. 41 A dargestellt. Abb. 41 C zeigt die Kontraktionskraft bei wiederholter Stimulation mit K^+ . Es kam dabei zu einem Anstieg der

Kontraktionskraft, der bei der Interpretation von Konzentrations-Wirkungskurven unter K^+ -Stimulation berücksichtigt werden sollte.

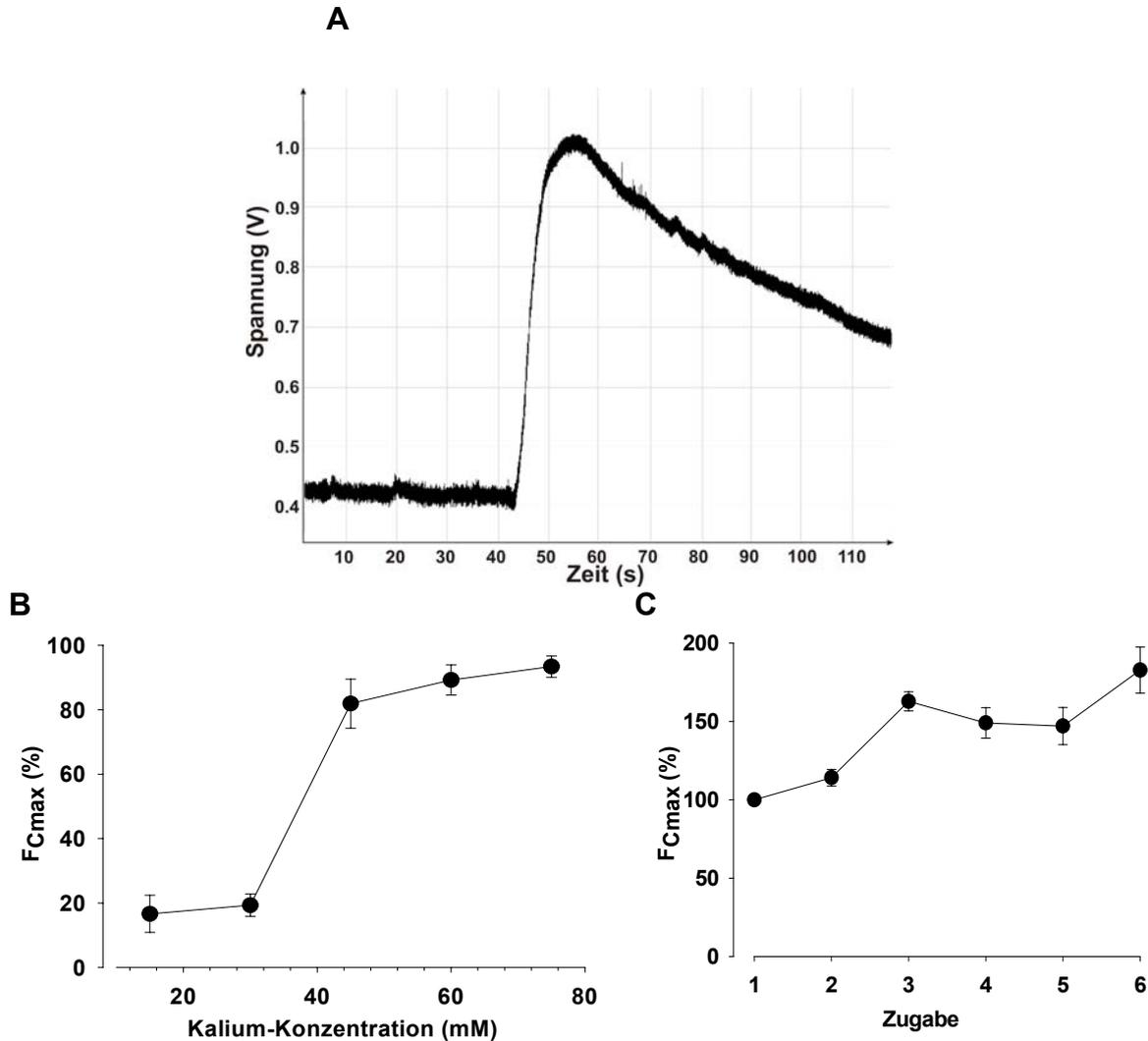


Abb. 41

A: Typischer Kontraktionsverlauf bei Stimulation mit 45 mM K^+ (registriertes Originalsignal). 0,4 V entsprechen einer Kraft von 9,81 mN.

B: Wirkung von steigenden K^+ -Konzentrationen auf die maximale Kontraktionskraft am isolierten Ductus deferens. Zur Auswertung wurde die bei den Einzelversuchen jeweils maximal erzielte Kontraktion nach Zugabe von 15 bis 75 mM K^+ als 100% angenommen. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus 6 Versuchen.

C: Maximale Kontraktionskraft bei wiederholter Stimulation mit 45 mM Kalium. Die erste mit Kalium induzierte Kontraktion entspricht 100% und betrug $7,2 \text{ mN} \pm 1,5 \text{ mN}$ (Mittelwerte und SEM aus 8 Versuchen).

3.1.1.4.1 Wirkung von ω -Conotoxin GVIA und Amlodipin

Auch bei der Stimulation mit K^+ wurde die Wirkung der beiden Calcium-Kanal-Blocker ω -Conotoxin GVIA und Amlodipin untersucht. ω -Conotoxin GVIA zeigte nur eine geringe Wirkung auf die K^+ -induzierte Kontraktion (Abb. 42 A). Berücksichtigt man allerdings den Kontrollversuch, bei dem es bei wiederholter Stimulation zu einer Steigerung der Kontraktionskraft kam (Abb. 41 C), könnte ω -Conotoxin GVIA eine

leicht hemmende Wirkung haben. Insgesamt scheint bei der Kontraktion durch K^+ die Aktivierung von neuronalen Calcium-Kanälen und damit die Freisetzung von Neurotransmittern allerdings eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Amlodipin dagegen führte zu einer deutlichen Hemmung der Kontraktionskraft mit einem EC_{50} -Wert von $2,4 \mu M$ ($\log EC_{50} = 0,39 \pm 0,13 \mu M$, Abb. 42 B).

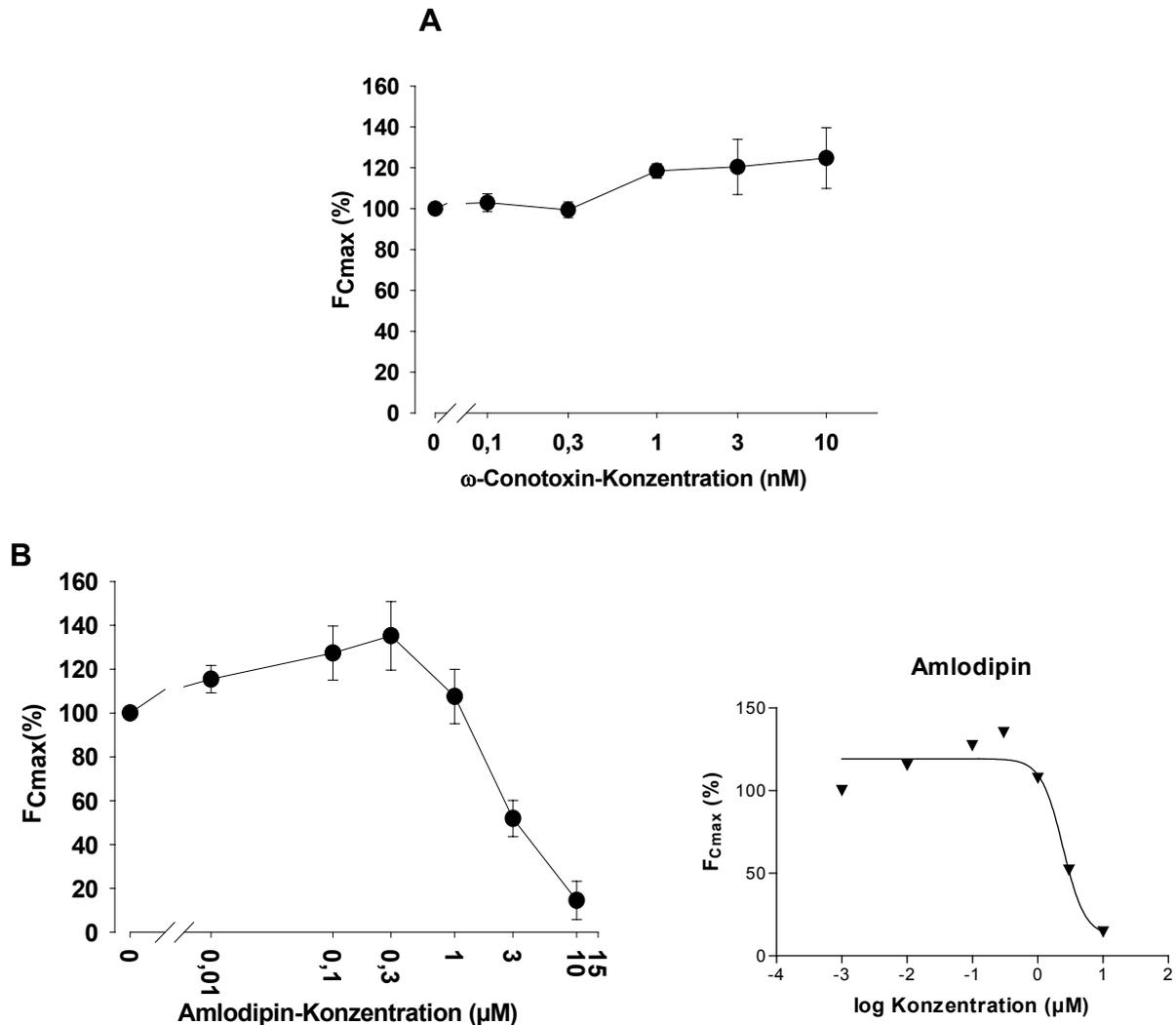


Abb. 42

Wirkung von ω -Conotoxin GVIA (**A**) und Amlodipin (**B**) auf die durch Zugabe von $45 \text{ mM } K^+$ induzierte Kontraktion am Ductus deferens. Die initialen Kontraktionen ohne ω -Conotoxin GVIA (Absolutwert: $12,4 \text{ mN} \pm 2,2 \text{ mN}$) bzw. Amlodipin (Absolutwert: $17,8 \text{ mN} \pm 2,8 \text{ mN}$) entsprechen 100% (Mittelwerte mit SEM aus 6 Versuchen). Die Abbildung unten rechts stellt die gefittete Amlodipin-Wirkungskurve dar: $\log EC_{50} = 0,39 \pm 0,13 \mu M$, $EC_{50} = 2,4 \mu M$.

3.1.1.5 Zusammenfassung

Am Ductus deferens konnte durch verschiedene Arten der Stimulation Calcium-Kanal-abhängig und -unabhängig eine Kontraktion ausgelöst werden.

Die **elektrisch induzierte Kontraktion** konnte durch den selektiven neuronalen Calcium-Kanal-Blocker ω -Conotoxin GVIA fast vollständig unterdrückt werden (Abb. 33 A). Es kommt hier also zur Aktivierung der sympathischen Nervenbahnen, die

glatte Muskulatur wird dagegen nicht direkt beeinflusst. Die Wirkung von Prazosin weist darauf hin, dass die Kontraktion dabei vermutlich zum größeren Teil Noradrenalin-vermittelt ist. Allerdings scheinen auch andere Neurotransmitter an der elektrisch induzierten Kontraktion beteiligt zu sein. ATP spielt dabei vermutlich eine große Rolle, worauf die Wirkung von NF279 hinweist (Abb. 35).

Durch die **Stimulation mit Tyramin** kommt es dagegen Calcium-Kanal-unabhängig zur Freisetzung von Katecholaminen. ω -Conotoxin GVIA zeigt hier keine Wirkung (Abb. 40 C).

Die Zugabe von **Noradrenalin** ermöglicht eine direkte Stimulation der glatten Muskulatur und bietet somit die Möglichkeit die direkte Wirkung von Substanzen auf die glatte Muskulatur zu untersuchen. Die Kontraktionskraft wird hier durch ω -Conotoxin GVIA nicht beeinflusst. Amlodipin dagegen, das auch auf glattmuskuläre Calcium-Kanäle wirkt, hemmt die Kontraktionskraft (Abb. 38).

Durch den Vergleich der Wirkungskurven von Substanzen bei elektrischer Stimulation bzw. Tyramin-induzierter Kontraktion und bei NA-induzierter Kontraktion kann zusätzlich deren Wirkung auf die Calcium-Kanal-abhängige und -unabhängige Neurotransmitter-Freisetzung abgeschätzt werden. Unter dem Einfluss des P2X-Rezeptor-Blockers NF279 bei elektrischer Stimulation kann außerdem die Wirkung von ATP geblockt werden und so eine genauere Aussage über die Wirkung von Substanzen auf die NA-Freisetzung alleine getroffen werden.

Auch bei der **Stimulation mit Kalium** zeigt ω -Conotoxin GVIA nur eine geringe Wirkung. Amlodipin dagegen hemmt die Kontraktion fast vollständig (Abb. 42). Dies deutet darauf hin, dass durch Kalium v.a. spannungsabhängige Calcium-Kanäle der glatten Muskulatur aktiviert werden. Dadurch bietet sich eine weitere Möglichkeit die direkte oder indirekte Wirkung von Substanzen auf spannungsabhängige Calcium-Kanäle an der glatten Muskulatur zu untersuchen.

3.1.2 Darstellung der Ergebnisse

Die Kontraktionskraft der einzelnen Präparate, die von unterschiedlichen Versuchstieren entnommen wurden, variierte erheblich. Um eine Normierung zu erreichen, wurden bevorzugt Prozent-Werte verwendet, wobei im allgemeinen die Kontraktionskraft vor Zugabe der Substanzen als 100% definiert wurde. Dies ermöglichte den Vergleich der Wirkungen verschiedener Substanzen. Zur Darstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden die Prozentwerte zunächst für jeden Einzelversuch ermittelt und anschließend die Mittelwerte und Standardfehler berechnet. Die Mittelwerte und Standardfehler der absoluten Ausgangswerte sind jeweils bei den einzelnen Darstellungen mit angegeben.

Wie oben beschrieben, setzt sich die elektrisch induzierte Kontraktion aus Freisetzung von Neurotransmittern (adrenergen und nicht adrenergen) und Aktivierung der glatten Muskulatur zusammen und stellt somit ein gutes Modell dar, die Wirkung einer Substanz auf das Gesamtsystem zu untersuchen. Die Zugabe von

NA dagegen stimuliert die glatte Muskulatur direkt. Die Differenzbildung zwischen den Wirkungskurven bei elektrischer Stimulation und bei Stimulation mit NA bietet somit die Möglichkeit, die Wirkung einer Substanz auf die Neurotransmitter-Freisetzung abzuschätzen. Zur Berechnung der Differenzkurven wurden die Konzentrations-Wirkungskurven auf der y-Achse so verschoben, dass der als 100% definierte initiale Wert ohne Substanzzugabe 0% ergab. Durch die Verschiebung stellen die so erhaltenen Werte die reine Wirkung einer Substanz dar, wodurch die Werte der Wirkungskurven direkt voneinander subtrahiert werden konnten. Die so ermittelte Wirkung einer Substanz auf die Neurotransmitter-Freisetzung bietet einen guten Anhaltspunkt, stellt aber nur eine Näherung dar. Zum einen stößt das Verfahren an seine Grenzen, sobald die Kontraktionskraft durch den Einfluss einer Substanz vollständig unterdrückt wird. Zum anderen stellt NA zwar die Hauptkomponente der Freisetzung dar, jedoch sind auch andere Neurotransmitter beteiligt, die bei dieser Darstellung nicht berücksichtigt werden. Aus diesem Grund wurde bei ausgewählten Substanzen zusätzlich deren Wirkung in Anwesenheit von NF279 untersucht.

3.1.3 Veratrum-Alkaloide

Die Inhaltsstoffe von *Veratrum album* zeigen zahlreiche Wirkungen, die auf die Beeinflussung der Katecholamin-Freisetzung und/oder der glatten Muskulatur hinweisen. So wurde z.B. ein Gemisch von Protoveratrin A und B früher bei akuter Hypertonie eingesetzt (Wagner, 1999). Wegen geringer therapeutischer Breite wird *Veratrum album* heute in der Schulmedizin allerdings nicht mehr eingesetzt und findet nur noch in der Homöopathie Verwendung (vgl. auch Abschnitt 1.4.1).

Im Folgenden wurde die Wirkung der Ceveratrum-Alkaloide Veratridin, Cevadin und Germitrin, des von Germitrin abgeleiteten Germin-3-Acetats und des Jerveratrum-Alkaloids Veratramin auf die Kontraktion des Ductus deferens untersucht.

3.1.3.1 Ceveratrum-Alkaloide

3.1.3.1.1 Veratridin

Veratridin gilt allgemein als Öffner oder Aktivator von spannungsabhängigen Natrium-Kanälen. Bisher wurde gezeigt, dass Veratridin in hohen Konzentrationen (3 - 100 μM) am Ductus deferens zur Freisetzung von Noradrenalin führt. Diese setzte sich aus einer TTX-sensitiven Phase und einer nicht TTX-sensitiven Phase zusammen (Bönisch *et al.*, 1983). Außerdem zeigten elektrophysiologische Untersuchungen, dass Veratridin die Inaktivierung von geöffneten Natrium-Kanälen an Nerven (Ulbricht, 1998) und am Herzen (Honerjäger, 1982) verzögert. Im Folgenden sollte die Wirkung von Veratridin im niedrigen Konzentrationsbereich von 0,3 μM bis 2 μM untersucht werden. Ohne Stimulation zeigte Veratridin in diesem

Konzentrationsbereich keine Wirkung am isolierten Ductus deferens. Bei elektrisch induzierter Kontraktion dagegen führte bereits eine Konzentration von 0,3 μM zu einer deutlichen Zunahme der Kontraktionskraft (Abb. 43 A) mit einem Maximum bei 0,5 μM (Steigerung der Kontraktionskraft um 78,9%). Die graphische Ermittlung der EC_{50} ergibt für die aufsteigende Komponente der Konzentrations-Wirkungskurve einen Wert von 0,22 μM . Im höheren Konzentrationsbereich (ab 1,0 μM) kam es durch Veratridin allerdings wieder zur Abnahme der Kontraktion, gekoppelt mit einer zunehmenden Kontraktur der Muskulatur. Dies könnte durch eine Calcium-Überladung der Muskelzellen und einer damit verbundenen zunehmenden Entleerung der intrazellulären Calcium-Speicher verursacht sein.

Auf die NA-induzierte Kontraktion zeigte Veratridin dagegen keinen Effekt. Auch traten in diesem Zusammenhang keine sichtbaren Kontrakturen auf.

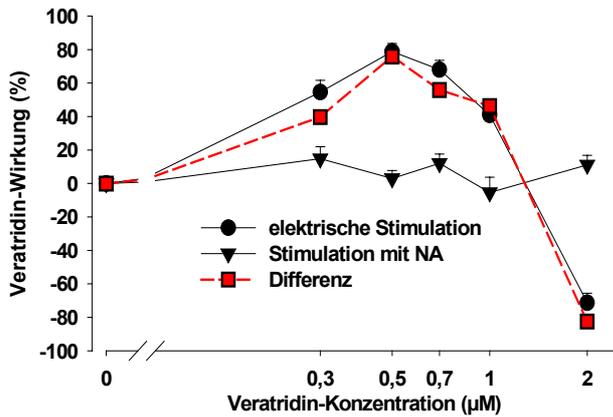
Die Wirkung geringer Konzentrationen Veratridin auf die elektrische Stimulation könnte also v.a. durch eine Steigerung der Neurotransmitter-Freisetzung zustande kommen. Durch Differenzbildung aus den Wirkungskurven bei elektrischer Stimulation und bei Stimulation mit Noradrenalin erhält man einen Hinweis auf die reine Beeinflussung der Neurotransmitter-Freisetzung durch Veratridin (Abb. 43 A). Die Freisetzung scheint demnach zunächst gesteigert und ab 1 μM gehemmt zu werden. Die Veratridin-Wirkung auf die Freisetzung könnte im höheren Konzentrationsbereich allerdings auch durch die Beeinflussung der intrazellulären Calcium-Bewegungen des glatten Muskels, erkennbar durch das verstärkte auftretenden von Kontrakturen, maskiert sein.

Um genauere Aussagen über den Effekt des Veratridins auf die NA-Freisetzung machen zu können, wurde zusätzlich dessen Wirkung auf die elektrische Stimulation in Anwesenheit des P2X-Rezeptor-Blockers NF279 (Damer *et al.*, 1998) untersucht (Abb. 43 B). Durch die Blockade des P2X-Rezeptors am glatten Muskel wird die Wirkung des Cotransmitters ATP unterdrückt und die elektrisch induzierte Kontraktion sollte v.a. von NA getragen sein. Da die bisherigen Versuche gezeigt haben, dass Veratridin keinen direkt messbaren Einfluss auf die NA-induzierte Kontraktion am glatten Muskel hat, sollte die Wirkung von Veratridin unter NF279 v.a. durch die Beeinflussung der Freisetzung von NA bedingt sein. Beide Wirkungskurven (mit und ohne NF279) sind in ihrem Verlauf ähnlich. Die steigernde Wirkung von Veratridin auf die Kontraktionskraft war im Bereich von 0,3 μM bis 0,5 μM unter NF279 allerdings etwas geringer ausgeprägt. Eine Berechnung des EC_{50} -Wertes erschien aufgrund des Kurvenverlaufs nicht sinnvoll.

Außerdem sollte die Wirkung von Veratridin unter Einfluss von Reserpin untersucht werden. Dazu wurden an mit Reserpin (5 mg/kg) vorbehandelten Ratten erneut Veratridin-Wirkungskurven bei elektrischer und NA-induzierter Kontraktion erstellt. Durch Reserpin kam es zu einer erheblichen Verminderung der initialen Kontraktionskraft sowohl bei elektrischer Stimulation als auch bei Stimulation mit NA (vgl. Abb. 36 und Abb. 39). In der prozentualen Darstellung der Veratridin-Wirkungskurve (Abb. 43 C) ist zu erkennen, dass Veratridin wie bei den Untersuchungen ohne Reserpin keinen Einfluss auf die NA-induzierte Kontraktion

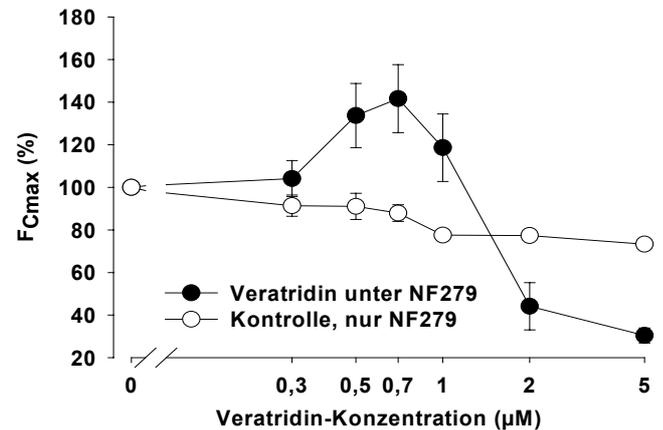
ausübte. Die elektrisch induzierte Kontraktion wurde dagegen erheblich gesteigert. Ab einer Konzentration von $0,7 \mu\text{M}$ war dieser Effekt außerdem deutlicher ausgeprägt als ohne Reserpin. Der EC_{50} -Wert betrug $0,4 \mu\text{M}$ ($\log \text{EC}_{50} = -0,36 \pm 0,05 \mu\text{M}$). Sowohl unter Reserpin als auch unter NF279 konnten keine Kontraktionen der glatten Muskulatur beobachtet werden.

A



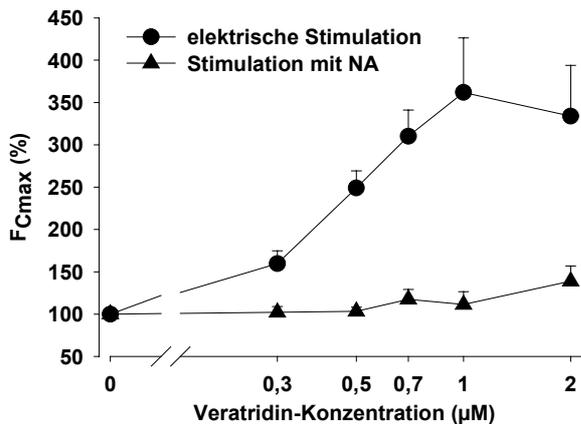
B

Wirkung unter NF279



C

Wirkung unter Reserpin



Veratridin unter Reserpin

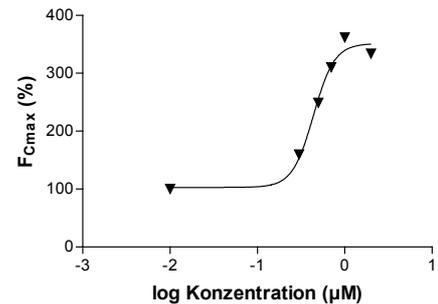


Abb. 43

A: Wirkung von Veratridin auf die elektrisch induzierte (21 V, 0,1 Hz, $n=6$) und die NA-induzierte ($10 \mu\text{M}$, $n=7$) Kontraktion und die aus der Differenz der beiden Wirkungskurven berechnete Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung. Zur Differenzbildung wurde die initiale Kontraktion ohne Zugabe von Veratridin auf 0% gesetzt (eine genaue Erklärung zur Darstellungsweise bietet Kapitel 3.1.2). Die initialen Absolutwerte waren $9,0 \text{ mN} \pm 3,8 \text{ mN}$ bei elektrischer Stimulation und $12,4 \text{ mN} \pm 1,1 \text{ mN}$ bei Stimulation mit NA. Negative Werte stellen eine Minderung, positive Werte eine Steigerung der Kontraktionskraft dar.

B: Wirkung von Veratridin auf die elektrisch induzierte Kontraktion (30 V, 0,1 Hz, $n=6$) in Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ NF279. Die Kontraktion nach 120-minütiger Einwirkzeit von NF279, ohne Zugabe von Veratridin, entspricht 100%. Zusätzlich ist die Kontrolle unter NF279 ohne Veratridin dargestellt ($n=4$). Die Kontrollwerte ohne Veratridin wurden jeweils zu den gleichen Zeitpunkten wie die Werte mit den entsprechenden Konzentrationen Veratridin ermittelt.

C: Wirkung von Veratridin auf die elektrisch (21 V, 0,1 Hz, $n=6$) und Noradrenalin-induzierte ($10 \mu\text{M}$, $n=5$) Kontraktion unter Vorbehandlung mit Reserpin (24 h, 5 mg/kg). Die initiale Kontraktion unter dem Einfluss von Reserpin, ohne Zugabe von Veratridin, entspricht 100% und betrug $0,5 \text{ mN} \pm 0,2 \text{ mN}$ bei elektrischer Stimulation und $3,4 \text{ mN} \pm 0,9 \text{ mN}$ bei Stimulation mit NA. Die Abbildung rechts stellt die gefittete Veratridin-Wirkungskurve bei elektrischer Stimulation unter Reserpin-Einfluss dar: $\log \text{EC}_{50} = -0,36 \pm 0,05 \mu\text{M}$, $\text{EC}_{50} = 0,4 \mu\text{M}$.

3.1.3.1.2 Cevadin

Von Honerjäger wurde die Wirkung von Cevadin an kultivierten Neuroblastoma-Zellen untersucht. Dabei wurde die Aufnahme von $^{22}\text{Na}^+$ nach Inkubation in Na^+ -freier Lösung gemessen. Bis zu einer Konzentration von 1 mM konnte Cevadin keine Steigerung des Natrium-Einstroms induzieren und antagonisierte sogar den stimulierenden Effekt des Veratridins (Honerjäger *et al.*, 1982).

An kultivierten ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte zeigte Cevadin (10 μM bis 30 μM) eine ähnliche Wirkung auf den Natrium-Kanal wie Veratridin und verzögerte dessen Inaktivierung (Honerjäger *et al.*, 1992).

Am Ductus deferens sollte auch für Cevadin der niedrige Konzentrationsbereich von 0,3 μM bis 2 μM untersucht werden. Im Konzentrationsbereich bis 0,7 μM führte Cevadin wie Veratridin zu einer Steigerung der elektrisch induzierten Kontraktionskraft (Abb. 44). Die graphische Ermittlung der EC_{50} ergibt für die aufsteigende Komponente der Kontraktions-Wirkungskurve einen Wert von 0,19 μM . Dieser Wert ist vergleichbar mit dem EC_{50} -Wert von Veratridin (0,22 μM , vgl. 3.1.3.1.1). Die maximal steigernde Wirkung von Cevadin bei 0,7 μM war allerdings etwas geringer als die maximal steigernde Wirkung von Veratridin bei 0,5 μM (Steigerung der Kontraktionskraft um $50\% \pm 17\%$ gegenüber Steigerung um $79\% \pm 5\%$). Die NA-induzierte Kontraktion wurde in diesem Konzentrationsbereich durch Cevadin nur leicht erhöht. In den Konzentrationen von 1 μM bis 2 μM kam es allerdings, anders als mit Veratridin, zu einer deutlichen Steigerung der NA-induzierten Kontraktion (maximal um $52\% \pm 11\%$ bei 1,7 μM bei einem EC_{50} -Wert von 1,4 μM , graphische Ermittlung) während die Kontraktion bei elektrischer Stimulation wieder annähernd den Ausgangswert ohne Cevadin erreichte. Eine Hemmung durch hohe Konzentrationen bei elektrischer Stimulation oder das Auftreten von Kontrakturen, wie mit Veratridin, konnte unter Cevadin nicht beobachtet werden. Betrachtet man allerdings die Wirkung von Cevadin auf die Neurotransmitter-Freisetzung, dargestellt durch Differenzbildung aus den Wirkungskurven bei elektrischer Stimulation und bei Stimulation mit Noradrenalin, ergab sich im Verlauf eine ähnliche Wirkung wie mit Veratridin. Die Freisetzung schien zunächst gesteigert zu werden, während im höheren Konzentrationsbereich möglicherweise eine Hemmung auftrat.

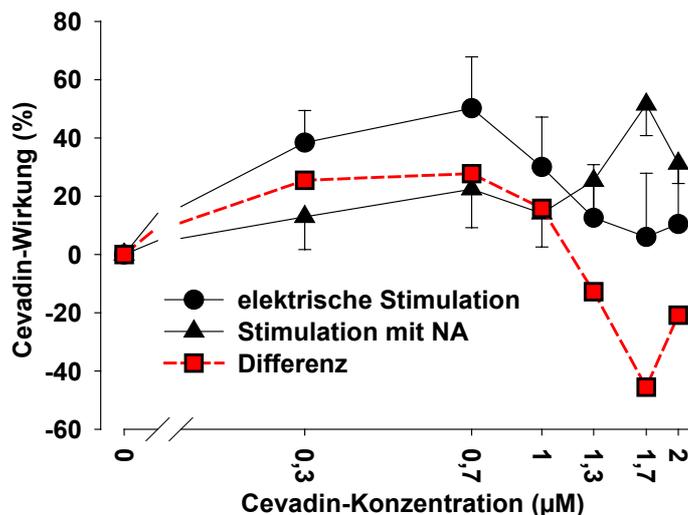


Abb. 44

Wirkung von Cevadin auf die elektrisch induzierte (21 V, 0,1 Hz, n=6) und die Noradrenalin-induzierte (10 µM, n=6) Kontraktion und die aus der Differenz der beiden Wirkungskurven berechnete Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung. Zur Differenzbildung wurde die initiale Kontraktion ohne Zugabe von Cevadin auf 0% gesetzt (eine genaue Erklärung zur Darstellungsweise bietet Kapitel 3.1.2). Die Absolutwerte waren $4,0 \text{ mN} \pm 1,1 \text{ mN}$ bei elektrischer Stimulation und $6,2 \text{ mN} \pm 1,7 \text{ mN}$ bei Stimulation mit NA. Negative Werte stellen eine Minderung, positive Werte eine Steigerung der Kontraktionskraft dar.

3.1.3.1.3 Germin-3-Acetat

Germin-3-Acetat ist eine halbsynthetische Verbindung, die sich vom Germin ableitet (Reiter *et al.*, 1974) und für die auch eine Wirkung auf den spannungsabhängigen Natrium-Kanal gefunden wurde (Honerjäger, 1982). An verschiedenen Herz-Präparaten wurde eine positiv chronotrope Wirkung, die durch Propranolol geblockt werden konnte (Honerjäger, 1982) und eine positiv inotrope (Reiter *et al.*, 1974) Wirkung gefunden.

Denkbar wäre also auch am Ductus deferens eine steigernde Wirkung auf die glatte Muskulatur und/oder auf die Neurotransmitter-Freisetzung durch Germin-3-Acetat.

Da am Herzen ein Effekt im µM-Bereich gefunden wurde, wurde am Ductus deferens der Konzentrationsbereich von 50 µM bis 700 µM untersucht. Die elektrisch induzierte Kontraktion wurde durch Germin-3-Acetat zunächst leicht gehemmt. Diese hemmende Wirkung wurde aber mit steigender Konzentration geringer und ab einer Konzentration von 500 µM kam es bei elektrischer Stimulation zu einer leichten Steigerung der Kontraktionskraft (Abb. 45). Bei NA-induzierter Kontraktion führte Germin-3-Acetat allerdings zu einer deutlichen Erhöhung der Kontraktionskraft, im Gegensatz zu Veratridin, das keinen Einfluss auf die Stimulation mit NA zeigte (Abb. 43). Der EC_{50} -Wert betrug dabei für Germin-3-Acetat $466,4 \text{ µM}$ ($\log EC_{50} = 2,67 \pm 0,05 \text{ µM}$). Germin-3-Acetat scheint also wie Cevadin durch einen direkten Einfluss auf die glatte Muskulatur die Kontraktionskraft zu erhöhen.

Die Neurotransmitter-Freisetzung, dargestellt durch die Differenz der beiden Wirkungskurven bei elektrischer und NA-induzierter Kontraktion (Abb. 45) scheint dagegen durch Germin-3-Acetat eher gehemmt zu werden.

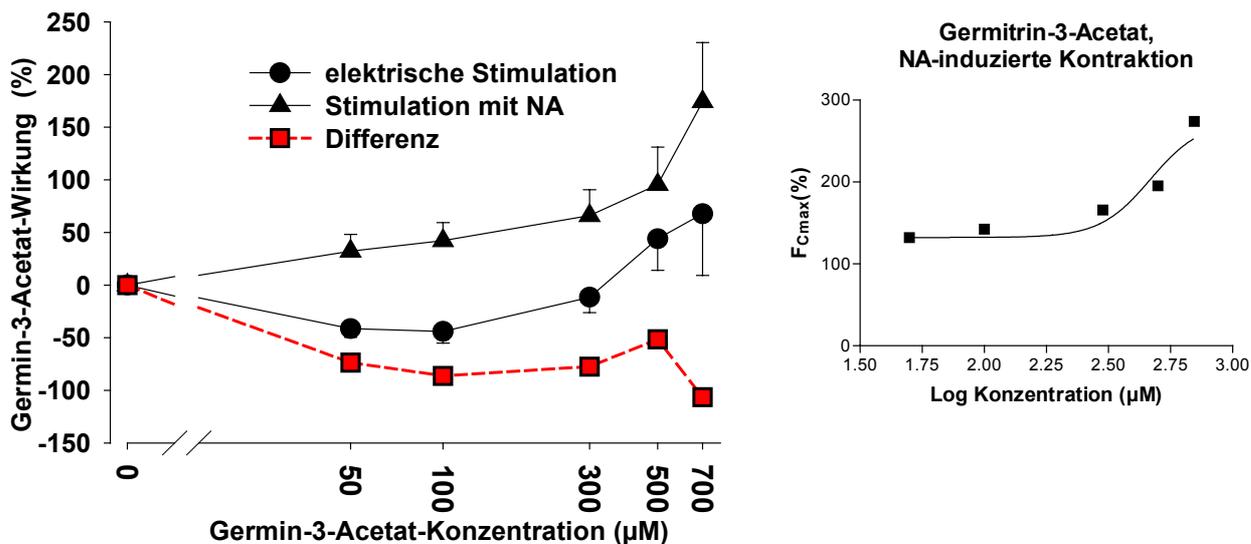
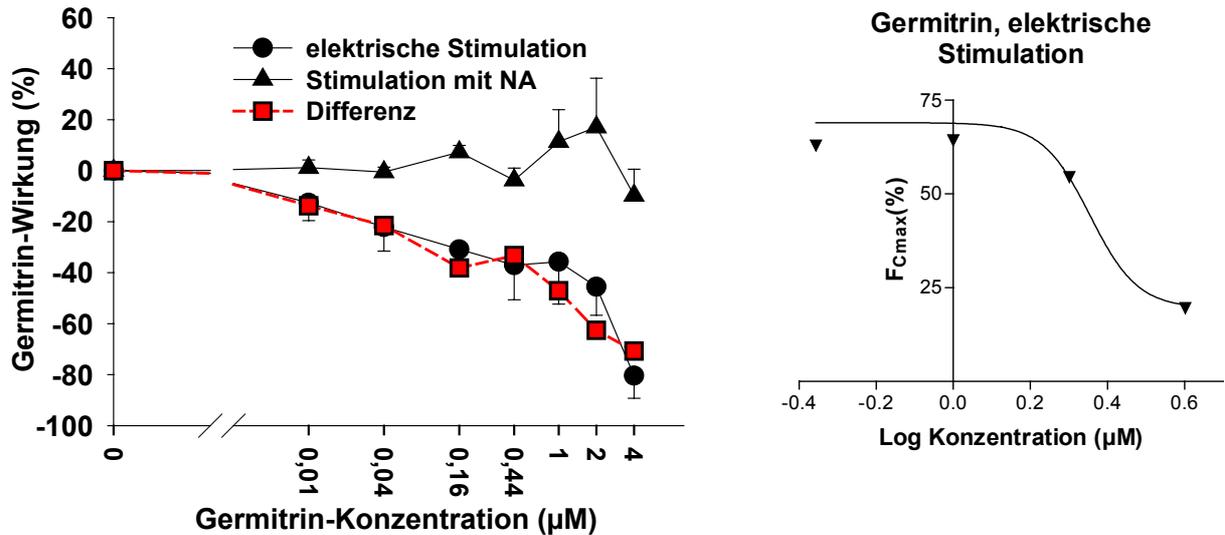


Abb. 45

Wirkung von Germin-3-Acetat auf die elektrisch induzierte (21 V, 0,1 Hz, n=6) und die Noradrenalin-induzierte (10 µM, n=5) Kontraktion und die aus der Differenz der beiden Wirkungskurven berechnete Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung. Zur Differenzbildung wurde die initiale Kontraktion ohne Zugabe von Germin-3-Acetat auf 0% gesetzt (eine genaue Erklärung zur Darstellungsweise bietet Kapitel 3.1.2). Die Absolutwerte waren 3,3 mN ± 0,7 mN bei elektrischer Stimulation und 4,4 mN ± 1,0 mN bei Stimulation mit NA. Negative Werte stellen eine Minderung, positive Werte eine Steigerung der Kontraktionskraft dar. Die Abbildung rechts stellt die gefittete Germitrin-Wirkungskurve bei Stimulation mit NA dar: $\log EC_{50} = 2,67 \pm 0,05 \mu\text{M}$, $EC_{50} = 466,4 \mu\text{M}$. Die Endpunkte wurden dabei auf 132,2% und 279,2% festgelegt.

3.1.3.1.4 Germitrin

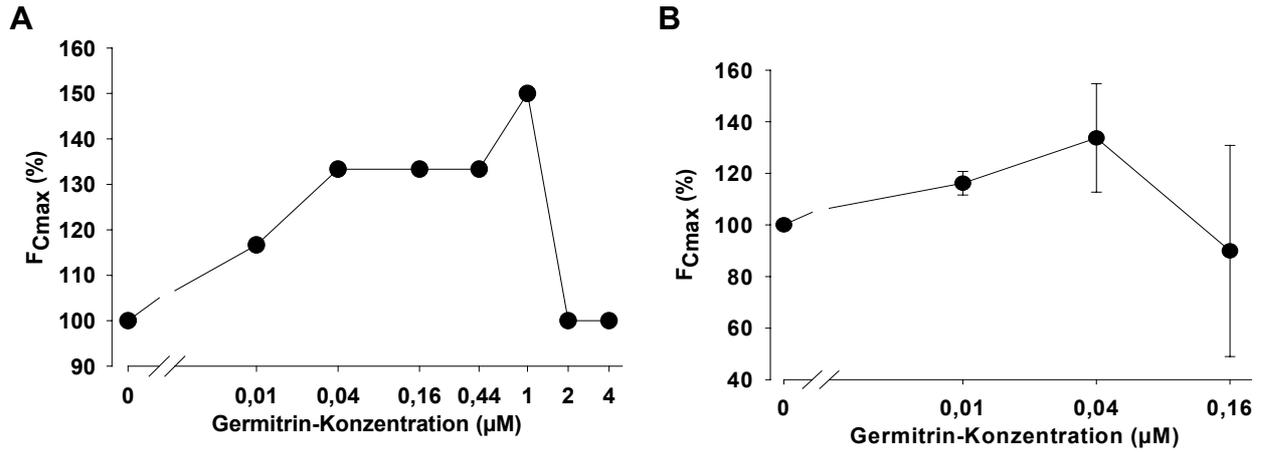
Germitrin, ein weiteres Alkaloid aus der Gruppe der Ceveratrum-Alkaloide, zeigte, wie auch die anderen hier untersuchten Vertreter dieser Gruppe, eine positiv inotrope Wirkung am Herzen und verzögerte die Inaktivierung von spannungsabhängigen Natrium-Kanälen (Dugas *et al.*, 1989; Honerjäger, 1982). Überraschend war deshalb die Wirkung am Ductus deferens (Abb. 46). Hier führte Germitrin im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,01 µM bis 4 µM zu einer kontinuierlichen Hemmung der elektrisch induzierten Kontraktion, die am stärksten im Bereich von 2 bis 4 µM zum Tragen kam ($EC_{50} = 2,3 \mu\text{M}$, $\log EC_{50} = 0,35 \pm 0,07 \mu\text{M}$). Die NA-induzierte Kontraktion wurde kaum beeinflusst. Lediglich im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 2 µM kam es zu einer leichten Steigerung der Kontraktionskraft um 11% bzw. 17%. Auf die glatte Muskulatur direkt schien die Wirkung von Germitrin in diesem Konzentrationsbereich also gering zu sein, die Neurotransmitter-Freisetzung (dargestellt durch die Differenz-Kurve in Abb. 46) schien dagegen gehemmt zu werden.

**Abb. 46**

Wirkung von Germitrin auf die elektrisch induzierte (21 V, 0,1 Hz, n=6) und die Noradrenalin-induzierte (10 µM, n=6) Kontraktion und die aus der Differenz der beiden Wirkungskurven berechnete Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung. Zur Differenzbildung wurde die initiale Kontraktion ohne Zugabe von Germitrin auf 0% gesetzt (eine genaue Erklärung zur Darstellungsweise bietet Kapitel 3.1.2). Die Absolutwerte waren $3,6 \text{ mN} \pm 1,1 \text{ mN}$ bei elektrischer Stimulation und $6,7 \text{ mN} \pm 1,8 \text{ mN}$ bei Stimulation mit NA. Negative Werte stellen eine Minderung, positive Werte eine Steigerung der Kontraktionskraft dar. Die Abbildung rechts stellt die gefittete Germitrin-Wirkungskurve im Konzentrationsbereich $0,44 \text{ µM}$ bis 4 µM bei elektrischer Stimulation dar: $\log EC_{50} = 0,35 \pm 0,07 \text{ µM}$, $EC_{50} = 2,3 \text{ µM}$. Die Endpunkte wurden auf 69,1% und 19,6% festgelegt.

Um die Wirkung von Germitrin am Ductus deferens mit der Wirkung am Herzmuskel vergleichen zu können, wurden Kontraktionskraft-Messungen am Papillarmuskel der Ratte und des Meerschweinchens durchgeführt (Abb. 47). An beiden Präparaten wirkte Germitrin bei einer Stimulation von 1 Hz positiv inotrop. Am Papillarmuskel des Meerschweinchens traten allerdings bereits ab einer Konzentration von $0,16 \text{ µM}$ und am Papillarmuskel der Ratte ab einer Konzentration von 2 µM Arrhythmien auf, die Untersuchungen bei höheren Konzentrationen unmöglich machten.

Die elektrisch induzierte Kontraktion des Herzmuskels schien durch Germitrin also gesteigert zu werden während die elektrisch induzierte Kontraktion des Ductus deferens gehemmt wurde. Während die α_1 -Rezeptor-vermittelte Kontraktion glatter Muskeln durch Germitrin nur wenig beeinflusst wurde, schien die Neurotransmitter-Freisetzung durch Germitrin gehemmt zu werden.

**Abb. 47**

Wirkung von Germitrin am Papillarmuskel der Ratte (A; $n=1$) und des Meerschweinchens (B, $n=3$) bei elektrischer Stimulation (Reizfrequenz 1 Hz, Reizdauer 2 ms, Reizstärke knapp über der Reizschwelle). Die initiale Kontraktion ohne Zugabe von Germitrin entspricht 100% und betrug 1,5 mN am Papillarmuskel der Ratte und $6,4 \text{ mN} \pm 2,2 \text{ mN}$ am Papillarmuskel des Meerschweinchens.

3.1.3.2 *Jerveratrum-Alkaloid Veratramin*

Veratramin gehört der Gruppe der Jerveratrum-Alkaloide an, für die keine Wirkung auf den spannungsabhängigen Natrium-Kanal gefunden wurde. Am glatten Muskel dagegen scheint Veratramin Calcium-Kanäle zu hemmen (Gödecke, 1997). Gleichzeitig wurden am Herzen Hinweise gefunden, dass Veratramin auch eine hemmende Wirkung auf Kalium-Kanäle ausübt. Außerdem wirkte es am Meerschweinchen-Herzen negativ chronotrop (Thron *et al.*, 1999; Thron *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit wirkte Veratramin am Ductus deferens zunächst (1 μM bis 10 μM) sowohl auf die elektrisch als auch auf die durch NA induzierte Kontraktion (Abb. 48 A) steigernd. In diesem Konzentrationsbereich scheint die Neurotransmitter-Freisetzung also nicht beeinflusst zu werden. Ab einer Konzentration von 10 μM kam es bei elektrischer Stimulation zu einer starken Hemmung der Kontraktionskraft, während unter NA erst bei einer deutlich höheren Konzentration von 30 μM eine Hemmung beobachtet wurde. Die EC_{50} -Werte der absteigenden Kurven-Abschnitte betragen bei elektrischer Stimulation 31,2 μM ($\log \text{EC}_{50} = 1,49 \pm 0,06 \mu\text{M}$, Abb. 48 D) und bei Stimulation mit NA 51 μM (graphische Ermittlung). Aufgrund dieses Kurvenverlaufs kann geschlossen werden, dass es im Bereich zwischen 10 μM und 50 μM zu einer starken Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung durch Veratramin kommt (s. Differenzkurve in Abb. 48 A).

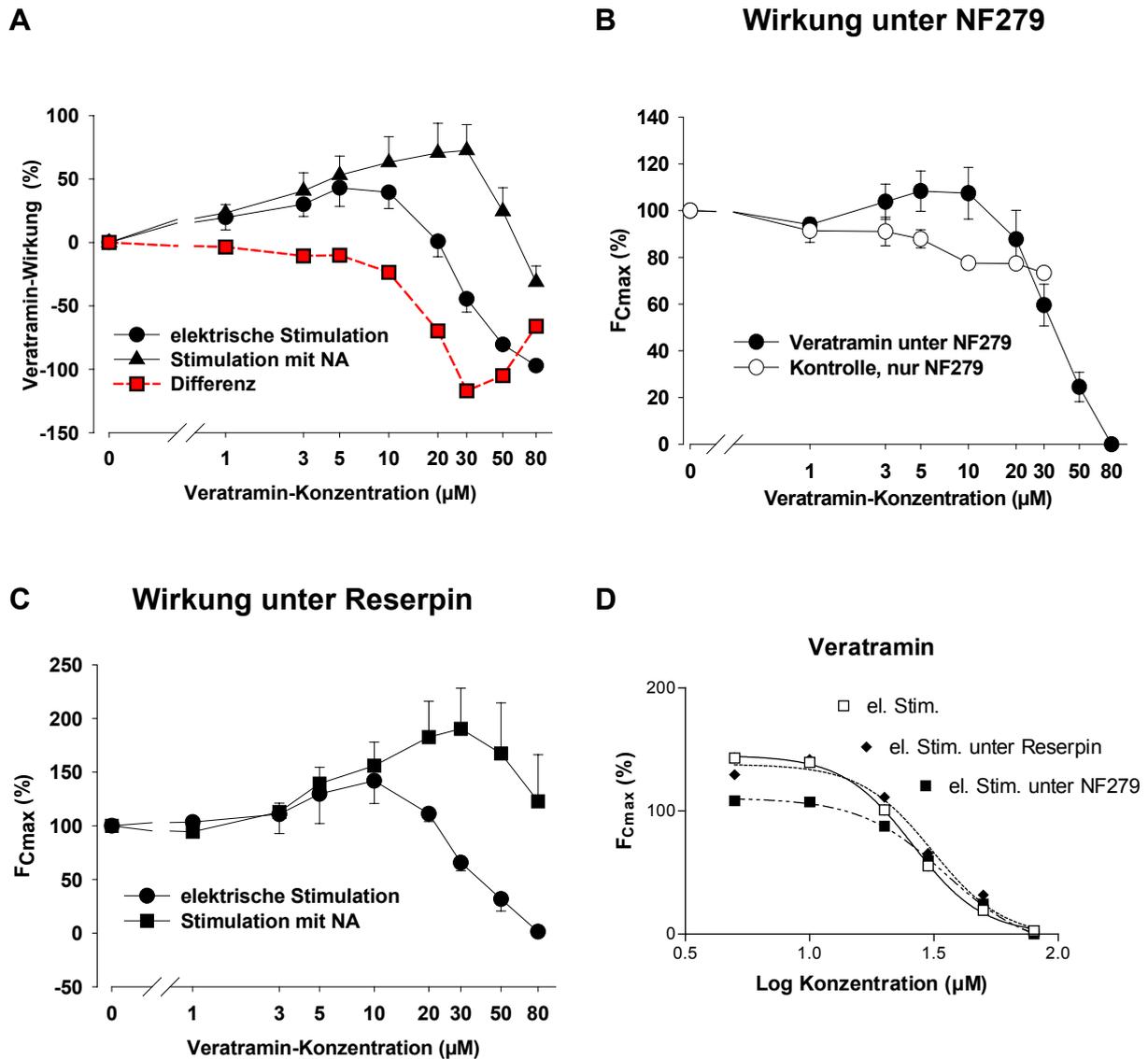


Abb. 48

A: Wirkung von Veratramin auf die elektrisch induzierte (30 V, 0,1 Hz, $n=6$) und die Noradrenalin-induzierte (10 μM , $n=6$) Kontraktion und die aus der Differenz der beiden Wirkungskurven berechnete Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung. Zur Differenzbildung wurde die initiale Kontraktion ohne Zugabe von Veratramin auf 0% gesetzt (eine genaue Erklärung zur Darstellungsweise bietet Kapitel 3.1.2). Die Absolutwerte waren $5,3 \text{ mN} \pm 2,2 \text{ mN}$ bei elektrischer Stimulation und $7,6 \text{ mN} \pm 1,6 \text{ mN}$ bei Stimulation mit NA. Negative Werte stellen eine Minderung, positive Werte eine Steigerung der Kontraktionskraft dar.

B: Wirkung von Veratramin auf die elektrisch induzierte Kontraktion (30 V, 0,1 Hz, $n=3$) in Anwesenheit von 10 μM NF279. Die Kontraktion nach 120-minütiger Einwirkzeit von NF279 ohne Zugabe von Veratramin entspricht 100% und betrug $11,1 \text{ mN} \pm 2,6 \text{ mN}$. Zusätzlich ist die Kontrolle unter NF279 ohne Veratramin dargestellt. Die Kontrollwerte ohne Veratramin wurden jeweils zu den gleichen Zeitpunkten wie die Werte mit den entsprechenden Konzentrationen von Veratramin ermittelt.

C: Prozentuale Wirkung von Veratramin auf die elektrisch induzierte (30 V, 0,1 Hz, $n=6$) und Noradrenalin-induzierte (10 μM , $n=5$) Kontraktion unter Vorbehandlung mit Reserpin (24 h, 5 mg/kg). Die initiale Kontraktion unter dem Einfluss von Reserpin, ohne Zugabe von Veratramin entspricht jeweils 100% und betrug $1,0 \text{ mN} \pm 0,2 \text{ mN}$ bei elektrischer Stimulation und $5,3 \text{ mN} \pm 1,6 \text{ mN}$ bei Stimulation mit NA.

D: Gefittete, absteigende Komponenten der Konzentrations-Wirkungs-Kurven bei elektrischer Stimulation ($EC_{50} = 31,2 \mu\text{M}$, $\log EC_{50} = 1,49 \pm 0,06 \mu\text{M}$), bei elektrischer Stimulation unter dem

Einfluss von Reserpin ($EC_{50} = 31,2 \mu\text{M}$, $\log EC_{50} = 1,49 \pm 0,06 \mu\text{M}$) und bei elektrischer Stimulation unter dem Einfluss von NF279 ($EC_{50} = 35,3 \mu\text{M}$, $\log EC_{50} = 1,53 \pm 0,03 \mu\text{M}$).

Um eine differenziertere Aussage über die Beeinflussung der adrenergen Freisetzung durch Veratramin machen zu können, wurde auch hier der Einfluss des P2X-Rezeptor-Blockers NF279 untersucht. Die Wirkung von Veratramin in Anwesenheit von NF279 war der Wirkung ohne NF279 sehr ähnlich. Es kam zunächst zu einem leichten Anstieg und ab $20 \mu\text{M}$ Veratramin zu einer deutlichen Hemmung der Kontraktionskraft bei elektrischer Stimulation. Abb. 48 B zeigt zwar im unteren Konzentrationsbereich eine etwas geringere Steigerung der Kontraktionskraft durch Veratramin unter dem Einfluss von NF279. Berücksichtigt man aber die leichte Abnahme der Kontraktionskraft durch NF279 alleine, so gleichen sich beide Wirkungskurven an. Der EC_{50} -Wert (absteigende Komponente) unter NF279 lag bei $35,3 \mu\text{M}$ ($\log EC_{50} = 1,53 \pm 0,03 \mu\text{M}$).

Wie bei Veratridin wurde auch der Einfluss von Reserpin auf die Veratramin-Wirkung untersucht. Abb. 48 C zeigt die Wirkungskurven von Veratramin, erstellt an Ductus deferens-Präparaten von Ratten, die 24 h vor Versuchsbeginn mit Reserpin (5 mg / kg) vorbehandelt wurden. Bei elektrischer Stimulation unterschied sich die Veratramin-Wirkung unter Reserpin ($EC_{50} = 31,2 \mu\text{M}$, $\log EC_{50} = 1,49 \pm 0,06 \mu\text{M}$) kaum von der Veratramin-Wirkung ohne Reserpin. Lediglich die steigernde Wirkung auf die NA-induzierte Kontraktion schien mit Reserpin etwas stärker ausgeprägt zu sein als ohne.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hemmende Wirkung von Veratramin im untersuchten Konzentrationsbereich vermutlich hauptsächlich durch eine Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung zustande kommt. Da sowohl NF279 (Blockade der P2X-Rezeptoren) als auch Reserpin (Entleerung der Monoamin-Speicher, u.A.) die inhibierende Wirkung von Veratramin nur wenig beeinflussten, schien es sowohl auf die ATP- als auch die NA-Freisetzung in gleichem Maße zu wirken.

Die steigernde Wirkung kam wahrscheinlich vorwiegend durch die Beeinflussung der glatten Muskulatur zustande. Diese Wirkung wurde durch NF279 leicht vermindert und durch Reserpin leicht erhöht.

3.1.3.3 Gesamtextrakt von *Veratrum album*

Aufgrund der recht unterschiedlichen Wirkungen der Einzelsubstanzen war es interessant zu untersuchen, welche Wirkung der Gesamtextrakt von *Veratrum album* am Ductus deferens hat. Dazu wurden Versuche mit der Urtinktur von *Veratrum album* der Firma Spagyra (Chargen-Nr: 05100521008) durchgeführt.

Die Urtinktur entspricht den Anforderungen des HAB 34, Monographie „*Veratrum - Weiße Nieswurz*“ und wurde nach Vorschrift 4a, HAB 34 (Perkolation mit 62% Ethanol) aus dem getrockneten Wurzelstock der Stammpflanze *Veratrum album* L. hergestellt. Der Gehalt an Alkaloiden betrug laut Spezifikation der Firma Spagyra 1,0

bis 2,5% (m/m) berechnet als Protoveratrin A. Die Gehaltsbestimmung erfolgte dabei gemäß HAB 34 durch Säure-Base-Titration.

Da 62% (m/m) Ethanol enthalten waren, sollte durch Kontrollversuche die Wirkung des Ethanols und der in der Tinktur enthaltenen Substanzen getrennt werden. Dazu wurden die Versuche zusätzlich mit einer Kontroll-Lösung aus 62% Ethanol in gereinigtem Wasser durchgeführt. In Abb. 49 ist jeweils die Wirkung der Urtinktur und der Kontroll-Lösung auf die durch elektrische Stimulation (A) und die durch NA-induzierte Kontraktion (B) dargestellt. Die Kontroll-Lösung führte sowohl bei elektrischer Stimulation als auch bei NA-induzierter Kontraktion zu einer deutlichen Abnahme der Kontraktionskraft. Die Wirkungskurven der Urtinktur unterschieden sich aber in beiden Fällen von den Wirkungskurven der Kontroll-Lösung. Zur besseren Darstellung der Wirkung der in der Tinktur enthaltenen Veratrum-Alkaloide wurden die Kontroll-Wirkungskurven und die Urtinktur-Wirkungskurven jeweils voneinander subtrahiert (Abb. 49 C). Tabelle 9 gibt eine Übersicht über den zu erwartenden Gehalt an Veratrum-Alkaloiden im Organbad aufgrund der Zugabe des entsprechenden Volumens an Urtinktur.

Konzentration Urtinktur (µl/ml)	1,0	1,4	4,3	14,3	42,9
Gehalt Veratrum-Alkaloide (µg/ml)	15,5	22,2	66,6	222,0	666,1

Tabelle 9

Untersuchte Konzentrationen der Urtinktur (Endkonzentration im Organbad) und daraus berechneter Gehalt an Veratrum-Alkaloiden. Zur Berechnung wurde die Dichte eines 62% (m/m) Ethanol-Wasser-Gemisches (0,88807 g/ml) und der vom Analysenzertifikat der Charge übernommene mittlere Alkaloid-Gehalt von 1,75% in der Urtinktur angenommen.

Bei direkter Stimulation des glatten Muskels zeigten die Veratrum-Inhaltsstoffe zunächst eine deutlich steigernde Wirkung (maximal um 114%), die im höheren Konzentrationsbereich allerdings wieder abnahm. Bei elektrischer Stimulation, bei der es über die Neurotransmitter-Freisetzung zur Kontraktion der glatten Muskulatur kommt, war dagegen eine verhältnismäßig geringe Wirkung zu beobachten. Erst im höheren Konzentrationsbereich kam es zu einer leichten Steigerung der Kontraktionskraft um 38%. Durch Differenzbildung der in Abb. 49 C dargestellten Wirkungskurven wurde wieder näherungsweise die Wirkung der Veratrum-Inhaltsstoffe auf die Neurotransmitter-Freisetzung errechnet (Abb. 49 C, Differenz-Kurve). Zunächst kam es zu einer Hemmung der Freisetzung. Mit steigenden Konzentrationen nahm diese Wirkung allerdings wieder ab.

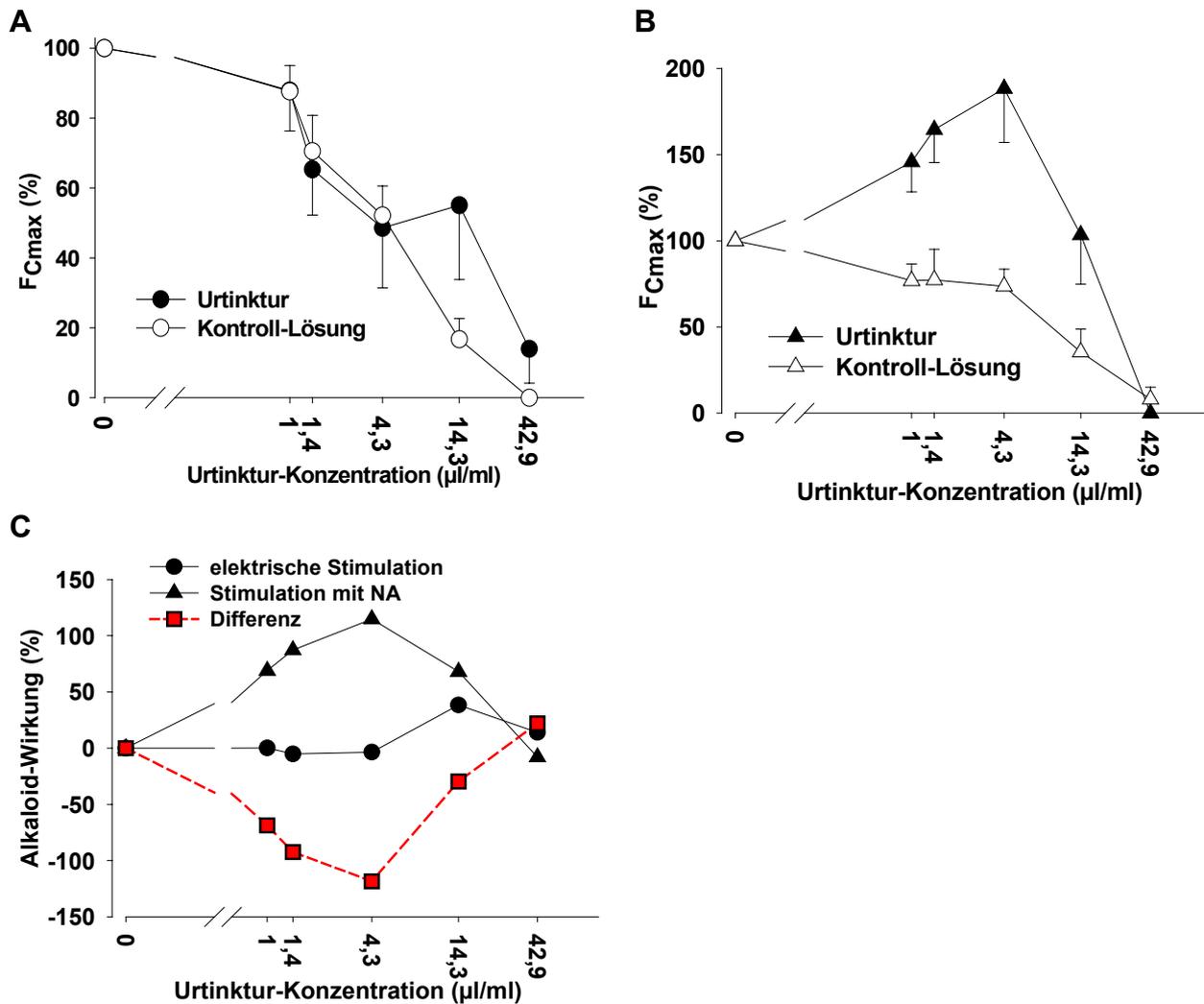


Abb. 49

A und B: Wirkungskurven der Urtinktur und der Kontroll-Lösung (62% EtOH) auf die elektrisch (30 V, 0,1 Hz) induzierte Kontraktion (A, $n = 4$) und die NA- ($10 \mu\text{M}$) induzierte Kontraktion (B, $n = 6$). Die initiale Kontraktion ohne Zugabe von Urtinktur oder Kontroll-Lösung entspricht jeweils 100% und betrug $2,4 \text{ mN} \pm 0,4 \text{ mN}$ bzw. $2,3 \text{ mN} \pm 0,5 \text{ mN}$ bei elektrischer Stimulation und $5,4 \text{ mN} \pm 1,4 \text{ mN}$ bzw. $5,8 \text{ mN} \pm 1,5 \text{ mN}$ bei Stimulation mit NA. Die Konzentration ist als Menge an Urtinktur bzw. ethanolische Lösung in μl pro Volumenanteil der Badlösung in ml angegeben.

C: Wirkung der Veratrum-Inhaltsstoffe alleine (die Wirkungen der Kontroll-Lösung wurden jeweils subtrahiert) auf die elektrische bzw. NA-induzierte Kontraktion und die aus der Differenz der beiden Wirkungskurven berechnete Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung. Zur Differenzbildung wurde die initiale Kontraktion ohne Zugabe von Veratrum-Inhaltsstoffen auf 0% gesetzt (eine genaue Erklärung zur Darstellungsweise bietet Kapitel 3.1.2). Negative Werte stellen eine Minderung, positive Werte eine Steigerung der Kontraktionskraft dar.

Wie sich die Kontraktionskraft bei höheren Konzentrationen verhält, konnte nicht weiter untersucht werden, da es bei einer Konzentration von $42,9 \mu\text{l/ml}$ bereits durch die Ethanol-Wirkung alleine (Kontroll-Lösung) zu einer vollständigen Hemmung der elektrisch induzierten und NA-induzierten Kontraktion kam. Außerdem ist bei diesem Versuch mit *Veratrum album*-Extrakt zu bedenken, dass der Alkaloid-Gehalt (vgl. Tabelle 9) als Gehalt an Protoveratrin A berechnet ist und nur einen Anhaltspunkt darstellt. Hierbei kann keine Aussage über den Anteil der verschiedenen Veratrum-

Alkaloide gemacht werden. Andere, eventuell an der Wirkung beteiligte Pflanzeninhaltsstoffe, sind nicht berücksichtigt, da sie mit der hier verwendeten Gehaltsbestimmung nicht erfasst wurden.

3.1.4 (-)-Menthol

3.1.4.1 Wirkung von (-)-Menthol

(-)-Menthol ((1R, 2S, 5R)-2-Isopropyl-5-methylcyclohexanol) ist das natürlich vorkommende Isomer des Menthols und ein Hauptbestandteil des Pfefferminzöls (*Menthae pip. Aetheroleum* (Wagner, 1999)). Es existieren zahlreiche Mentholhaltige Arzneipräparate, denen u.a. eine spasmolytische, choloretische und schmerzstillende Wirkung zugeschrieben wird. Außerdem gibt es Hinweise, dass sich Pfefferminzöl positiv bei Colon irritabile auswirken könnte (Pittler *et al.*, 1998).

Auf pharmakologischer Ebene wurde zum einen für Menthol im μM -Bereich eine hemmende Wirkung auf den Calcium-Einstrom durch verschiedenen Calcium-Kanäle gefunden. Dadurch könnte es sowohl zu einer Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung als auch zu einer Verminderung der Kontraktionskraft am glatten Muskel kommen. So hemmte Menthol z.B. die Kalium-induzierte Calcium-Aufnahme an neuronalen Präparaten, reduzierte die Kalium- und/oder elektrisch induzierte Kontraktion am Ileum und Herzen des Meerschweinchens und hemmte kompetitiv die [3H]-Nitrendipin-Bindung am glatten Muskel, am Herzen und an Synaptosomen (Hawthorn *et al.*, 1988). Von Swandulla *et al.* (1987; 1986) konnte durch elektrophysiologische Messungen gezeigt werden, dass extrazelluläres Menthol an kultivierten Spinal-Nerv-Zellen die Inaktivierung von HVA-Calcium-Kanälen beschleunigt und den Calcium-Einstrom über LVA-Calcium-Kanäle hemmt. Auf die Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern scheint Menthol dagegen keinen Einfluss zu haben (Taylor *et al.*, 1985). Am isolierten sarkoplasmatischen Retikulum allerdings induzierte Menthol in Konzentrationen über 700 μM eine Calcium-Freisetzung (Palade, 1987).

Zum anderen kann Menthol verschiedene Ionenkanäle der TRP-Familie beeinflussen. So kann es z.B. den TRPM8-Kanal, aber auch den TRPV3-Kanal aktivieren. Beide Ionenkanäle sind kältesensitiv und spielen u.a. eine Rolle beim Temperaturempfinden (Macpherson *et al.*, 2006; McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002). Am TRPA1-Kanal, der sowohl von Scharfstoffen, als auch bei Temperaturen unter 18°C aktiviert wird, zeigte Menthol konzentrationsabhängig eine bivalente Wirkung (Karashima *et al.*, 2007). Dabei kam es bei Konzentrationen im unteren mikromolaren Bereich zur Aktivierung, bei höheren Konzentrationen dagegen zur Hemmung des TRPA1-Kanals. TRP-Kanal-vermittelt könnte es sowohl zu einer Verstärkung als auch in höheren Konzentrationen zu einer Verminderung der Kontraktionskraft kommen.

Abb. 50 zeigt, dass (-)-Menthol am Ductus deferens im Allgemeinen eine hemmende Wirkung auf die Kontraktionskraft hatte. Die Wirkung auf die elektrisch induzierte Kontraktion ($EC_{50} = 141,6 \mu\text{M}$, $\log EC_{50} = 2,15 \pm 0,04 \mu\text{M}$) war dabei stärker ausgeprägt als die Wirkung bei direkter Stimulation der glatten Muskulatur durch Zugabe von NA (Abb. 50 A, $EC_{50} = 273,3 \mu\text{M}$, $\log EC_{50} = 2,43 \pm 0,03 \mu\text{M}$), was für eine zusätzliche Beeinflussung der Neurotransmitter-Freisetzung spricht (Abb. 50 C). Bis zu einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ schien die hemmende Wirkung bei elektrischer Stimulation hauptsächlich durch die Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung vermittelt zu sein. Dagegen war die Wirkung auf die Tyramin-induzierte Kontraktion ($EC_{50} = 289,2 \mu\text{M}$, $\log EC_{50} = 2,46 \pm 0,07 \mu\text{M}$) der Wirkung auf die NA-induzierte Kontraktion im Verlauf sehr ähnlich (Abb. 50 B). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Tyramin-induzierte Calcium-Kanal-unabhängige Katecholamin-Freisetzung durch (-)-Menthol vermutlich nicht beeinflusst wird, sondern dass es hier v.a. durch den direkten Einfluss am glatten Muskel zu einer Verminderung der Kontraktionskraft kommt. Bei der Kalium-induzierten Kontraktion wurde im Vergleich zu den anderen Arten der Stimulation die Kontraktionskraft am stärksten reduziert ($EC_{50} = 85,4 \mu\text{M}$, $\log EC_{50} = 1,93 \pm 0,07 \mu\text{M}$).

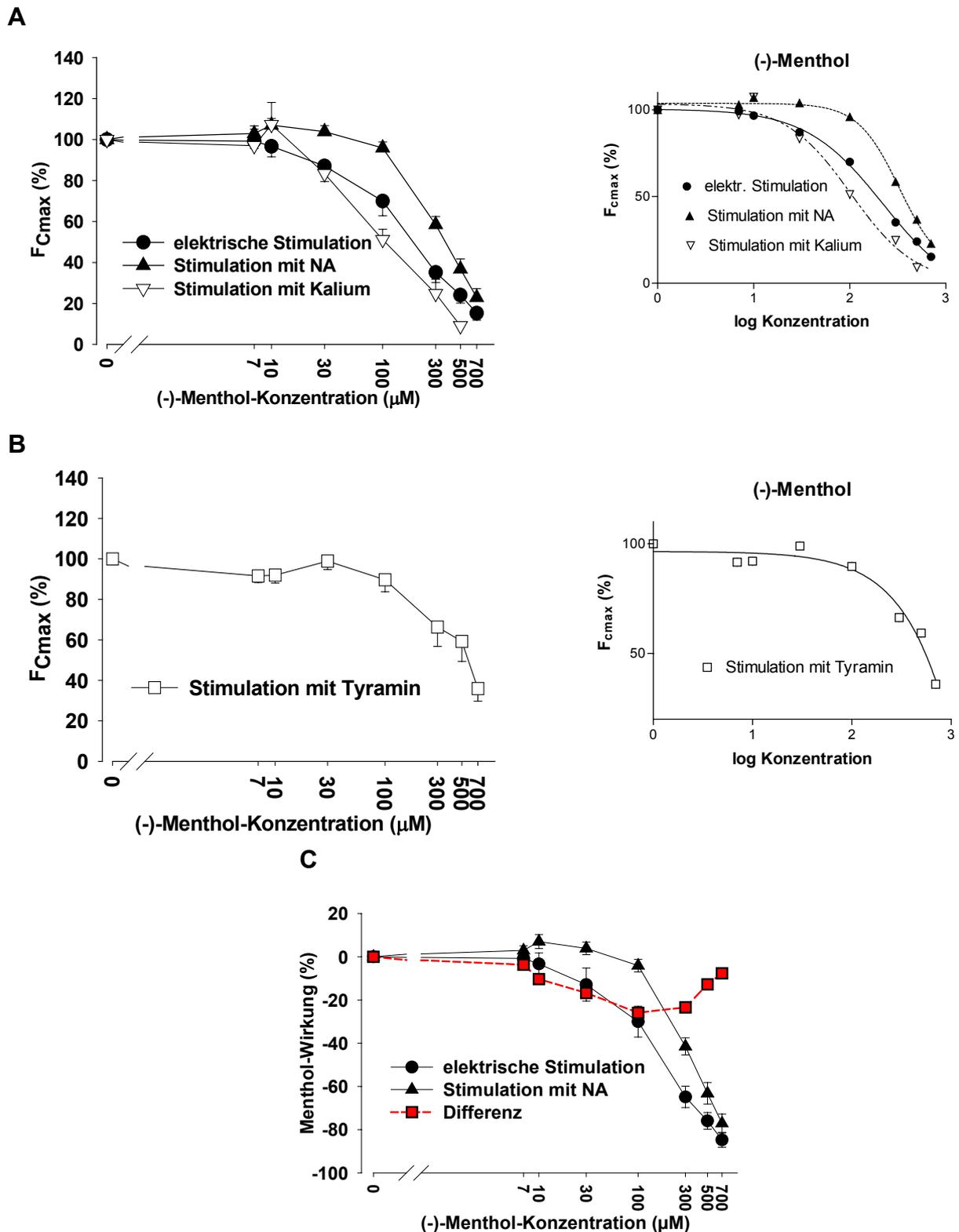


Abb. 50

Wirkung von (-)-Menthol auf die Kontraktionskraft am Ductus deferens. Kontraktionen wurden induziert durch elektrische Stimulation (30 V, 0,1 Hz, $n=9$), durch NA-Zugabe (10 μM , $n=9$), durch K^+ -Zugabe (45 mM, $n=5$) (A) oder induziert durch Tyramin-Zugabe (50 μM , $n=8$) (B). Die initiale Kontraktion ohne Zugabe von (-)-Menthol entspricht jeweils 100% und betrug 23,4 mN \pm 4,0 mN bei elektrischer Stimulation, 14,6 mN \pm 0,7 mN bei Stimulation mit NA, 6,3 mN \pm 0,8 mN bei Stimulation mit Kalium und 14,9 mN \pm 1,9 mN bei Stimulation mit Tyramin.

C: Wirkung von (-)-Menthol auf die Kontraktionskraft bei elektrischer Stimulation und bei Stimulation mit Noradrenalin und die aus der Differenz der beiden Wirkungskurven berechnete Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung. Zur Differenzbildung wurde die initiale Kontraktion ohne Zugabe von (-)-Menthol auf 0% gesetzt (eine genaue Erklärung zur Darstellungsweise bietet Kapitel 3.1.2). Negative Werte stellen eine Minderung, positive Werte eine Steigerung der Kontraktionskraft dar.

Rechts sind jeweils die gefitteten Konzentrations-Wirkungskurven dargestellt:

Elektrische Stimulation (A): $EC_{50} = 141,6 \mu\text{M}$, $\log EC_{50} = 2,15 \pm 0,04 \mu\text{M}$, unterer Endpunkt festgelegt auf 15,2%.

Stimulation mit NA (A): $EC_{50} = 273,3 \mu\text{M}$, $\log EC_{50} = 2,43 \pm 0,03 \mu\text{M}$, unterer Endpunkt festgelegt auf 22,9%.

Stimulation mit Kalium (A): $EC_{50} = 85,4 \mu\text{M}$, $\log EC_{50} = 1,93 \pm 0,07 \mu\text{M}$, unterer Endpunkt festgelegt auf 9,5%.

Stimulation mit Tyramin (B): $EC_{50} = 289,2 \mu\text{M}$, $\log EC_{50} = 2,46 \pm 0,07 \mu\text{M}$, Endpunkte festgelegt auf 98,9% und 35,9%.

Zusätzlich wurde die (-)-Menthol-Wirkung bei elektrischer Stimulation unter dem Einfluss des P2X-Rezeptor-Antagonisten NF279 untersucht (Abb. 51). Hier scheint die Hemmung der Kontraktionskraft stärker ausgeprägt zu sein als ohne NF279 ($EC_{50} = 30,3 \mu\text{M}$, $\log EC_{50} = 1,48 \pm 0,12 \mu\text{M}$). Auch wenn man die Verminderung der Kontraktionskraft von NF279 alleine (Kontrollkurve) mit einrechnet, kommt es bei einer Konzentration von $30 \mu\text{M}$ zu einer Hemmung der Kontraktion um 33,1% gegenüber einer Hemmung um 12,9% durch (-)-Menthol ohne NF279. Postsynaptisch oder präsynaptisch könnte die adrenerge Komponente also stärker durch (-)-Menthol beeinflusst werden als die purinerge Komponente.

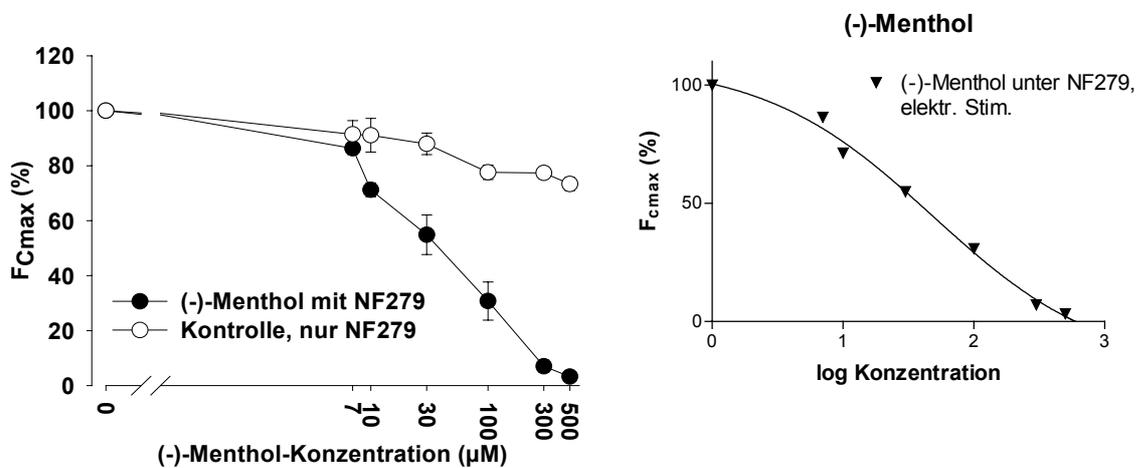


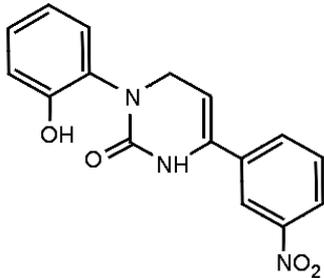
Abb. 51

Wirkung von (-)-Menthol auf die elektrisch induzierte Kontraktion (30 V, 0,1 Hz, n=6) in Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ NF279. Die Kontraktion nach 120-minütiger Einwirkzeit von NF279, ohne Zugabe von (-)-Menthol entspricht 100% und betrug $6,4 \text{ mN} \pm 1,3 \text{ mN}$. Zusätzlich ist der Verlauf der Kontrollkurve (Wirkung von NF279 alleine) dargestellt (n=4). Die Kontrollwerte ohne (-)-Menthol wurden jeweils zu den gleichen Zeitpunkten wie die Werte mit den entsprechenden Konzentrationen (-)-Menthol ermittelt. Rechts ist die gefittete Wirkungskurve dargestellt: $EC_{50} = 30,3 \mu\text{M}$, $\log EC_{50} = 1,48 \pm 0,12 \mu\text{M}$, unterer Endpunkt festgelegt auf 3,3%

3.1.4.2 Vergleich mit der Wirkung von Icilin

Abb. 52

Strukturformel von Icilin



Um die Wirkung von (-)-Menthol mit einer anderen an TRP-Kanälen aktiven Substanz vergleichen zu können, wurde der Einfluss von Icilin auf die elektrisch und NA-induzierte Kontraktion untersucht. Icilin ist ein Agonist am TRPM8-Kanal (McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002) und ca. 200 mal stärker wirksam als Menthol (McKemy *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 1983). Es ist strukturell nicht mit Menthol verwandt (Abb. 52) und scheint einen anderen

Wirkmechanismus als Menthol am TRPM8-Kanal zu haben (Chuang *et al.*, 2004). Auch am TRPA1-Kanal wurde eine agonistische Wirkung von Icilin gefunden. Hier zeigte Icilin bei Patch-Clamp-Versuchen ebenfalls eine ca. 200-fach stärkere Wirkung als Menthol, bezogen auf die EC_{50} -Werte ($EC_{50} = 0.36 \text{ mM}$ und 66.7 mM) (McKemy *et al.*, 2002).

Wegen der 200-fach höheren Wirkstärke von Icilin im Vergleich zu Menthol am TRPM8- und TRPA1-Kanal, wurde am Ductus deferens Icilin in einem 200-fach niedrigeren Konzentrationsbereich untersucht. Dadurch sollte ein direkter Vergleich der Wirkung beider Substanzen ermöglicht werden.

In Abb. 53 ist zu erkennen, dass Icilin, anders als (-)-Menthol, nur eine geringe Wirkung auf die NA-induzierte Kontraktion hatte (Hemmung der Kontraktionskraft um maximal 21% bei 50 nM) und somit im untersuchten Konzentrationsbereich die glatte Muskulatur kaum zu beeinflussen scheint. Im Gegensatz dazu kam es bei elektrischer Stimulation zu einer deutlichen Verminderung der Kontraktionskraft. Die Icilin-Wirkung bei elektrischer Stimulation kommt daher vermutlich überwiegend durch eine Hemmung der Freisetzung zustande. Die Wirkung von (-)-Menthol bei elektrischer Stimulation setzt sich dagegen wahrscheinlich aus einer Hemmung der Freisetzung und der direkten Hemmung der Kontraktionskraft des glatten Muskels zusammen. Somit ist der Vergleich der Wirkungskurven beider Substanzen bei elektrischer Stimulation nicht für einen Vergleich der Wirkstärken der Substanzen geeignet. Vergleicht man aber die beiden Differenzkurven (Abb. 50 C und Abb. 53 A), die näherungsweise die reine Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung darstellen, zeigt sich bei beiden Substanzen ein ähnlicher Wirkungsverlauf. Icilin zeigt allerdings einen etwas höheren maximalen Effekt. Bei 150 nM kam es zu einer maximalen Hemmung der Freisetzung um 46%, (-)-Menthol dagegen reduzierte bei einer Konzentration von 100 μM die Freisetzung um maximal 26%. Die EC_{50} -Werte der absteigenden Komponenten betragen für Icilin 58,4 nM ($\log EC_{50} = 1,77 \pm 0,10$ nM, Abb. 53 B) und für (-)-Menthol 15,4 μM ($\log EC_{50} = 1,19 \pm 0,16$ μM , Abb. 53 C). Betrachtet man also die reine Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung, ergibt sich am Ductus deferens für Icilin eine ca. 260 mal höhere Wirkungsstärke als für

(-)-Menthol. Dies stimmt gut mit der von Wei (1983) und McKemy (2002) gefundenen ca. 200-fach höheren Wirkungsstärke von Icilin gegenüber (-)-Menthol überein.

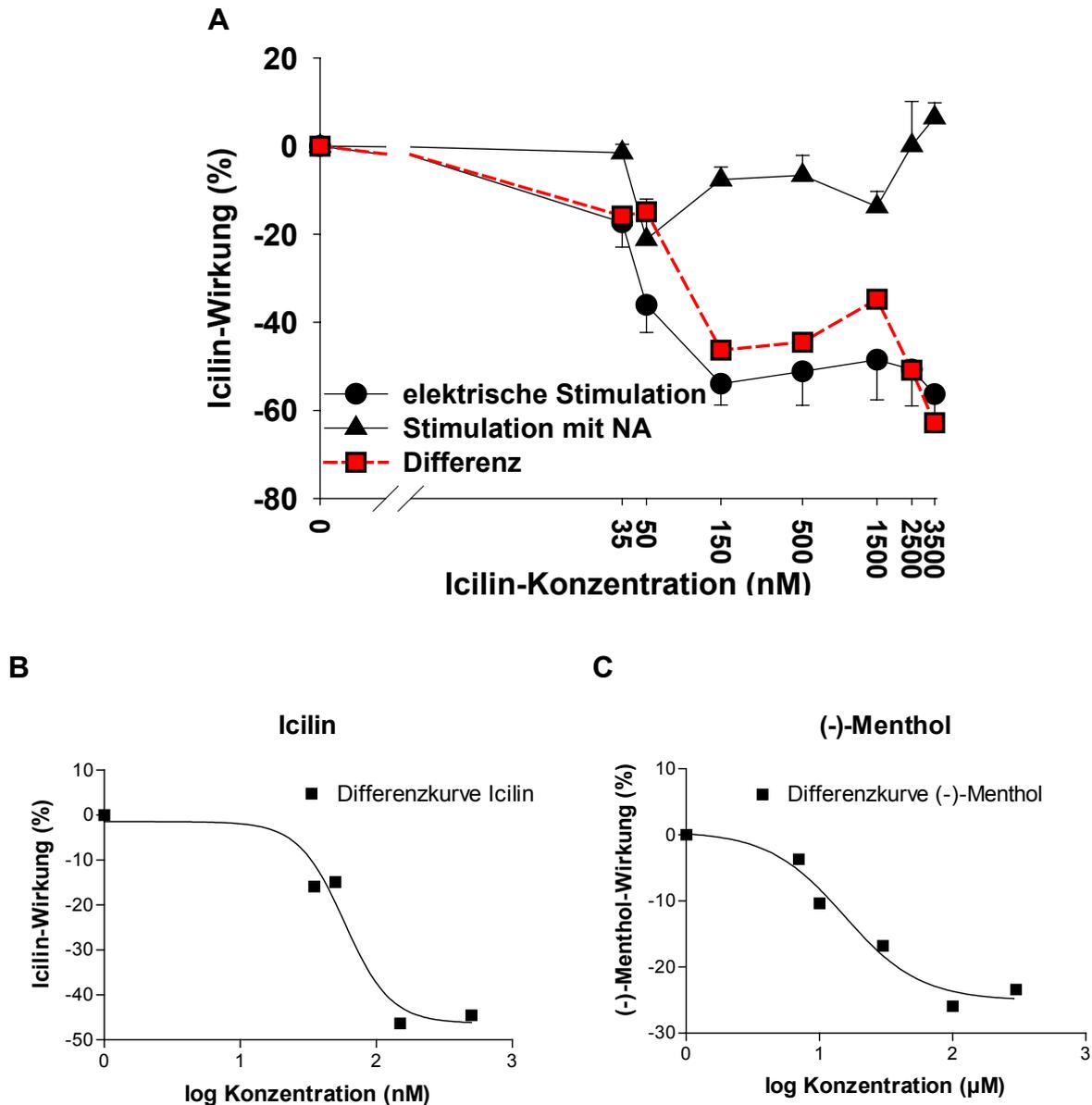


Abb. 53

A Wirkung von Icilin auf die Kontraktionskraft bei elektrischer Stimulation (30 V, 0,1 Hz, $n=5$) und bei Stimulation mit Noradrenalin (10 μM , $n=5$) und die aus der Differenz der beiden Wirkungskurven berechnete Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung. Zur Differenzbildung wurde die initiale Kontraktion ohne Zugabe von Icilin auf 0% gesetzt (eine genaue Erklärung zur Darstellungsweise bietet Kapitel 3.1.2). Die Absolutwerte waren $7,7 \text{ mN} \pm 0,8 \text{ mN}$ bei elektrischer Stimulation und $8,7 \text{ mN} \pm 1,7 \text{ mN}$ bei Stimulation mit NA. Negative Werte stellen eine Minderung, positive Werte eine Steigerung der Kontraktionskraft dar.

B: Gefittete Differenz-Kurve von Icilin: $\log EC_{50} = 1,77 \pm 0,10 \text{ nM}$, $EC_{50} = 58,4 \text{ nM}$. Gefittet wurde nur die absteigende Komponente, der untere Endpunkt wurde dabei auf $-46,3$ festgelegt.

C: Gefittete Differenz-Kurve von (-)-Menthol (vgl. auch Abb. 50 C): $\log EC_{50} = 1,19 \pm 0,16 \mu\text{M}$, $EC_{50} = 15,4 \mu\text{M}$. Gefittet wurde nur die absteigende Komponente.

3.1.5 Extrazelluläre Protonen-Konzentration

Um zu untersuchen, wie sich eine Absenkung des pH-Wertes auf die NA-induzierte und elektrisch induzierte Kontraktion am Ductus deferens auswirkt, wurde durch dreimaliges Auswaschen von einer Nährlösung mit pH 7,4 auf eine Nährlösung mit pH 6,4 gewechselt. Nach einer Equilibrierungszeit von 10 Minuten wurde die Kontraktionskraft gemessen.

Insgesamt kam es durch Absenkung des pH-Wertes zu einer Verminderung der Kontraktionskraft. Bei elektrischer Stimulation reduzierte sich die Kontraktionskraft von $8,3 \text{ mN} \pm 4,1 \text{ mN}$ bei pH 7,4 auf $4,5 \text{ mN} \pm 1,5 \text{ mN}$ bei pH 6,4, bei Stimulation mit NA wurde die Kontraktionskraft von $11,6 \text{ mN} \pm 2,0 \text{ mN}$ auf $8,7 \text{ mN} \pm 1,6 \text{ mN}$ reduziert. Abb. 54 zeigt die prozentualen Werte. Bei elektrischer Stimulation war bei pH 6,4 nur noch $67,6\% \pm 7,8\%$ der ursprünglichen Kontraktionskraft vorhanden und bei Stimulation mit NA noch $74,0\% \pm 2,8\%$. Damit ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Wirkungen bei der durch Neurotransmitter-Freisetzung vermittelten Kontraktion unter Elektrostimulation und bei der direkten Stimulation des glatten Muskels mit NA. Eine Beeinflussung der Neurotransmitter-Freisetzung am Ductus deferens durch Absenkung des extrazellulären pH-Wertes erscheint deshalb unwahrscheinlich.

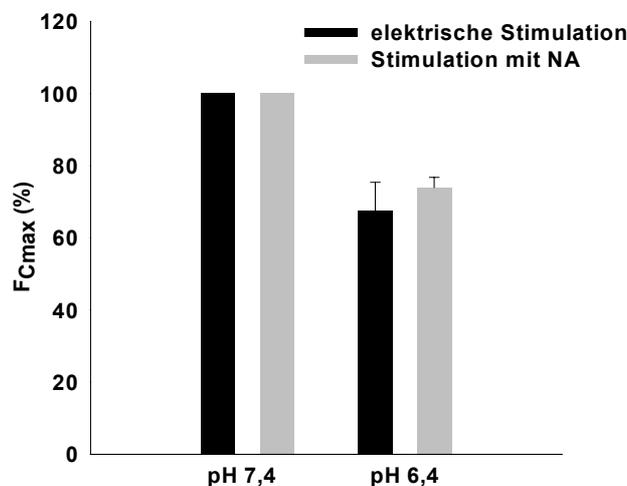


Abb. 54

Beeinflussung der Kontraktionskraft durch Absenken des pH-Wertes von 7,4 auf 6,4 bei elektrischer Stimulation (30 V, 0,1 Hz, n = 5) und Stimulation mit NA (10 μM , n = 7). Die Kontraktionskraft ist als relative Kontraktionskraft, bezogen auf die Kontraktionskraft bei pH 7,4 (100%), dargestellt.

3.1.6 Magnesium

3.1.6.1 Wirkung von Magnesium

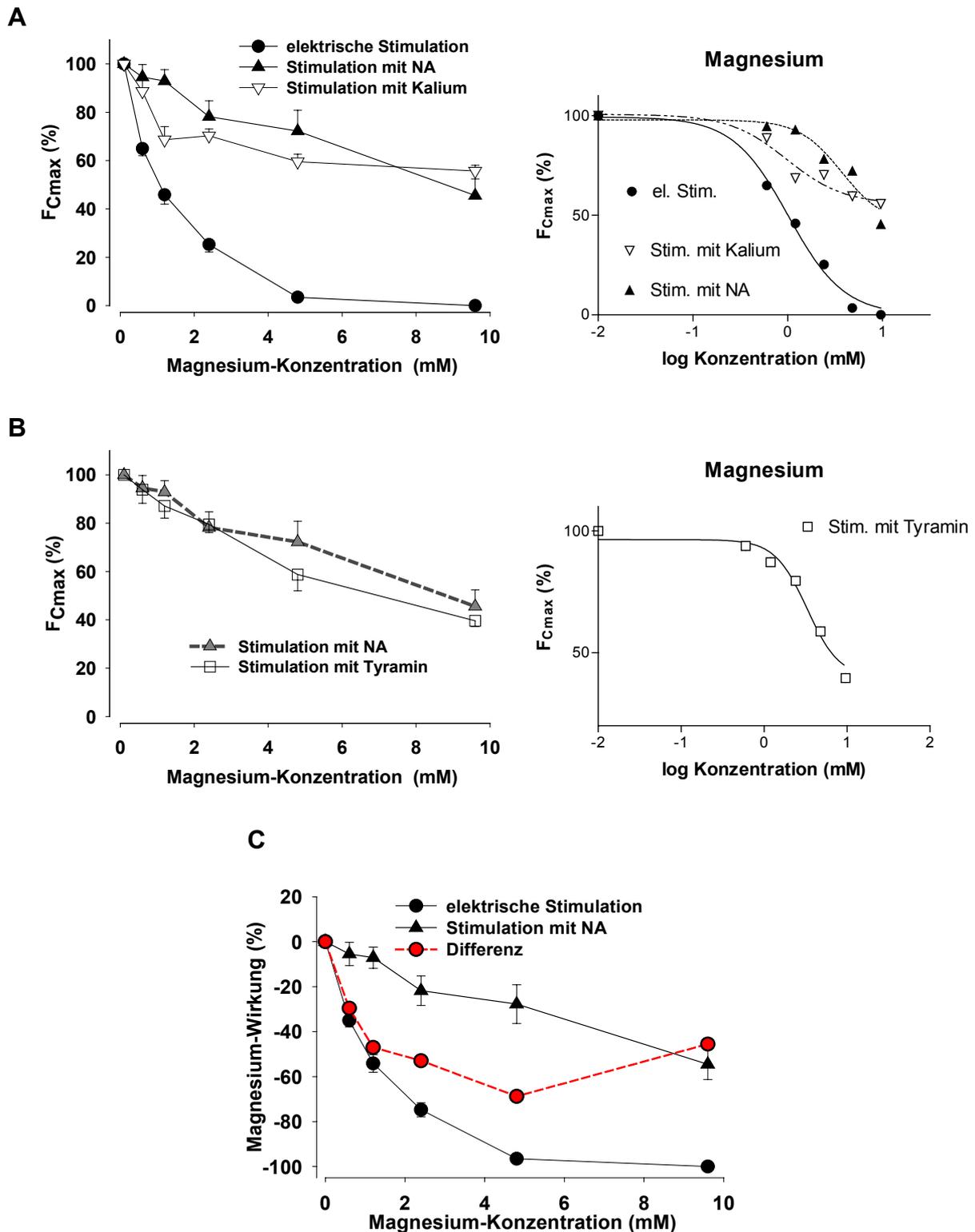
Als Calcium-Kanal-Blocker aber auch durch membranstabilisierende Effekte ist Magnesium in der Lage die Freisetzung von Neurotransmittern zu hemmen. Dennoch gibt es nur wenige Untersuchungen, die sich mit dem direkten Effekt von Magnesium auf die Katecholamin-Freisetzung beschäftigen.

Im Folgenden sollte die Wirkung auf die Calcium-Kanal-abhängige und -unabhängige Freisetzung von NA im direkten Vergleich mit der Wirkung auf die glatte Muskulatur untersucht werden. Eine Calcium-Kanal-unabhängige Freisetzung wurde durch die Stimulation mit Tyramin induziert.

Für die Versuche wurde ein Konzentrationsbereich von 0 mM bis 9,6 mM Magnesium gewählt. Von besonderem Interesse ist dabei der Bereich bis zu einer Konzentration von 1,2 mM da in diesem Bereich auch durch orale Magnesium-Substitution eine Veränderung des Serum-Wertes erreicht werden kann. Besonders bei Hypomagnesiämie (unter 0,7 mM) kann eine orale Magnesium-Therapie zu einer Erhöhung des Magnesium-Spiegels führen.

Am Ductus deferens zeigen die Konzentrations-Wirkungskurven (Abb. 55 A und B) bei elektrischer Stimulation, bei Noradrenalin-, Tyramin-, und bei K^+ -induzierter Kontraktion, dass Magnesium generell eine hemmende Wirkung auf die Muskelkontraktion ausübt. Bei elektrischer Stimulation ($EC_{50} = 1,0$ mM, $\log EC_{50} = 0,006 \pm 0,051$ mM) wirkte Magnesium aber deutlich stärker. Bereits mit 9,6 mM Magnesium konnte die elektrisch induzierte Kontraktion vollständig unterdrückt werden. Bei Stimulation mit NA und Tyramin kam es dagegen nur zu einer maximalen Hemmung um 54,5% bzw. 60,4%. In Abb. 55 C ist die Wirkung von Magnesium auf die elektrische und Noradrenalin-induzierte Kontraktion in Prozent und die Differenz-Kurve aus diesen beiden Wirkungskurven dargestellt. Sie gibt einen Hinweis auf die Beeinflussung der Neurotransmitter-Freisetzung. Es ist zu erkennen, dass Magnesium v.a. im physiologischen Bereich (0,6 mM – 1,2 mM) die Neurotransmitter-Freisetzung deutlich stärker zu hemmen scheint als die Muskelkontraktion direkt. Die Abschwächung der Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung bei 9,6 mM ist wahrscheinlich nicht real, sondern auf die massive Minderung der elektrisch induzierten Kontraktion zurückzuführen.

Die Wirkung von Magnesium auf die Tyramin-induzierte Kontraktion ($EC_{50} = 3,3$ mM, $\log EC_{50} = 0,52 \pm 0,06$ mM, Abb. 55 B) zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die Wirkung auf die Noradrenalin-induzierte Kontraktion ($EC_{50} = 3,7$ mM, $\log EC_{50} = 0,57 \pm 0,10$ mM, Abb. 55 A). Dies weist darauf hin, dass die Verminderung der Kontraktionskraft hier durch den direkten Einfluss von Magnesium am glatten Muskel zustande kommt und nicht durch eine Hemmung der Calcium-Kanal-unabhängigen Neurotransmitter-Freisetzung durch Tyramin.

**Abb. 55**

A: Wirkung von Magnesium auf die Kontraktionskraft am Ductus deferens, induziert durch elektrische Stimulation (30 V, 0,1 Hz, $n=7$), durch NA-Zugabe (10 μM , $n=8$) und durch K^+ -Zugabe (45 mM, $n=6$). Die initiale Kontraktion ohne Zugabe von Magnesium entspricht jeweils 100% und betrug 19,2 mN \pm 4,2 mN bei elektrischer Stimulation, 12,1 mN \pm 0,7 mN bei Stimulation mit NA und 16,9 mN \pm 1,7 mN bei Stimulation mit Kalium.

Rechts sind die gefitteten Konzentrations-Wirkungskurven dargestellt.

Elektrische Stimulation: $EC_{50} = 1,0 \text{ mM}$, $\log EC_{50} = 0,006 \pm 0,051 \text{ mM}$, unterer Endpunkt festgelegt auf 0%

Stimulation durch NA: $EC_{50} = 3,7 \text{ mM}$, $\log EC_{50} = 0,57 \pm 0,10 \text{ mM}$, unterer Endpunkt festgelegt auf 45,5%)

Stimulation mit Kalium: $EC_{50} = 1,0 \text{ mM}$, $\log EC_{50} = -0,01 \pm 0,2 \text{ mM}$

B: *Wirkung von Magnesium auf die Kontraktionskraft am Ductus deferens induziert durch Tyramin-Zugabe ($50 \mu\text{M}$, $n=6$). Die initiale Kontraktion ohne Zugabe von Magnesium entspricht 100% und betrug $19,4 \text{ mN} \pm 1,7 \text{ mN}$. Rechts ist die gefittete Konzentrations-Wirkungskurve dargestellt. $\log EC_{50} = -0,52 \pm 0,06 \text{ mM}$, $EC_{50} = 3,3 \text{ mM}$. Der untere Endpunkt wurde dabei auf 39,6% festgelegt.*

C: *Wirkung von Magnesium auf die Kontraktionskraft bei elektrischer Stimulation und bei Stimulation mit NA und die aus der Differenz der beiden Wirkungskurven berechnete Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung. Zur Differenzbildung wurde die initiale Kontraktion ohne Zugabe von Magnesium auf 0% gesetzt (eine genaue Erklärung zur Darstellungsweise bietet Kapitel 3.1.2). Negative Werte stellen eine Minderung, positive Werte eine Steigerung der Kontraktionskraft dar.*

Bei Stimulation mit K^+ kommt es zur Depolarisation, wodurch die Kontraktion vermutlich primär vom Calcium-Einstrom über spannungsabhängige Calcium-Kanäle am glatten Muskel getragen wird. Magnesium wirkte hier v.a. im unteren Konzentrationsbereich etwas stärker als auf die Stimulation mit NA oder Tyramin. Mit der höchsten Magnesium-Konzentration konnte allerdings, ähnlich der Werte bei NA- und Tyramin-Stimulation, nur eine Hemmung der Kontraktionskraft um 44,3% erreicht werden. Der EC_{50} -Wert beträgt hier $1,0 \text{ mM}$ ($\log EC_{50} = -0,01 \pm 0,2 \text{ mM}$, Abb. 55 A).

Unter dem Einfluss des P2X-Rezeptor-Blockers NF279 ist die Wirkung von Magnesium auf die elektrisch induzierte Kontraktion deutlich stärker ausgeprägt als ohne NF279 (Abb. 56). Bereits mit $1,2 \text{ mM}$ Magnesium kam es zu einer Reduktion der Kontraktionskraft um 92%. Mit $2,4 \text{ mM}$ Magnesium wurde die Kontraktionskraft bereits vollständig unterdrückt. Der EC_{50} -Wert beträgt $0,6 \text{ mM}$ ($\log EC_{50} = -0,22 \pm 0,005 \text{ mM}$) gegenüber einem EC_{50} -Wert von $1,0 \text{ mM}$ ohne NF279. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Magnesium die adrenerge Komponente der elektrisch induzierten Kontraktion stärker beeinflusst als die nicht adrenerge Komponente. Es ist allerdings zu bedenken, dass es bereits unter NF279 alleine im Verlauf des Versuches zu einer Reduktion der Kontraktionskraft kam (Kontrollkurve). Berücksichtigt man dies, zeigt $1,2 \text{ mM}$ Magnesium immer noch eine berechnete Hemmung der Kontraktionskraft um 74% (Hemmung um 92% durch Magnesium unter NF279 abzüglich der Hemmung um 16% durch NF279 alleine) gegenüber einer Hemmung um 64% ohne NF279.

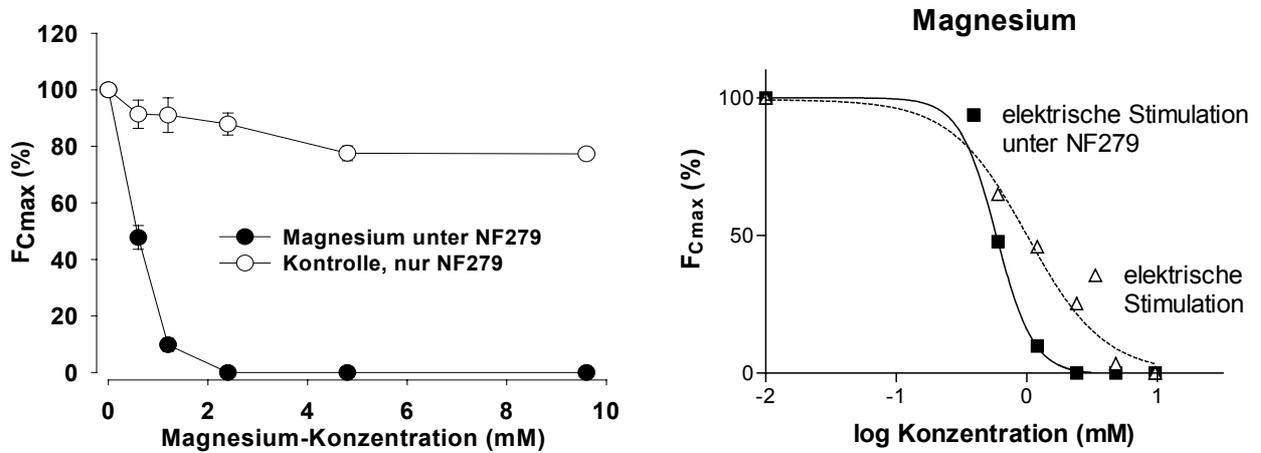


Abb. 56

Wirkung von Magnesium auf die elektrisch induzierte Kontraktion (30 V, 0,1 Hz, $n=6$) in Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ NF279. Die Kontraktion nach 120-minütiger Einwirkzeit von NF279, ohne Zugabe von Magnesium entspricht 100% und betrug $6,4 \text{ mN} \pm 1,3 \text{ mN}$. Zusätzlich ist als Kontrollkurve die Wirkung von NF279 alleine dargestellt ($n=4$). Die Kontrollwerte ohne Magnesium wurden jeweils zu den gleichen Zeitpunkten wie die Werte mit den entsprechenden Konzentrationen Magnesium ermittelt. Rechts ist die gefittete Konzentrations-Wirkungskurve dargestellt. Der EC_{50} -Wert beträgt $0,6 \text{ mM}$ ($\log \text{EC}_{50} = -0,23 \pm 0,005 \text{ mM}$). Zum Vergleich ist die gefittete Konzentrations-Wirkungskurve für Magnesium ohne NF279 abgebildet ($\text{EC}_{50} = 1,0 \text{ mM}$, $\log \text{EC}_{50} = 0,006 \pm 0,051 \text{ mM}$, unterer Endpunkt festgelegt auf 0%, vgl. Abb. 55 A).

3.1.6.2 Kombinierte Wirkung von Magnesium und Veratridin

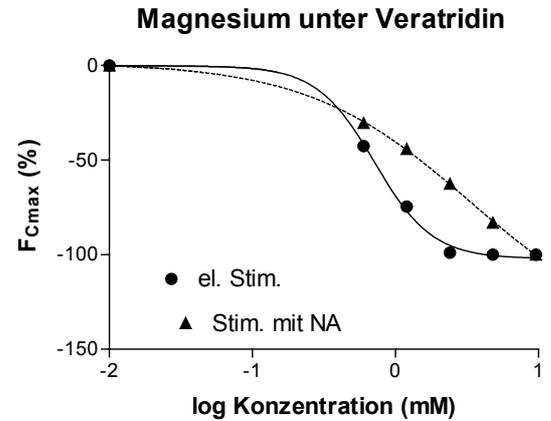
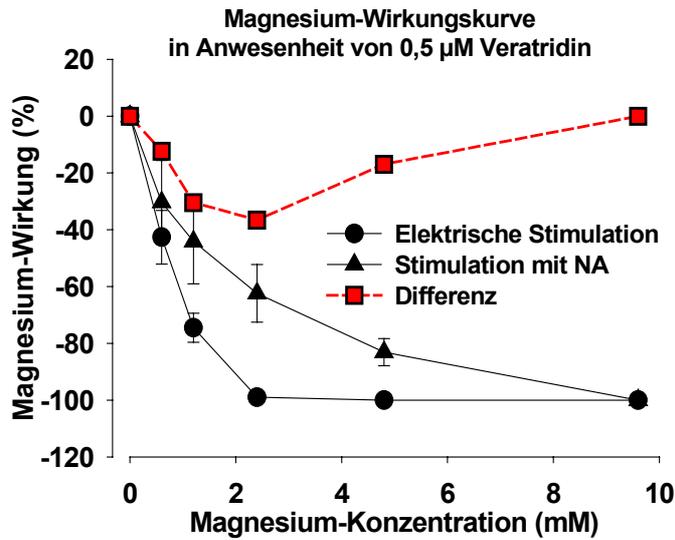
Im Folgenden wurde untersucht, wie sich Magnesium und Veratridin in ihrer Wirkung am Ductus deferens gegenseitig beeinflussen. Dazu wurden Magnesium-Wirkungskurven in Anwesenheit von $0,5 \mu\text{M}$ Veratridin (Abb. 57 A) und umgekehrt Veratridin-Wirkungskurven in Anwesenheit von $1,2 \text{ mM}$ Magnesium erstellt (Abb. 57 B). Die Kontraktion wurde dabei elektrisch und mit NA induziert.

Unter Veratridin ist die hemmende Wirkung von Magnesium auf die elektrisch induzierte Kontraktion deutlicher ausgeprägt. Der EC_{50} -Wert beträgt $0,7 \text{ mM}$ unter dem Einfluss von Veratridin und $1,0 \text{ mM}$ ohne Veratridin (vgl. Abb. 55). Eine maximale Hemmung der Kontraktionskraft durch Magnesium wurde unter Veratridin bereits bei einer Konzentration von $2,4 \text{ mM}$ erreicht. Allerdings wird auch die negative Wirkung bei NA-Stimulation verstärkt ($\text{EC}_{50} = 3,4 \text{ mM}$ unter Veratridin und $3,7 \text{ mM}$ ohne Veratridin). Entsprechend der Differenzkurve (Abb. 57) könnte auf eine Abschwächung der hemmenden Wirkung von Magnesium auf die Neurotransmitter-Freisetzung unter dem Einfluss von Veratridin geschlossen werden (vgl. Abb. 55 C). Diese Interpretation ist allerdings fragwürdig, da bei elektrisch induzierter Kontraktion bereits eine 100% Hemmung der Kontraktion vorhanden ist, die nicht weiter gesteigert werden kann.

Auch die Veratridin-Wirkungskurve wurde durch die Anwesenheit von $1,2 \text{ mM}$ Magnesium deutlich beeinflusst. Durch diese Magnesium-Konzentration war die

steigernde Wirkung des Veratridins auf die elektrisch induzierte Kontraktion und auf die Freisetzung praktisch vollständig unterdrückt. Die Hemmung der Kontraktion bei steigenden Konzentrationen Veratridin blieb allerdings erhalten. Diese Wirkung von Veratridin ist mit der Veratridin-Wirkung ohne Magnesium vergleichbar. Bei 2 μM Veratridin kam es ohne Magnesium zu einer Verminderung der Kontraktion um 71%, in Anwesenheit von Magnesium wurde die Kontraktionskraft durch 2 μM Veratridin um 73% verringert. Kontraktionen wurden in Anwesenheit von 1,2 mM Magnesium allerdings nicht beobachtet. Der EC_{50} -Wert der absteigenden Wirkungskurve beträgt 0,7 μM Veratridin. Der leichte Anstieg der Kontraktionskraft bei NA-Stimulation entspricht den Ergebnissen der Kontrollversuche und ist vermutlich auf eine zunehmende Sättigung des Wiederaufnahme-Mechanismus von NA zurückzuführen. Die NA-induzierte Kontraktion scheint also weiterhin durch Veratridin unbeeinflusst zu bleiben (Veratridin-Wirkungskurven ohne Magnesium-Einfluss s. Abb. 43 A).

A



B

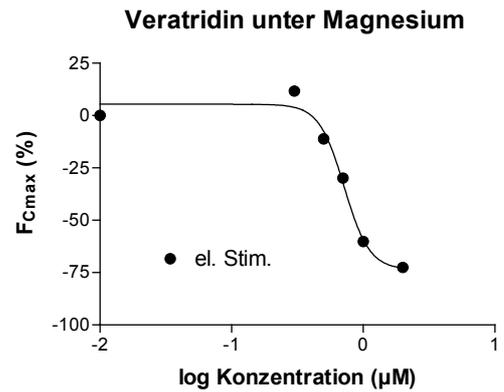
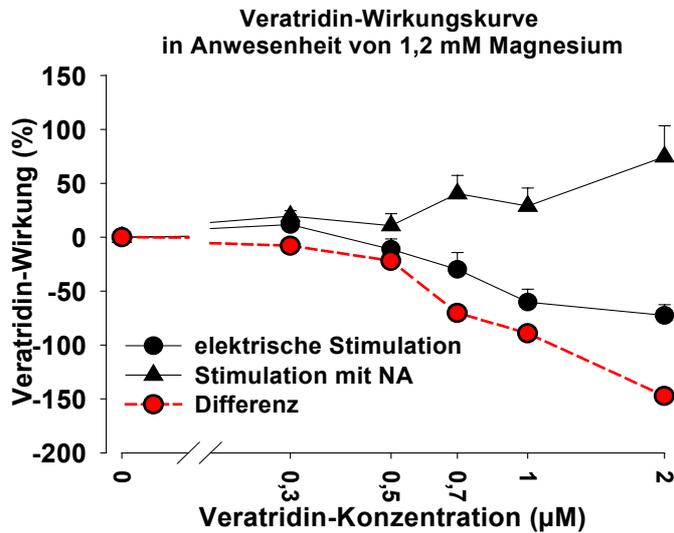


Abb. 57

A: Prozentuale Wirkung von Magnesium in Anwesenheit von 0,5 μM Veratridin auf die Kontraktionskraft bei elektrischer Stimulation (30 V, 0,1 Hz, $n=6$) und bei Stimulation mit Noradrenalin (10 μM , $n=4$) und die aus der Differenz der beiden Wirkungskurven berechnete Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung. Zur Differenzbildung wurde die initiale Kontraktion ohne Zugabe von Magnesium in Anwesenheit von Veratridin auf 0% gesetzt (eine genaue Erklärung zur Darstellungsweise bietet Kapitel 3.1.2). Die Absolutwerte waren 5,3 mN \pm 1,4 mN bei elektrischer Stimulation und 4,8 mN \pm 1,6 mN bei Stimulation mit NA.

Rechts sind die gefitteten Konzentrations-Wirkungskurven dargestellt.

Elektrische Stimulation: $EC_{50} = 0,7$ mM, $\log EC_{50} = -0,15 \pm 0,03$ mM.

Stimulation durch NA: $EC_{50} = 3,4$ mM, $\log EC_{50} = 0,53 \pm 0,08$ mM.

B: Prozentuale Wirkung von Veratridin in Anwesenheit von 1,2 mM Magnesium auf die Kontraktionskraft bei elektrischer Stimulation (30 V, 0,1 Hz, $n=6$) und bei Stimulation mit NA (10 μM , $n=4$). Die initialen Kontraktionen ohne Zugabe von Veratridin in Anwesenheit von Magnesium betragen 8,8 mN \pm 3,3 mN bei elektrischer Stimulation und 2,9 mN \pm 0,5 mN bei Stimulation mit NA. Rechts ist die gefittete Konzentrations-Wirkungskurve bei elektrischer Stimulation dargestellt. Der EC_{50} -Wert beträgt 0,7 μM ($\log EC_{50} = -0,14 \pm 0,04$ μM).

A und B: Negative Werte stellen eine Minderung, positive Werte eine Steigerung der Kontraktionskraft dar. Die Differenz-Kurve (ermittelt durch Differenz-Bildung zwischen den dargestellten

Wirkungskurven bei elektrischer Stimulation und bei Stimulation mit Noradrenalin) gibt einen Hinweis auf die Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung.

3.1.6.3 Kombinierte Wirkung von Magnesium und (-)-Menthol

Sowohl Magnesium als auch (-)-Menthol zeigten am Ductus deferens eine hemmende Wirkung auf die elektrisch induzierte Kontraktion. Beide Substanzen scheinen über die Beeinflussung des Calcium-Kanals zu einer Verminderung der Freisetzung und der Kontraktionskraft der glatten Muskulatur zu führen. Es sollte nun untersucht werden, wie sich eine Kombination der beiden Substanzen auf die elektrisch induzierte Kontraktion auswirkt. Dazu wurden folgende 3 Konzentrationen Magnesium und (-)-Menthol kombiniert und zusammen in das Organbad zugegeben:

0,6 mM Magnesium	+	7 μ M (-)-Menthol
1,2 mM Magnesium	+	10 μ M (-)-Menthol
2,4 mM Magnesium	+	30 μ M (-)-Menthol

Wie Abb. 58 und Tabelle 10 zeigen, war die Summe der jeweiligen Einzelwirkungen von Magnesium und (-)-Menthol etwas geringer als die Wirkung bei Kombination der beiden Substanzen. Ein überadditiver Effekt bei der Kombination beider Substanzen wäre somit denkbar.

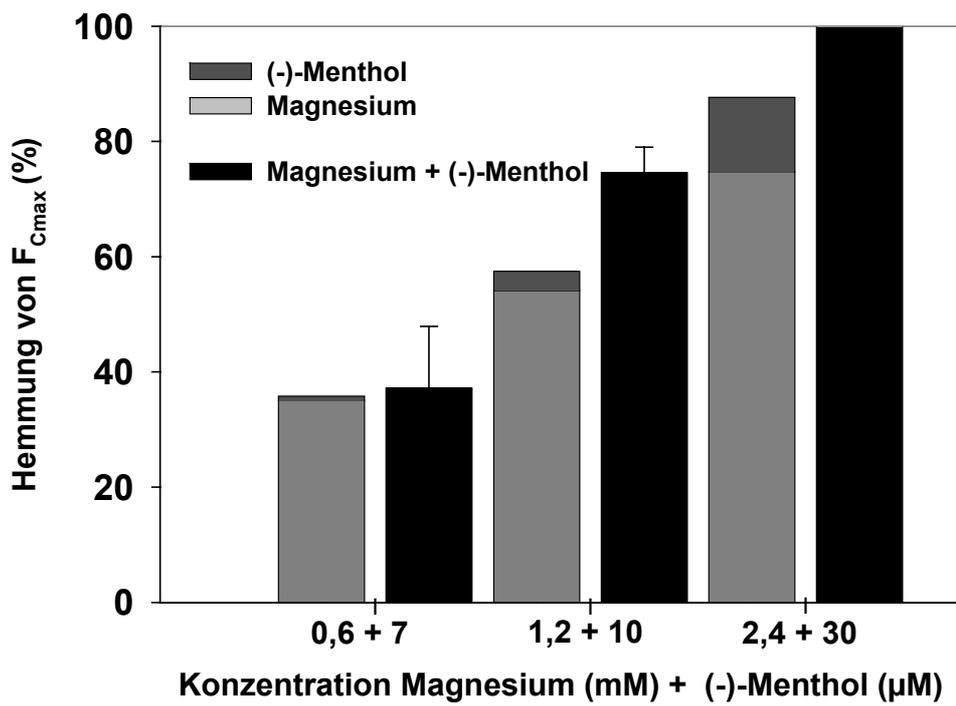
Magnesium		(-)-Menthol		Summe	Kombination Magnesium + (-)-Menthol	
Konz. (mM)	Hemmung \pm SEM (%)	Konz. (μ M)	Hemmung \pm SEM (%)	Magnesium + (-)-Menthol (%)	Konz (mM + μ M)	Hemmung \pm SEM (%)
0,6	35,0 \pm 2,9*	7	0,8 \pm 3,6**	35,8	0,6 + 7	37,2 \pm 10,7
1,2	54,1 \pm 3,9*	10	3,3 \pm 5,1**	57,5	1,2 + 10	74,6 \pm 4,4
2,4	74,7 \pm 3,1*	30	12,9 \pm 7,6**	87,6	2,4 + 30	100

Tabelle 10

Übersicht über die prozentuale Hemmung der Kontraktionskraft durch Magnesium, (-)-Menthol und Magnesium + (-)-Menthol kombiniert (n = 3). Die Kontraktion wurde durch elektrische Stimulation ausgelöst (30 V, 0,1 Hz). Die initiale Kontraktion ohne Zugabe einer Substanz entspricht 100%

** vgl. Konzentrations-Wirkungskurve von Magnesium in Abb. 55*

*** vgl. Konzentrations-Wirkungskurve von (-)-Menthol in Abb. 50*

**Abb. 58**

Graphische Darstellung der prozentualen Hemmung der Kontraktionskraft durch Magnesium, (-)-Menthol und der Kombination von Magnesium und (-)-Menthol. Zum besseren Vergleich der Kombination mit der Summe der Einzelwirkungen wurde der Betrag der Einzelwirkungen von (-)-Menthol und Magnesium in einem Balken übereinander dargestellt.

3.2 Glyoxylsäure-Färbung

Im Nebennierenmark befinden sich chromaffine Zellen, die als modifizierte postsynaptische Zellen des Sympathikus reich an den Katecholaminen Adrenalin und Noradrenalin sind. Um diese sichtbar zu machen, wurden Nebennierenschnitte der Ratte mit Glyoxylsäure behandelt. Dadurch wurden Katecholamine zu einem fluoreszierenden Produkt umgesetzt. Ziel war es, für die voltammetrischen Untersuchungen der Katecholamin-Freisetzung deren Verteilung im Nebennierenmark darzustellen.

Von Lindvall et al. (1974a) wurde je nach dem Verhältnis zwischen den beiden tautomeren Formen des fluoreszierenden Endprodukts (Abb. 27) ein Anregungsmaximum zwischen 370 und 415 nm und ein Emissionsmaximum zwischen 460 und 475 nm beschrieben. Deshalb wurde zunächst mit einer Quecksilber-Dampflampe angeregt. Diese zeigt zwei Hauptlinien in ihrem Emissionsspektrum (365 und 405 nm), die nahe der Anregungsmaxima beider tautomerer Formen liegen (Lindvall *et al.*, 1974b). Im Durchlicht-Bild ist aufgrund unterschiedlicher Strukturen deutlich zwischen Nebennierenmark und -rinde zu unterscheiden (Abb. 59 A und Abb. 60 A). Bei Anregung mit einer Quecksilberdampf-Lampe zeigen sich stark fluoreszierende Strukturen (Abb. 59 B und Abb. 60 B). Vergleicht man damit das Bild mit dem Durchlicht-Bild, ist zu erkennen, dass es sich bei der stark fluoreszierenden Struktur um das Nebennierenmark handelt. Die Rinde dagegen fluoresziert kaum. Katecholamine scheinen dabei in den chromaffinen Zellen im gesamten Nebennierenmark gleichmäßig verteilt zu sein. Lediglich vorhandene Blutgefäße sind als nicht fluoreszierende Bereiche zu erkennen. Bei konfokaler Mikroskopie wurde mit Laser-Licht der Wellenlänge 365 nm angeregt und Emissionslicht < 385 nm mit einem Langpass-Filter herausgefiltert. So erhaltene Bilder (Abb. 59 D und Abb. 60 D) liefern einen exakten, besonders streulichtarmen optischen Schnitt durch das Präparat. Bei Vergleich mit dem jeweiligen Durchlichtbild (Abb. 59 C und Abb. 60 C) ist wieder zu erkennen, dass es sich bei dem fluoreszierenden Bereich um das Mark handelt. Auch hier zeigt sich eine gleichmäßige Verteilung der Katecholamine im Nebennierenmark.

Mittels Voltammetrie sollte also bei beliebiger Platzierung der Kohlefase-Mikroelektrode an den Nebennieren-Schnitten innerhalb des Mark-Bereichs eine Messung der Katecholamin-Freisetzung möglich sein.

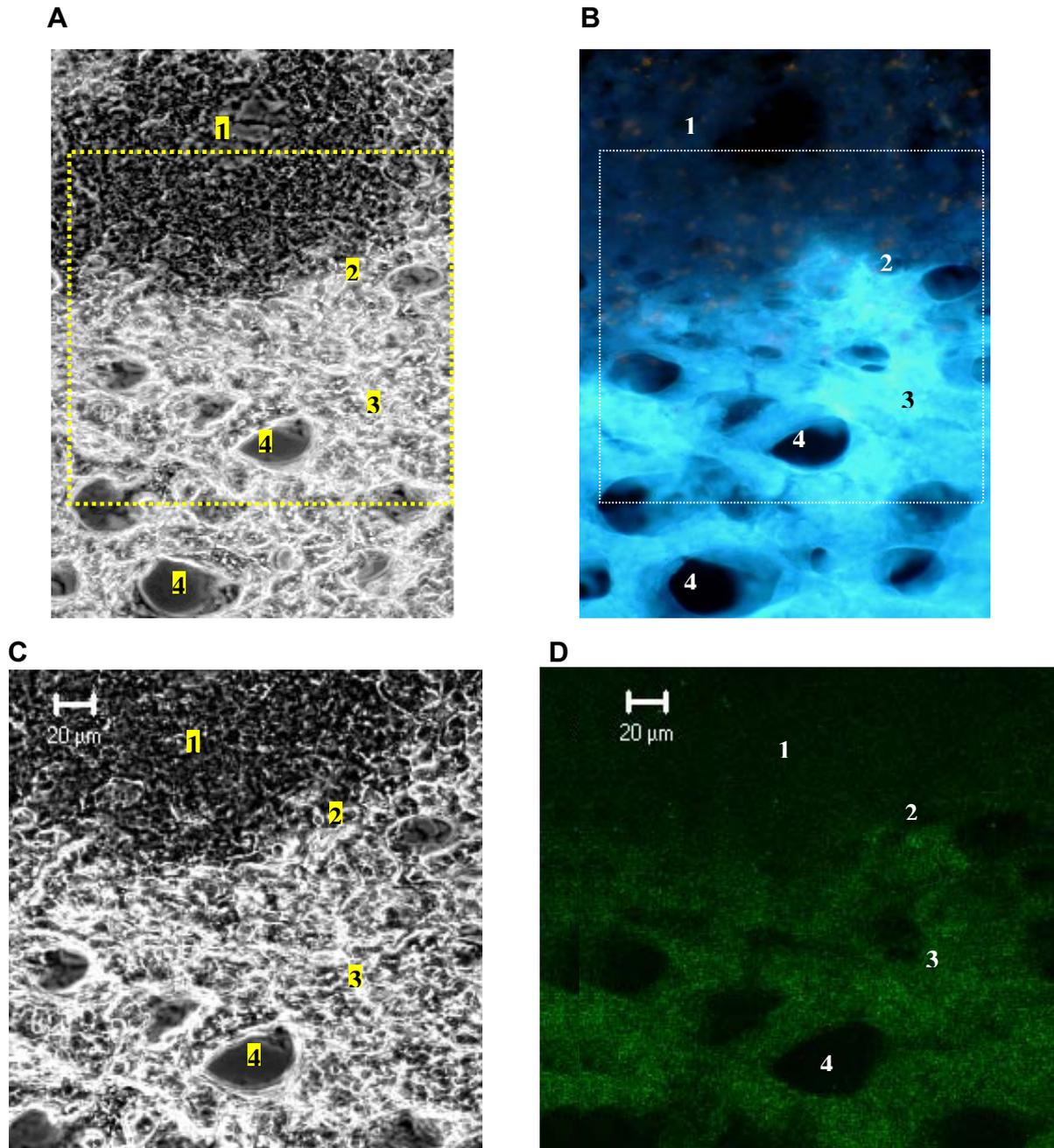


Abb. 59

1: Nebennierenrinde
2: Übergang Rinde - Mark

3: Nebennierenmark
4: Blutgefäße

A: Durchlichtbild eines Nebennierenschnitts, der mit Glyoxylsäure behandelt wurde. Mark (3) und Rinde (1) sind auf Grund der unterschiedlichen Strukturen gut zu unterscheiden.

B: Gleicher Bildausschnitt wie **A**. Anregung mit einer Quecksilber-Dampflampe. Deutlich zu unterscheiden sind das fluoreszierende Mark (3) und die nicht fluoreszierende Rinde (1). Beide Bilder wurden mit einer Nikon-Kamera aufgenommen.

C und D: In **A** und **B** markierter Bildausschnitt, aufgenommen mit einem konfokalen Mikroskop.

C: Durchlichtbild. **D:** Gleicher Bildausschnitt wie **C**, konfokal. Anregung mit dem Enterprise-II-Laser bei 364 nm. Das Mark fluoresziert, die Rinde nicht.

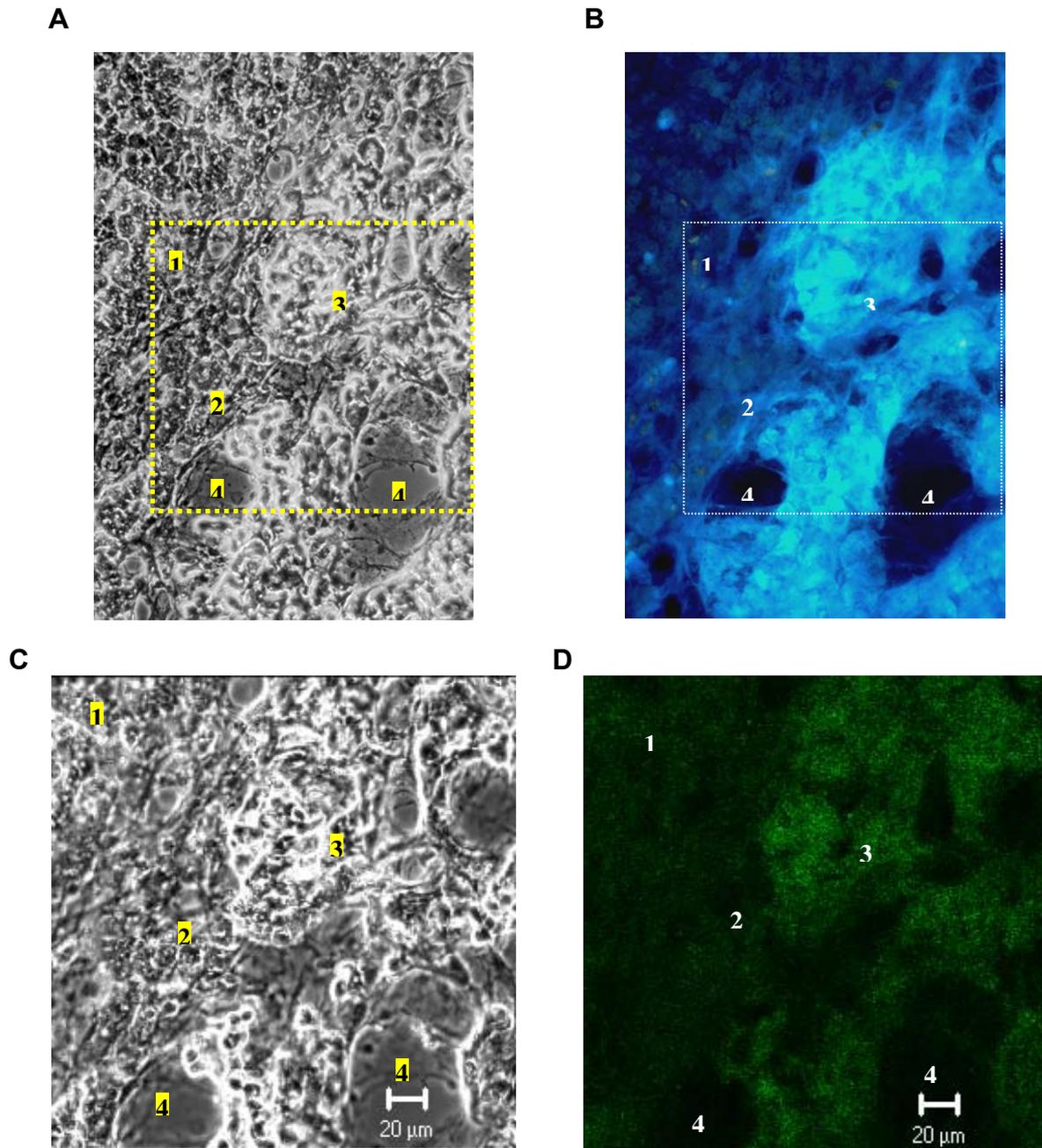


Abb. 60

1: Nebennierenrinde
2: Übergang Rinde - Mark

3: Nebennierenmark
4: Blutgefäße

A: Durchlichtbild eines Nebennierenschnitts, der mit Glyoxylsäure behandelt wurde. Mark (3) und Rinde (1) sind auf Grund der unterschiedlichen Strukturen gut zu unterscheiden. **B:** Gleicher Bildausschnitt wie A. Anregung mit einer Quecksilber-Dampflampe. Deutlich zu unterscheiden sind das fluoreszierende Mark (3) und die nicht fluoreszierende Rinde (1). Beide Bilder wurden mit einer Nikon-Kamera aufgenommen.

C und D: In **A** und **B** markierter Bildausschnitt, aufgenommen mit einem konfokalen Mikroskop.

C: Durchlichtbild. **D:** Gleicher Bildausschnitt wie **C**, konfokal. Anregung mit dem Enterprise-II-Laser bei 364 nm. Das Mark fluoresziert, die Rinde nicht.

3.3 Voltammetrie an Nebennieren-Schnitten

3.3.1 Etablierung des Versuchsmodells

3.3.1.1 Etablierung der Messmethode

Mittels Voltammetrie mit Kohlefaser-Mikroelektroden kann in unmittelbarer Nähe von freisetzenden Zellen die Katecholamin-Konzentration bestimmt werden. Dadurch kann die Wirkung von Substanzen auf die Katecholamin-Freisetzung beobachtet werden. Da die Methode neu etabliert wurde, galt es zunächst die Funktion des Versuchsaufbaus zu überprüfen und näher zu charakterisieren. Dazu wurde das Verhalten bei definierten Konzentrationen Adrenalin und Noradrenalin untersucht.

Abb. 61 zeigt jeweils einen typischen Verlauf des gemessenen Stroms (A und B), des reinen Oxidations- bzw. Reduktionsstroms (C und D) und der Strom-Spannungs-Beziehung bei 0,1 mM Adrenalin und 0,1 mM Noradrenalin (E und F). An der Elektrode wurde dabei der in Abb. 20 dargestellte Dreiecksimpuls zwischen -400 mV und $+995$ mV angelegt.

In ruhender Lösung können die ablaufenden Vorgänge folgendermaßen beschrieben werden: Mit steigender Spannung nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxidation von Adrenalin und Noradrenalin stetig zu. Dadurch kommt es auch zum Anstieg des positiven Oxidationsstroms (Abb. 61 C und D). Im Oxidationsmaximum entspricht die Reaktionsgeschwindigkeit der Diffusions-Geschwindigkeit von Katecholaminen zur Elektrodenoberfläche. Ist dieser Punkt überschritten, verarmt die Elektrodenumgebung mit zunehmender Spannung allerdings auch zunehmend an Katecholaminen, da die Reaktionsgeschwindigkeit die Diffusionsgeschwindigkeit übersteigt. Aus diesem Grund kann weniger Substanz an der Elektrodenoberfläche umgesetzt werden und der Oxidationsstrom sinkt wieder ab. Vermindert sich die an der Elektrode angelegte Spannung nach Erreichen des Maximums von 995 mV wieder, kommt es schließlich zur zunehmenden Rückreduktion der Oxidationsprodukte. Dabei laufen die Vorgänge in umgekehrter Richtung wie bei der Oxidation ab. Da ein negativer Strom fließt, wird ein negatives Reduktionsmaximum gemessen. Bis zu ihrer Rückreduktion haben sich Teile der Oxidationsprodukte allerdings durch Diffusion bereits in der Lösung verteilt. Aus diesem Grund ist der Reduktionspeak kleiner als der Oxidationspeak. Außerdem ist der Reduktionsstrom hinsichtlich der quantitativen Messung der Katecholamin-Konzentration eine ungenauere Messgröße. Deshalb wird nur der maximale Oxidationsstrom zur quantitativen Auswertung verwendet.

Abb. 61 E und F zeigt die Strom-Spannungs-Beziehungen in Anwesenheit von Adrenalin und Noradrenalin. Aufgrund substanzspezifischer Oxidations- und Reduktions-Bereiche kann die Strom-Spannungs-Beziehung auch zur qualitativen Unterscheidung verschiedener Substanzen verwendet werden. Da bei dem hier verwendeten Potentialbereich sowohl Adrenalin als auch Noradrenalin zu einem

ortho-Chinon (Reaktion s. Abb. 18) oxidiert werden, liegen die Oxidationsmaxima beider Katecholamine dicht beieinander (in diesem Beispiel: Adrenalin bei 721 mV und Noradrenalin bei 557 mV). Im Rahmen dieser Messungen kann deshalb nicht zwischen Adrenalin und Noradrenalin unterschieden werden.

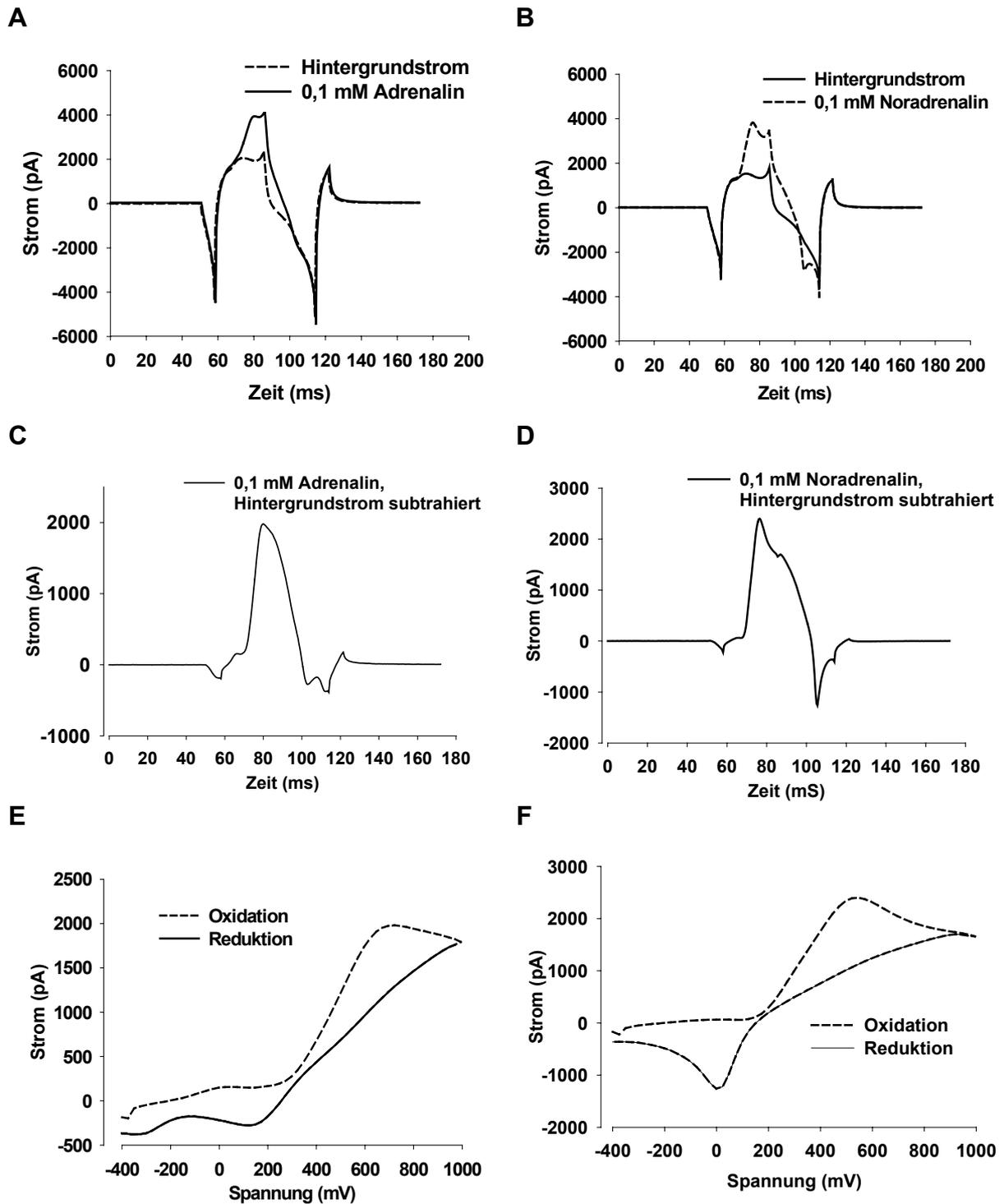


Abb. 61

A und B: Einzelbeispiele des gemessenen Stroms in Anwesenheit einer definierten Konzentration (0,1 mM) Adrenalin (**A**) und Noradrenalin (**B**) und des entsprechenden Hintergrundstroms, der jeweils in Nährlösung ohne Katecholamine gemessen wurde.

C und D: Reiner Oxidations- bzw. Reduktionsstrom von Adrenalin (**C**) und Noradrenalin (**D**), erhalten durch Subtraktion des jeweiligen Hintergrundstroms vom gemessenen Strom in Anwesenheit der Katecholamine.

E und F: Strom-Spannungs-Beziehungen für den Oxidations- und Reduktionsstrom in Gegenwart von Adrenalin (**E**) und Noradrenalin (**F**).

Der Zeitraum von 1 s zwischen den einzelnen Durchläufen (Scan-Frequenz 1 Hz) sollte ausreichen, um einer Verarmung an Katecholaminen in der Elektroden-Umgebung durch Diffusion entgegenzuwirken. Aus diesem Grund sollte die Konzentration an Katecholaminen direkt proportional zum gemessenen maximalen Oxidationsstrom sein (Travis *et al.*, 1998). Zur Überprüfung wurden Kalibriergeraden für Adrenalin und Noradrenalin erstellt. Abb. 62 zeigt, dass das Messverfahren im untersuchten Bereich (Adrenalin: 0,01 mM bis 0,20 mM, Noradrenalin: 0,02 mM bis 0,26 mM) linear ist.

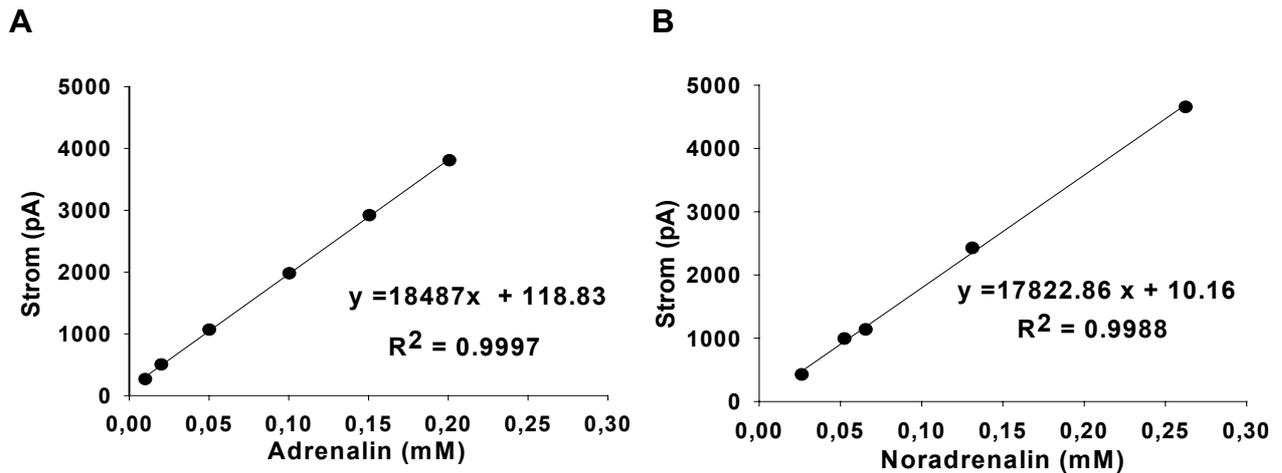
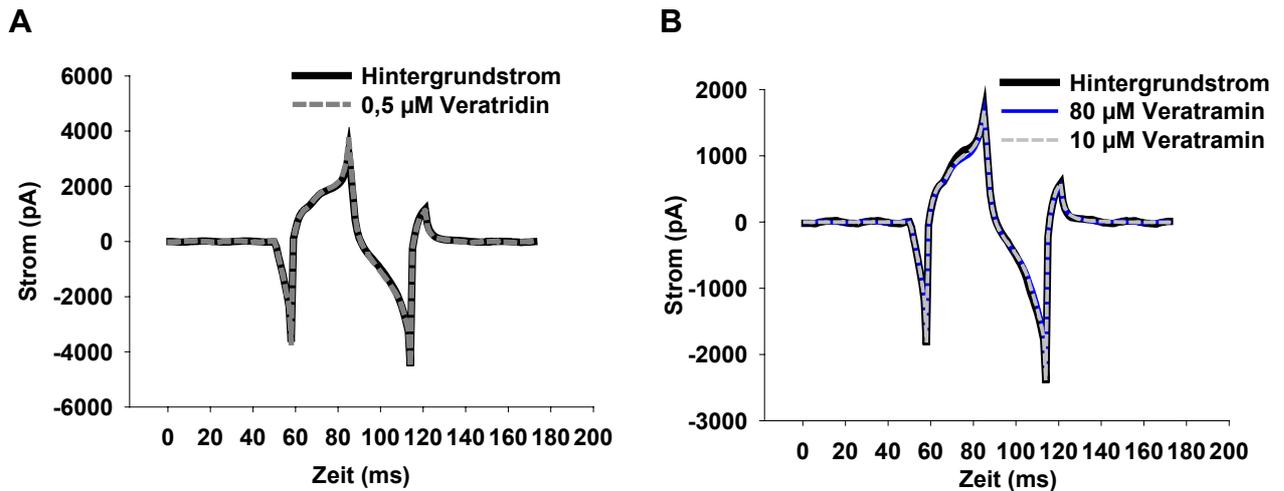


Abb. 62

Kalibriergeraden erstellt mit definierten Konzentrationen Adrenalin (A) und Noradrenalin (B). Die Katecholamine waren dabei in einer Nährlösung ohne Magnesium (Lösung A, Zusammensetzung vgl. Tabelle 1) gelöst.

Außerdem wurde bei allen verwendeten Lösungen überprüft, ob deren Bestandteile alleine bereits elektroaktiv sind und so die Messung der Freisetzung stören könnten. Dazu wurde der Hintergrund-Strom in Standard-Lösung (Nährlösung ohne Magnesium, Lösung A, Zusammensetzung vgl. Tabelle 1) und anschließend der Strom in entsprechender Test-Lösung bestimmt. Bei keiner der verwendeten Lösungen kam es zu einer nennenswerten Veränderung des Hintergrundstroms. In Abb. 63 ist beispielhaft der gemessene Strom der Test-Lösungen von 0,5 μ M Veratridin (Abb. 63 A) bzw. 10 μ M und 80 μ M Veratramin gezeigt (Abb. 63 B).

**Abb. 63**

Gemessener Strom in Anwesenheit von 0,5 µM Veratridin (A) bzw. 10 µM und 80 µM Veratramin (B) im Vergleich zum Hintergrundstrom in Abwesenheit der Substanzen.

3.3.1.2 Kontrollversuche zur Stimulation der Freisetzung am Nebennierenmark

Um die Wirkung der verschiedenen Substanzen auf die Katecholamin-Freisetzung zu untersuchen, wurde die Freisetzung durch Erhöhung der K^+ -Konzentration, Zugabe von Carbachol, DMPP oder Absenkung des pH-Wertes induziert. Da die Messungen von verschiedenen Parametern, wie z.B. der Oberflächenbeschaffenheit und der genauen Position der Elektrode am Nebennieren-Schnitt abhängen, sollte für jede Messung ein Bezugspunkt bestimmt werden. Aus diesem Grund wurde bei jeder Messung zunächst die Freisetzung ohne die zu untersuchende Substanz mit dem entsprechenden Stimulus induziert. Erst bei der zweiten Stimulation war dann die jeweils zu untersuchende Substanz anwesend. Um die Wirkung der Substanzen genau beurteilen zu können, sollte zunächst in Kontrollversuchen das Verhalten bei wiederholter Stimulation untersucht werden. Dazu wurde jeweils zweimal hintereinander die entsprechende Stimulations-Lösung für 3 Minuten superfundiert. Zwischen den Stimulationen wurde 15 Minuten lang mit Standard-Lösung (Nährlösung ohne Magnesium, Lösung A, Zusammensetzung vgl. Tabelle 1) superfundiert.

Durch das Umschalten zwischen den Superfusions-Lösungen kam es zu einer leichten mechanischen Beanspruchung des Präparats und so zu geringen Veränderungen des Hintergrundstroms. Deshalb wurde zunächst der Hintergrundstrom bei Superfusion mit Standard-Lösung (Nährlösung ohne Magnesium, Lösung A, Zusammensetzung vgl. Tabelle 1) aus Kanal 1 bestimmt und anschließend mit der gleichen Lösung aus Kanal 2. Abb. 64 A zeigt die Auswirkung des mechanischen Reizes durch Umschalten auf einen anderen Superfusions-Kanal. Es kam zu einem vorübergehenden Anstieg des Stroms, der aber sehr schnell wieder auf einen konstanten, nur geringfügig über den Nullwert liegenden Wert zurückging, der nur geringfügig über dem Nullwert lag. Ausgewertet wurde wie bei allen folgenden

Versuchen jeweils die maximale Amplitude und die Fläche unter der Kurve (AUC) im Zeitraum bis 50 s. In 5 Versuchen wurde nach dem Wechsel auf den zweiten Superfusions-Kanal ein maximaler Strom von $231 \text{ pA} \pm 72 \text{ pA}$ und eine AUC von $3794 \text{ pAs} \pm 737 \text{ pAs}$ gemessen (Abb. 64 B und C).

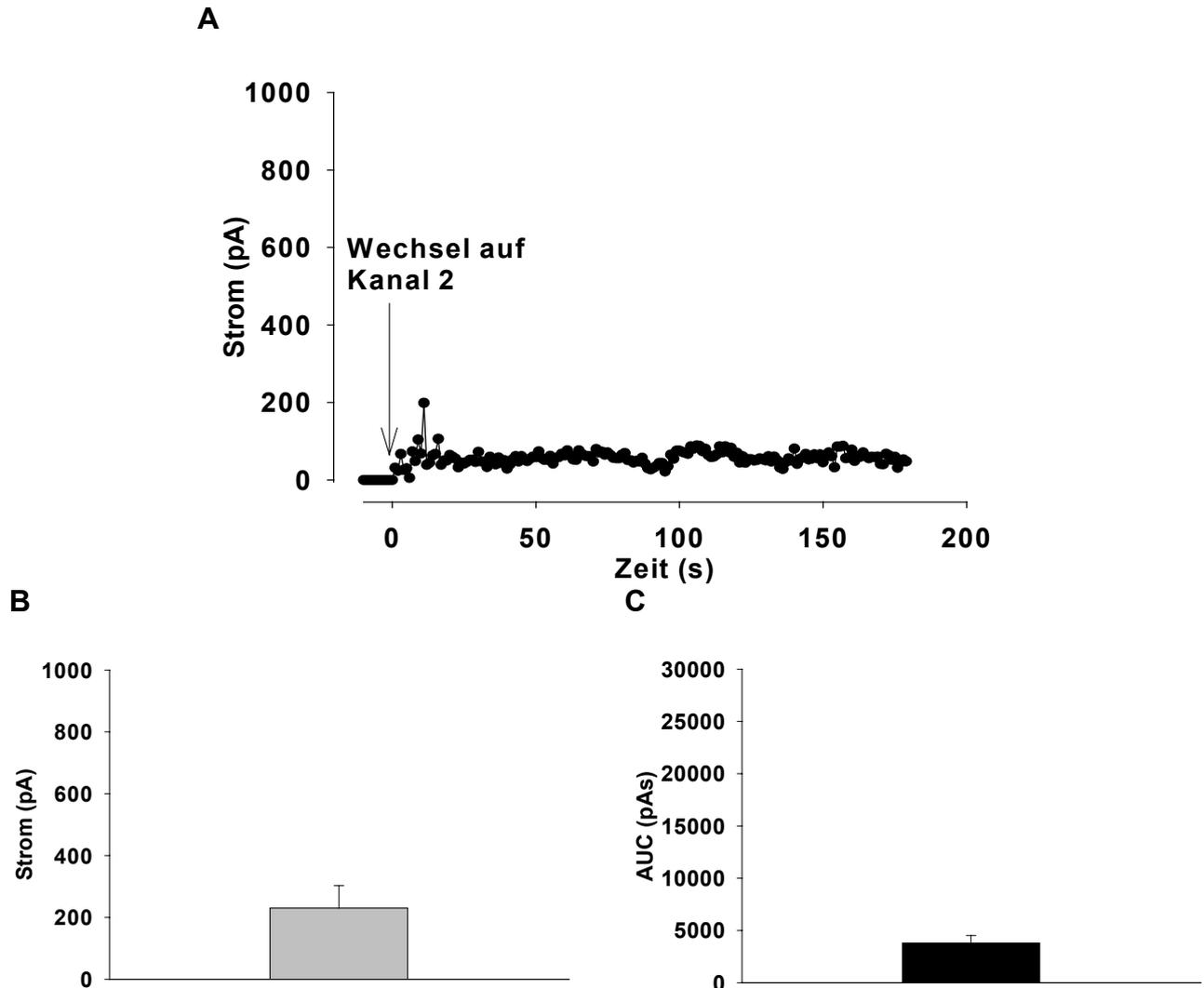


Abb. 64

Auswirkung des Umschaltens zwischen 2 Superfusions-Kanälen am Nebennierenmark.

A: Einzelbeispiel des gemessenen Stroms. Zum Zeitpunkt 0 wurde zwischen Kanal 1 und Kanal 2 umgeschaltet. Aus beiden Superfusions-Kanälen wurde Lösung der gleichen Zusammensetzung (Nährlösung ohne Magnesium, Lösung A, Zusammensetzung vgl. Tabelle 1) superfundiert.

B und C: Mittelwerte des maximalen Oxidationsstroms und der AUC im Zeitraum bis 50 s aus 5 Versuchen.

3.3.1.3 Kontrollversuche zur Stimulation mit Kalium

Mittels Amperometrie konnte von Barbara et al. (1998b) am Nebennieren-Schnitt der Ratte gezeigt werden, dass es bei einer Stimulation mit 140 mM KCl zu Einzelfreisetzungen aus den chromaffinen Zellen kommt. Aus diesem Grund wurde auch in den folgenden Untersuchungen eine relativ hohe Kalium-Konzentration

gewählt. Die Freisetzung wurde durch eine Lösung mit einer Konzentration von 116 mM K^+ induziert (Lösung C, Zusammensetzung s. Tabelle 1). Abb. 65 A zeigt einen typischen Verlauf des voltammetrisch ermittelten Oxidationsstroms bei zweimaliger Stimulation mit 116 mM K^+ . Der Verlauf des Oxidationsstroms repräsentiert den Verlauf der Freisetzung von Katecholaminen. Es kam zunächst innerhalb weniger Sekunden zu einem Anstieg der Freisetzung. Bei weiterer Superfusion mit K^+ -reicher Lösung nahm die Freisetzung dann wieder kontinuierlich ab. Nach 15-minütiger Wartezeit konnte annähernd der gleiche Verlauf bei Stimulation mit Kalium erzielt werden. Ausgewertet wurde jeweils die maximale Amplitude und die Fläche unter der Kurve (AUC) in dem Zeitraum bis 50 s. Abb. 65 B und C zeigen die Mittelwerte aus 6 Versuchen. Mit Kalium kam es zu einem maximalen Oxidationsstrom von $3036 \text{ pA} \pm 429 \text{ pA}$ bei der ersten Stimulation und $2998 \text{ pA} \pm 266 \text{ pA}$ bei der zweiten Stimulation. Die Flächen unter der Kurve betragen $110638 \text{ pAs} \pm 18378 \text{ pAs}$ und $100696 \text{ pAs} \pm 11158 \text{ pAs}$. Bezieht man die Ergebnisse der zweiten Stimulation auf die jeweiligen Ergebnisse der ersten Stimulation, ergeben sich bei der zweiten Stimulation mit Kalium eine maximale Freisetzung von $105\% \pm 14\%$ und eine AUC von $98\% \pm 14\%$ (Abb. 73).

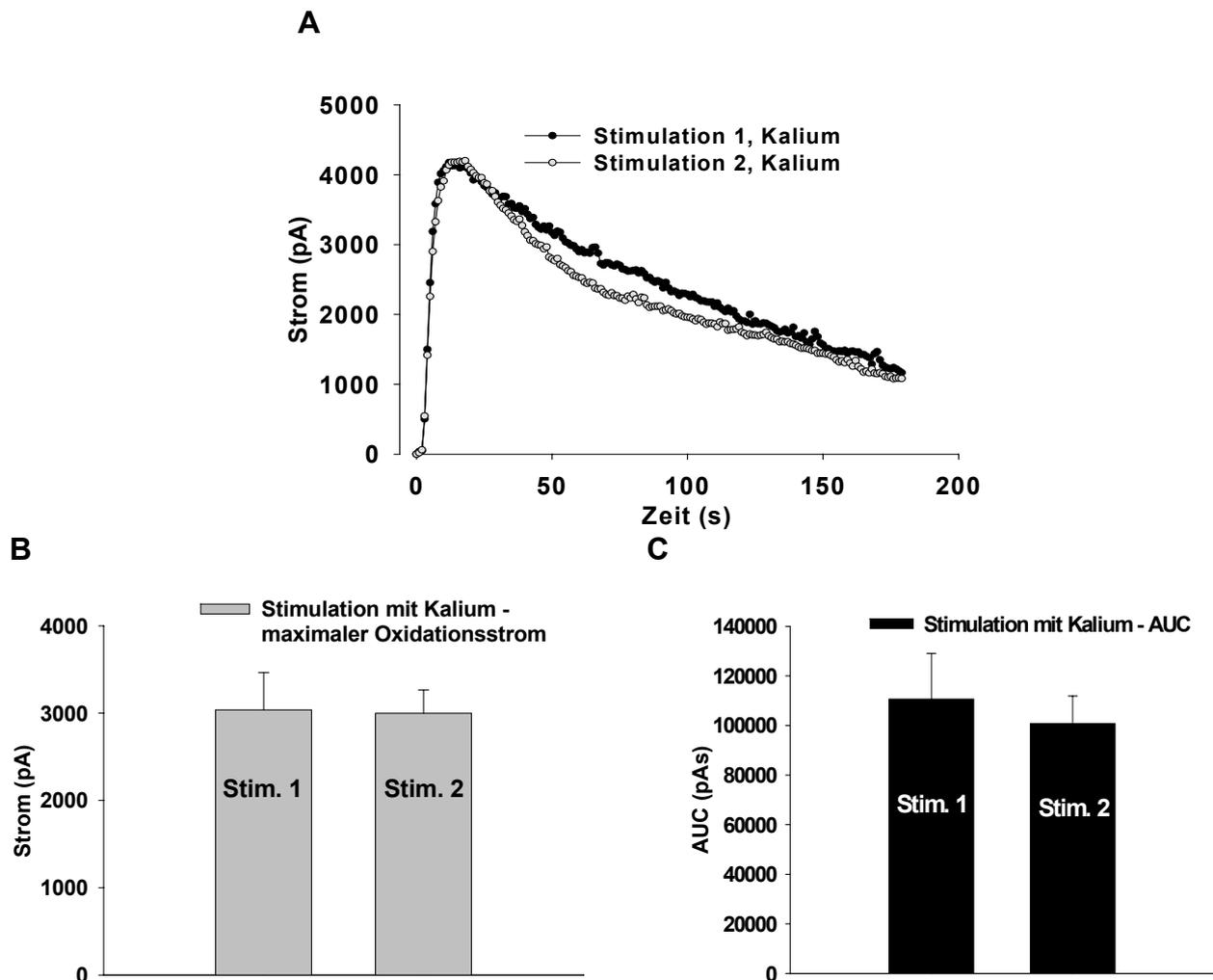


Abb. 65

Stimulation der Katecholamin-Freisetzung durch Superfusion mit K^+ -reicher (116 mM) Lösung (Lösung C, Zusammensetzung s. Tabelle 1).

A: Einzelbeispiel des gemessenen Oxidationsstroms bei zweimaliger Stimulation (Dauer: jeweils 3 Minuten). Zeitpunkt 0 entspricht dem Beginn der Superfusion mit K^+ -reicher Lösung. Zwischen den beiden Stimulationen lag eine 15-minütige Pause, in der kontinuierlich mit Nährlösung (Lösung A, Zusammensetzung s. Tabelle 1) superfundiert wurde.

B: Mittelwert des maximalen Oxidationsstroms ($n = 6$) bei erster und zweiter Stimulation.

C: Mittelwerte der Fläche unter der Kurve (AUC) im Zeitraum 0s bis 50 s ($n = 6$) bei erster und zweiter Stimulation.

3.3.1.4 Kontrollversuche zur Stimulation mit Carbachol

Die physiologische Freisetzung von Katecholaminen im Nebennierenmark erfolgt durch Acetylcholin. In der vorliegenden Arbeit wurde stattdessen das stabilere Carbachol verwendet. 1 mM Carbachol führte an kultivierten bovinen chromaffinen Zellen zu einer deutlichen Freisetzung von Katecholaminen (Leszczyszyn *et al.*, 1991; Wightman *et al.*, 1991). Aus diesem Grund wurde auch in der vorliegenden Arbeit die Freisetzung mit 1 mM Carbachol induziert. Dies führte zu einem ähnlichen Freisetzungsverlauf wie bei Stimulation mit Kalium (Abb. 66 A). Der maximale Oxidationsstrom (erste Stimulation: $2072 \text{ pA} \pm 833 \text{ pA}$, zweite Stimulation: $1792 \text{ pA} \pm 710 \text{ pA}$) und die AUC (erste Stimulation: $99989 \text{ pAs} \pm 34540 \text{ pAs}$, zweite Stimulation: $95607 \text{ pAs} \pm 34060 \text{ pAs}$) waren etwas geringer als bei der Stimulation mit 116 mM K^+ (Abb. 66 B und C). Bei der zweiten Stimulation kam es insgesamt zu einer leichten Verringerung der Freisetzung gegenüber der ersten Stimulation. Der maximale Oxidationsstrom betrug $89\% \pm 4\%$ und die AUC $90\% \pm 6\%$ (Abb. 73) des Kontrollwertes aus der ersten Stimulation.

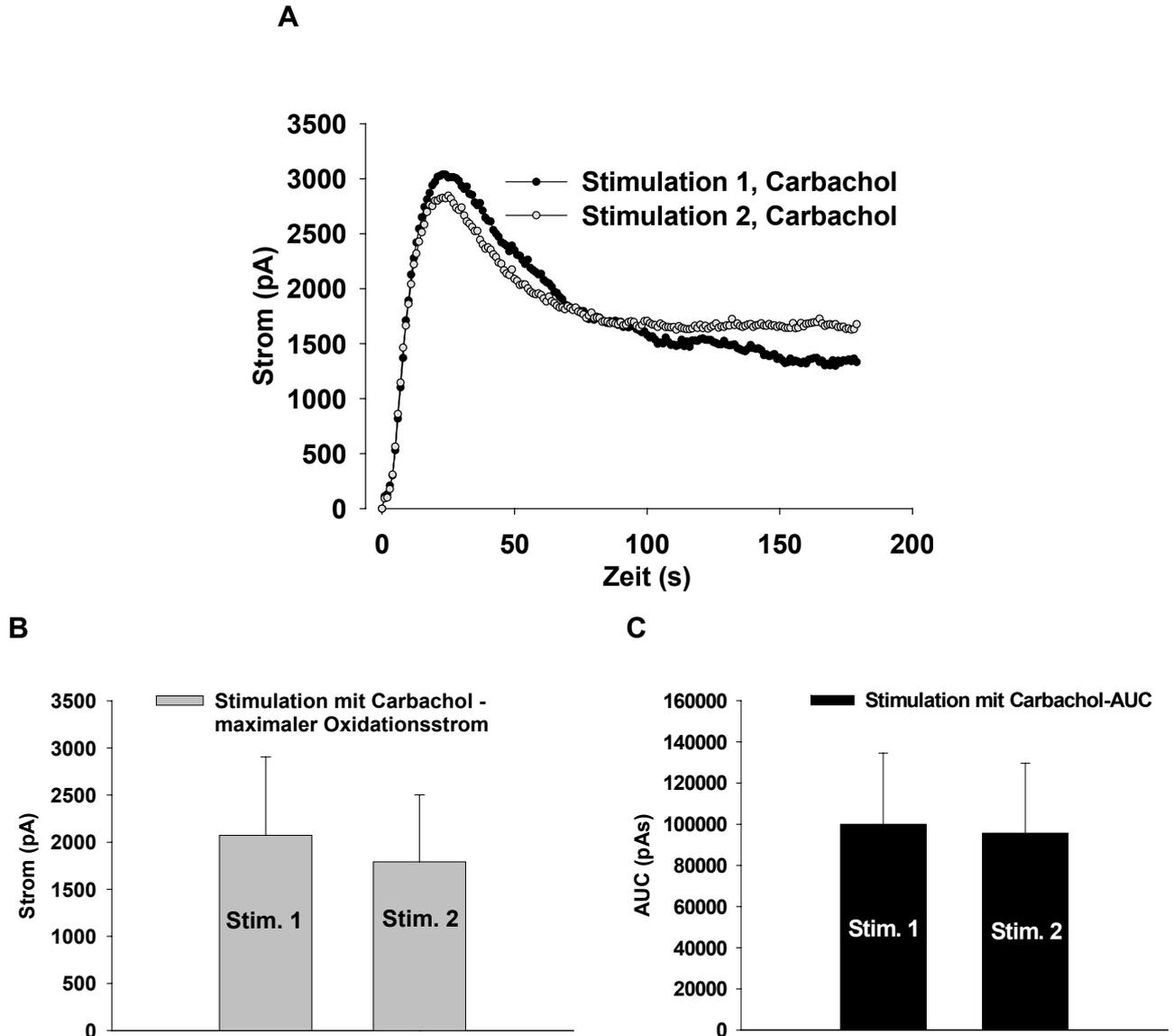


Abb. 66

Stimulation der Katecholamin-Freisetzung durch Superfusion mit 1 mM Carbachol.

A: Einzelbeispiel des gemessenen Oxidationsstroms bei zweimaliger Stimulation (Dauer: jeweils 3 Minuten). Zeitpunkt 0 entspricht dem Beginn der Superfusion mit Carbachol. Zwischen den beiden Stimulationen lag eine 15-minütige Pause, in der kontinuierlich mit Nährlösung ohne Magnesium (Lösung A, Zusammensetzung s. Tabelle 1) superfundiert wurde.

B: Mittelwert des maximalen Oxidationsstroms ($n = 7$) bei erster und zweiter Stimulation.

C: Mittelwerte der Fläche unter der Kurve (AUC) im Zeitraum 0 s bis 50 s ($n = 7$) bei erster und zweiter Stimulation.

Da Carbachol sowohl N- als auch M-Cholinozeptoren aktivieren kann, wurde im Folgenden die Wirkung von Tubocurarin, einem selektiven Antagonisten am N-Cholinozeptor, untersucht. Dazu wurde die zweite Stimulation mit Carbachol in Anwesenheit von 50 μ M Tubocurarin durchgeführt. Tubocurarin verminderte die Freisetzung deutlich. Es wurden nur noch $51\% \pm 5\%$ des maximalen Oxidationsstroms und der AUC im Vergleich zur ersten Stimulation in Abwesenheit von Tubocurarin erreicht (Abb. 67).

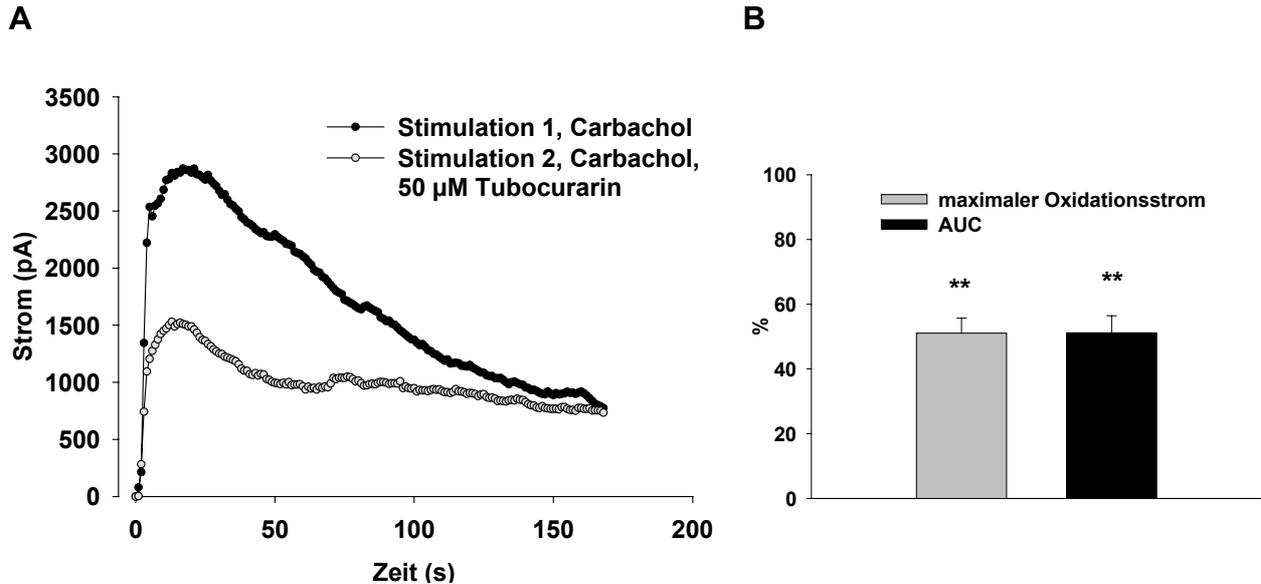


Abb. 67

Wirkung von 50 µM Tubocurarin auf die Stimulation mit 1 mM Carbachol.

A: Einzelbeispiel des gemessenen Oxidationsstroms. Bei der zweiten Stimulation war 50 µM Tubocurarin anwesend. Zwischen den beiden Stimulationen lag eine 15-minütige Pause, in der zunächst mit Nährlösung ohne Magnesium (Lösung A, Zusammensetzung s. Tabelle 1) und in den letzten 3 Minuten mit Nährlösung, die 50 µM Tubocurarin enthielt, superfundiert wurde.

B: Prozentuale Auswertung des maximalen Oxidationsstroms und der AUC im Zeitraum 0 s bis 50 s ($n = 4$). Die Werte der zweiten Stimulation wurden auf die Werte der ersten Stimulation bezogen.

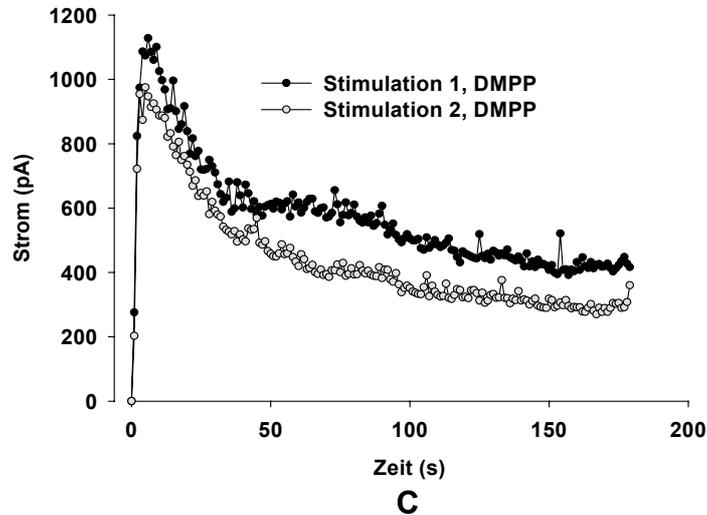
Der maximale Oxidationsstrom betrug 2896 pA \pm 825 pA (erste Stimulation ohne Tubocurarin) und 1518 pA \pm 438 pA (zweite Stimulation mit Tubocurarin), die AUC betrug 104269 pAs \pm 22244 pAs (erste Stimulation ohne Tubocurarin) und 53019 pAs \pm 10415 pAs (zweite Stimulation mit Tubocurarin) ** $p < 0,01$.

3.3.1.5 Kontrollversuche zur Stimulation mit DMPP

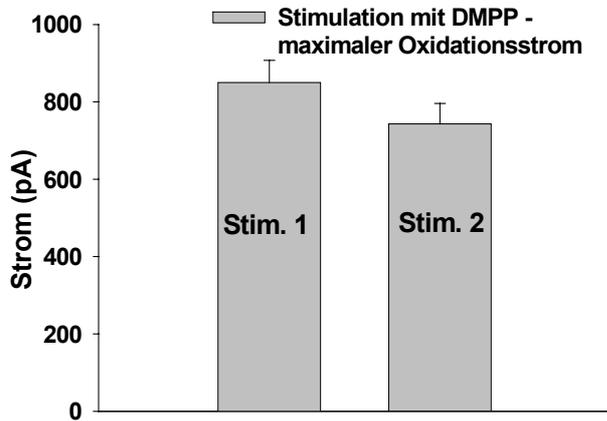
Um die Freisetzung durch die spezifische Aktivierung der N-Cholinozeptoren zu induzieren, wurde mit dem selektiven Agonisten DMPP stimuliert. Zur Vermeidung unspezifischer Wirkungen wurde hier eine möglichst geringe Konzentration verwendet, die aber noch zu einer ausreichenden Freisetzung führte. Mit 20 µM DMPP kam es zu einem maximalen Oxidationsstrom von 850 pA \pm 57 pA bei der ersten Stimulation und 753 pA \pm 53 pA bei der zweiten Stimulation und zu einer AUC von 29606 pAs \pm 2339 pAs bei der ersten Stimulation und 25533 pAs \pm 2188 pAs bei der zweiten Stimulation. Diese Freisetzung erschien ausreichend im Hinblick auf Hintergrundstrom und sonstige mechanische Störungen. Betrachtet man den Verlauf (Abb. 68 A) scheint die Freisetzung nach Erreichen des Maximums etwas schneller abzunehmen als bei Stimulation mit Kalium und Carbachol.

Auch hier kam es bei der zweiten Stimulation zu einer leichten Verringerung der Freisetzung gegenüber der ersten Stimulation (Abb. 68). Der maximale Oxidationsstrom betrug 88% \pm 4% und die AUC 86% \pm 4% der Kontrolle (Abb. 73).

A



B



C

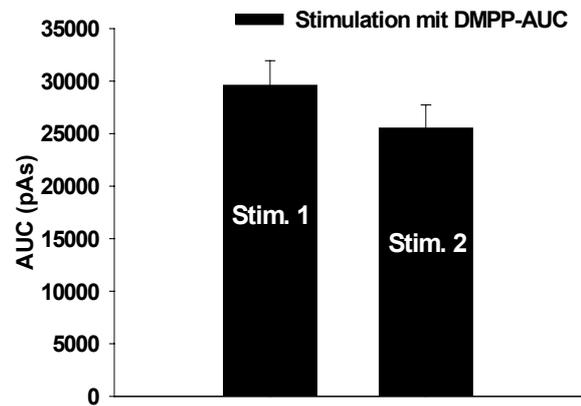


Abb. 68

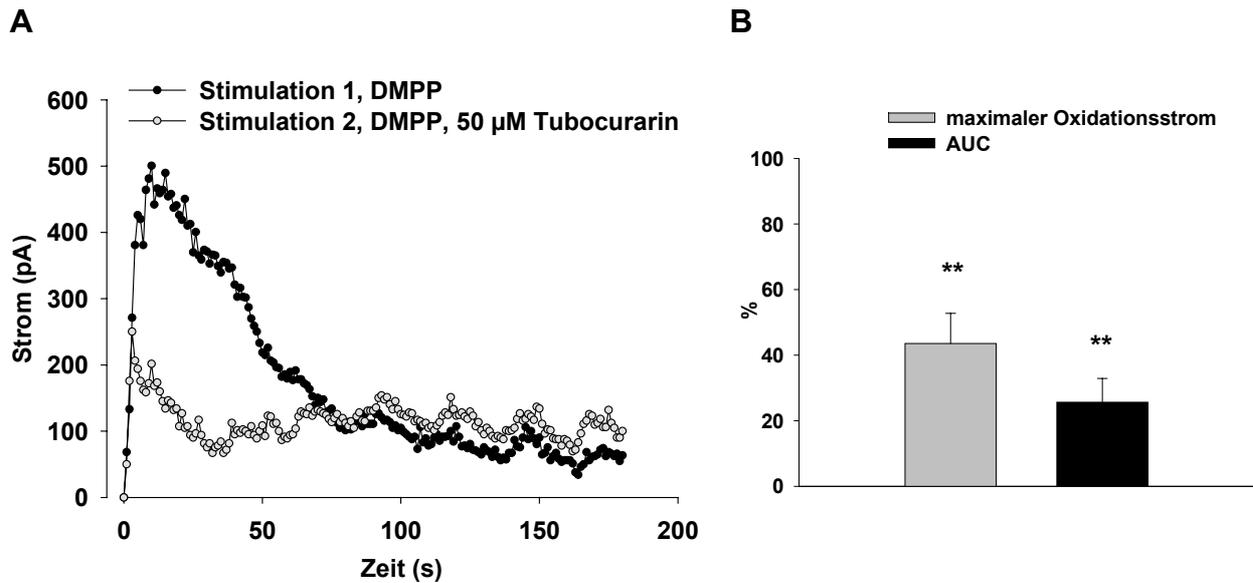
Stimulation der Katecholamin-Freisetzung durch Superfusion mit 20 μM DMPP.

A: Einzelbeispiel des gemessenen Oxidationsstroms bei zweimaliger Stimulation (Dauer: jeweils 3 Minuten). Zeitpunkt 0 entspricht dem Beginn der Superfusion mit DMPP. Zwischen den beiden Stimulationen lag eine 15-minütige Pause, in der kontinuierlich mit Nährlösung ohne Magnesium (Lösung A, Zusammensetzung s. Tabelle 1) superfundiert wurde.

B: Mittelwert des maximalen Oxidationsstroms ($n = 7$) bei erster und zweiter Stimulation.

C: Mittelwerte der Fläche unter der Kurve (AUC) im Zeitraum 0 s bis 50 s ($n = 7$) bei erster und zweiter Stimulation.

Auch hier wurde, wie bei der Stimulation mit Carbachol, die Wirkung von Tubocurarin untersucht. Abb. 69 A zeigt dass 50 μM Tubocurarin die DMPP-induzierte Freisetzung fast vollständig aufhob. Betrachtet man den Mittelwert aus 4 Versuchen, wird der maximale Oxidationsstrom zwar nur auf $43\% \pm 9\%$ vermindert, die AUC unter Tubocurarin war allerdings nur noch $26\% \pm 7\%$ im Verhältnis zur ersten Stimulation ohne Tubocurarin (Abb. 69 B).

**Abb. 69**

Beeinflussung der DMPP-Wirkung (20 µM) durch 50 µM Tubocurarin

A: Einzelbeispiel des gemessenen Oxidationsstroms. Bei der zweiten Stimulation war 50 µM Tubocurarin anwesend. Zwischen den beiden Stimulationen lag eine 15-minütige Pause, in der zunächst mit Nährlösung (Lösung A, Zusammensetzung s. Tabelle 1) und in den letzten 3 Minuten mit Nährlösung, die 50 µM Tubocurarin enthielt, superfundiert wurde.

B: Prozentuale Auswertung des maximalen Oxidationsstroms und der AUC im Zeitraum 0 s bis 50 s ($n = 4$). Die Werte der zweiten Stimulation wurden auf die Werte der ersten Stimulation bezogen.

Der maximale Oxidationsstrom betrug $540 \text{ pA} \pm 92 \text{ pA}$ (erste Stimulation ohne Tubocurarin) und $210 \text{ pA} \pm 28 \text{ pA}$ (zweite Stimulation mit Tubocurarin), die AUC betrug $20692 \text{ pAs} \pm 3928 \text{ pAs}$ (erste Stimulation ohne Tubocurarin) und $5039 \text{ pAs} \pm 1310 \text{ pAs}$ (zweite Stimulation mit Tubocurarin).

** $p < 0,01$.

3.3.1.6 Kontrollversuch mit Oxotremorin

Um zu überprüfen, welche Rolle der M-Cholinozeptor bei der Freisetzung in diesem Modell spielt, wurde die Wirkung des spezifisch auf den M-Cholinozeptor wirkenden Agonisten Oxotremorin (30 µM) untersucht. Hier konnte kaum eine Freisetzung beobachtet werden. Abb. 70 zeigt zwar einen leichten Anstieg des Oxidationsstroms (maximaler Oxidationsstrom: $401 \text{ pA} \pm 115 \text{ pA}$, $n = 6$) am Anfang, der allerdings schnell wieder nahezu die Nulllinie erreichte. Im Hinblick auf den leichten Anstieg des Stroms, der bereits durch den mechanischen Reiz beim Wechsel der Superfusions-Lösung entstand (Abb. 64) und im Vergleich mit dem deutlich höheren Oxidationsstrom bei der Stimulation mit anderen Substanzen, war dieser Wert allerdings sehr gering. Bei dem hier angewandten System zur Bestimmung der Katecholamin-Freisetzung scheint eine Aktivierung von M-Cholinozeptoren daher eher eine untergeordnete Rolle zu spielen.

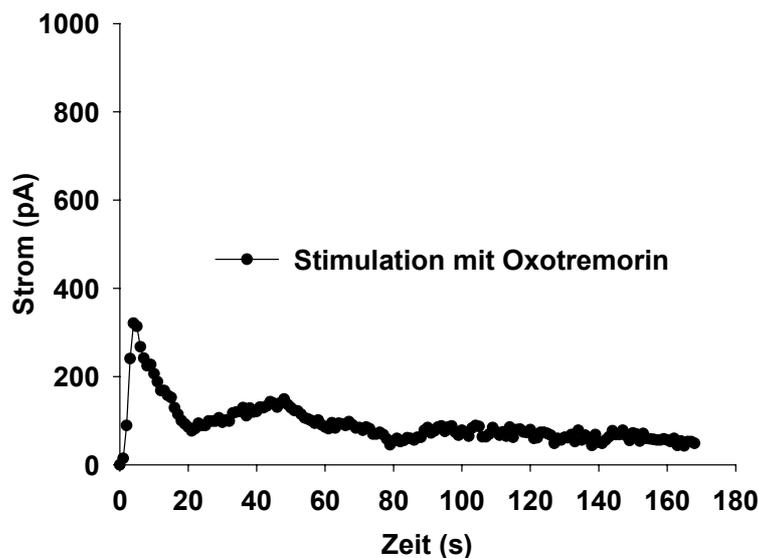


Abb. 70

Einzelbeispiel des gemessenen Stroms bei Stimulation mit $30 \mu\text{M}$ Oxotremorin. Zeitpunkt 0 entspricht dem Beginn der Superfusion mit Oxotremorin.

3.3.1.7 Kontrollversuche zur Erhöhung der extrazellulären Protonen-Konzentration

Bei Untersuchungen an der perfundierten Nebenniere der Ratte wurde bei Absenkung des extrazellulären pH-Wertes eine Freisetzung von Adrenalin, die mit einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration gekoppelt war, beobachtet (Fujiwara *et al.*, 1994). Die Freisetzung bestand dabei aus zwei Phasen, einem initialen Peak und einer länger andauernden verminderten Freisetzung.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Nebennieren-Schnitte mit Nährlösung, die zuvor mit HCl auf pH 6,4 eingestellt worden war, superfundiert (Lösung F, Zusammensetzung s. Tabelle 1). Abweichend von den anderen Versuchen war die Stimulations-Zeit hier nur 110 s bis 120 s. Die Wartezeit zwischen den Stimulationen war 10 Minuten.

Der Verlauf der Freisetzung (Abb. 71) unterschied sich deutlich sowohl von dem von Fujiwara *et al.* beobachteten Verlauf als auch von den Freisetzung-Verläufen bei Stimulation mit Kalium, Carbachol oder DMPP. Es kam nicht zu einem Peak-artigen Anstieg und anschließendem Abfall des Oxidationsstroms, sondern zu einer gleichmäßigen, während der gesamten Stimulation andauernden Freisetzung (Abb. 71 A).

Außerdem kam es bei zweifacher Stimulation zu einer Erhöhung der Freisetzung bei der zweiten Stimulation gegenüber der ersten Stimulation. Die Fläche unter der Kurve war bei der ersten Stimulation $21651 \text{ pAs} \pm 5015 \text{ pAs}$ und bei der zweiten Stimulation $29889 \text{ pAs} \pm 6205 \text{ pAs}$ was einer Steigerung auf $145\% \pm 15\%$ (Abb. 73) entspricht. Der Unterschied erwies allerdings als nicht signifikant. Der maximale Oxidationsstrom wurde in diesem Zusammenhang nicht ausgewertet.

Auch bei der spontanen Freisetzung durch Absenkung des extrazellulären pH-Wertes wurde die Wirkung von Tubocurarin untersucht. Das Einzelbeispiel in Abb. 72 A zeigt, dass Tubocurarin den Verlauf der Freisetzung wenig beeinflusste. Im Vergleich zum Kontrollversuch war die Freisetzung unter Tubocurarin zwar etwas geringer (Abb. 72 B; AUC bei der zweiten Stimulation in Anwesenheit von Tubocurarin: $115\% \pm 15\%$ von der ersten Stimulation ohne Tubocurarin), es ergab sich aber kein signifikanter Unterschied. N-Cholinozeptoren scheinen daher an der Protonen-induzierten Freisetzung nicht nennenswert beteiligt zu sein.

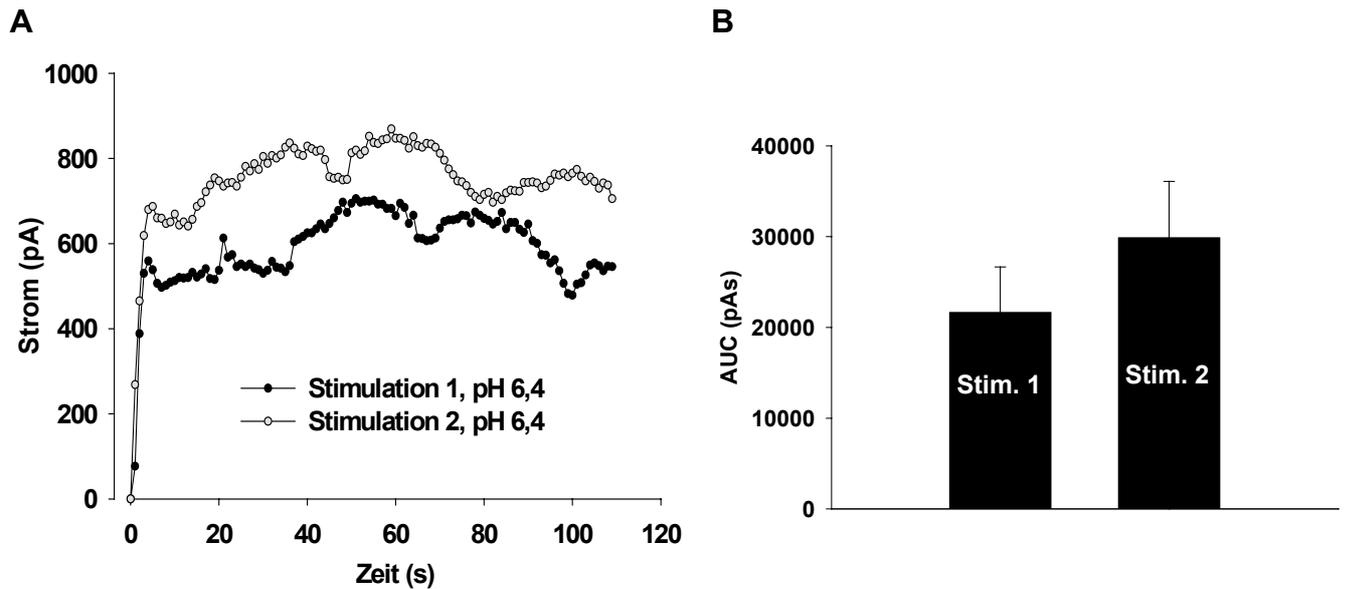
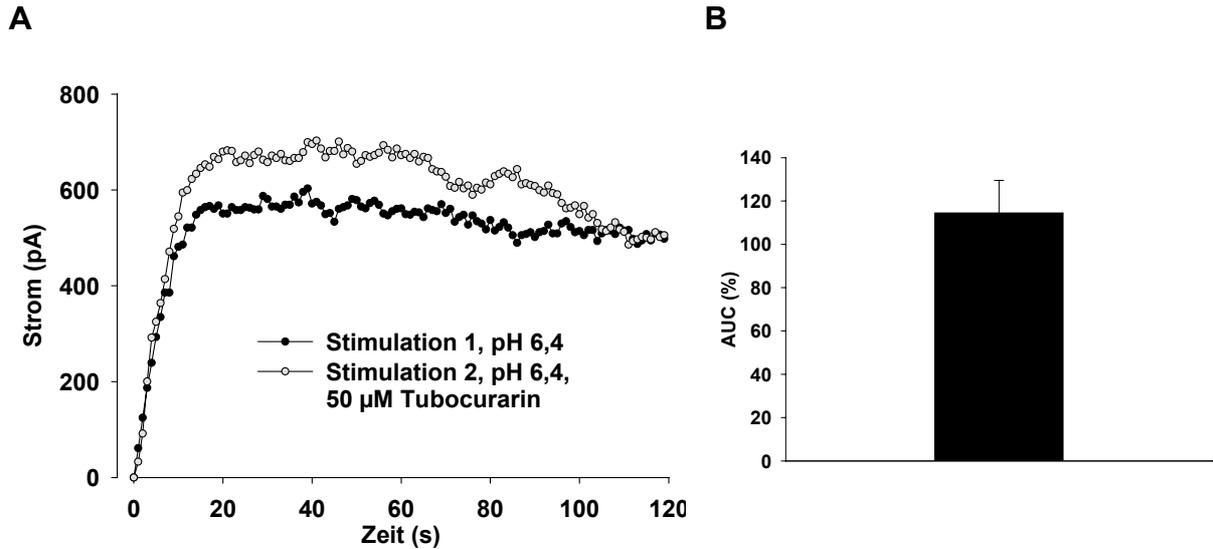


Abb. 71

Stimulation der Katecholamin-Freisetzung durch Superfusion mit Nährlösung mit pH 6,4 (Lösung F, Zusammensetzung s. Tabelle 1).

A: Einzelbeispiel des gemessenen Oxidationsstroms bei zweimaliger Stimulation (Dauer: jeweils 110 s). Die Präparate wurden zunächst mit einer Lösung mit pH 7,4 (Lösung F, Zusammensetzung s. Tabelle 1) superfundiert. Zeitpunkt 0 entspricht dem Beginn der Superfusion mit Nährlösung mit pH 6,4. Zwischen den beiden Stimulationen lag eine 10-minütige Pause, in der kontinuierlich mit Nährlösung mit pH 7,4 superfundiert wurde.

B: Mittelwerte der Fläche unter der Kurve (AUC) im Zeitraum 0 s bis 50 s ($n = 4$) bei erster und zweiter Stimulation.

**Abb. 72**

Wirkung von 50 µM Tubocurarin auf die Stimulation mit Nährlösung mit pH 6,4.

A: Einzelbeispiel des gemessenen Oxidationsstroms. Bei der zweiten Stimulation war Tubocurarin anwesend. Zwischen den beiden Stimulationen lag eine 10-minütige Pause, in der zunächst mit Nährlösung mit pH 7,4 (Zusammensetzung s. Tabelle 1, Lösung F) und in den letzten 3 Minuten mit einer Lösung, die 50 µM Tubocurarin enthielt, superfundiert wurde.

B: Prozentuale Auswertung der AUC im Zeitraum 0 s bis 50 s ($n = 6$). Die Werte der zweiten Stimulation wurden auf die Werte der ersten Stimulation bezogen.

Die AUC betrug 410087 pAs \pm 7687 pAs (erste Stimulation ohne Tubocurarin) und 45528 pAs \pm 8711 pAs (zweite Stimulation mit Tubocurarin).

3.3.1.8 Zusammenfassung

Vorversuche mit definierten Konzentrationen Adrenalin und Noradrenalin zeigten, dass es mit der hier etablierten Methode der Voltammetrie möglich ist, die Konzentration von Katecholaminen zu bestimmen. Zwischen Adrenalin und Noradrenalin kann dabei nicht unterschieden werden. Im untersuchten Konzentrationsbereich ist die Beziehung zwischen der Katecholamin-Konzentration und dem maximalen Oxidations-Strom linear.

An Nebennieren-Schnitten konnte durch Erhöhung der K^+ -Konzentration, durch Carbachol, durch DMPP und durch Absenkung des pH-Wertes eine messbare Freisetzung von Katecholaminen induziert werden. Sowohl die Carbachol- als auch die DMPP-induzierte Freisetzung konnte durch Tubocurarin deutlich verringert werden. Oxotremorin führte dagegen kaum zu einer Freisetzung. Dies weist auf eine wichtige Rolle der N-Cholinozeptoren und eine eher untergeordnete Rolle der M-Cholinozeptoren bei der Katecholamin-Freisetzung am Nebennierenmark hin.

Durch zweimalige Stimulation am gleichen Präparat können Schwankungen in der Messung, die z.B. durch die Elektroden-Parameter oder durch unterschiedliche Positionen der Elektrode am Schnitt zustande kommen, ausgeglichen werden. Dabei wurde bei der zweiten Stimulation mit Kalium, Carbachol und DMPP annähernd der Wert der ersten Stimulation erreicht. Bei der durch pH 6,4 induzierten Freisetzung

kam es dagegen zu einer leichten Steigerung gegenüber der ersten Stimulation (Abb. 73). Mit diesen Versuchen wurde eine Basis zur Untersuchung der Wirkung verschiedener Substanzen auf die Freisetzung am Nebennierenmark geschaffen.

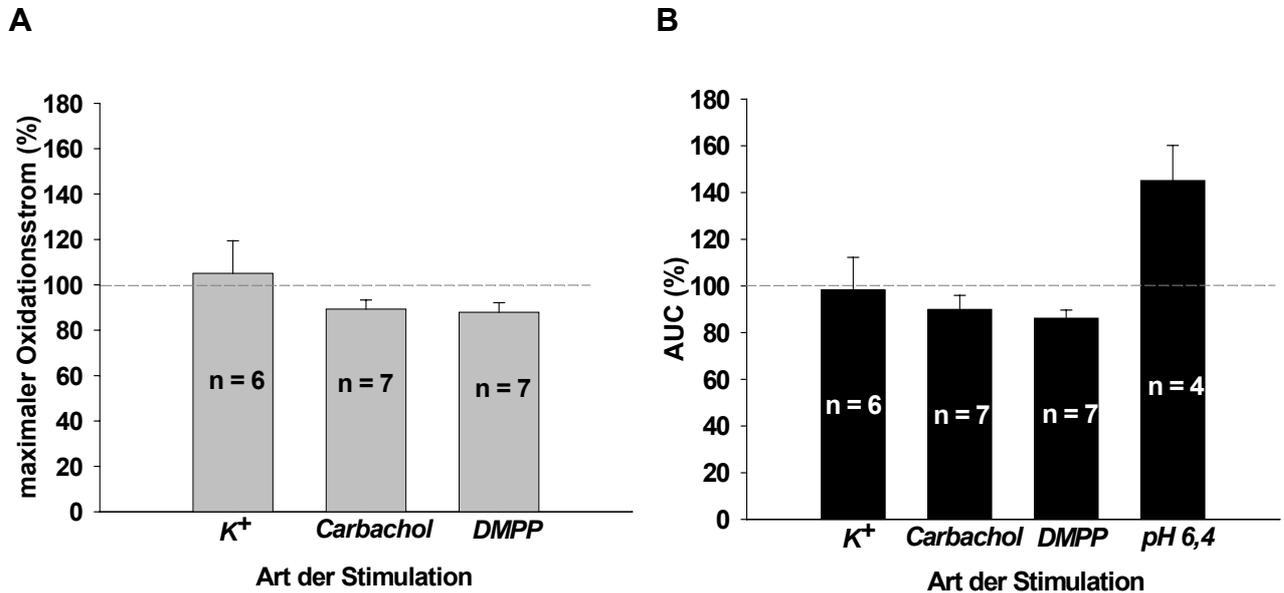


Abb. 73

Zusammenfassung der Ergebnisse bei zweimaliger Stimulation mit 116 mM K^+ , 1 mM Carbachol, 20 μ M DMPP und Absenkung des pH-Wertes auf pH 6,4. Dargestellt ist der Mittelwert des maximalen Oxidationsstroms (A) und der AUC im Zeitraum 0 s bis 50 s (B) der zweiten Stimulation bezogen auf die Werte der ersten Stimulation. Da es bei der durch Absenkung des extrazellulären pH-Wertes induzierten Freisetzung nicht zu einem Peak-artigen Anstieg der Freisetzung kam, wurde hier nur die AUC ausgewertet.

3.3.2 Veratrum-Alkaloide

3.3.2.1 Veratridin

Bereits die Versuche am Ductus deferens wiesen darauf hin, dass Veratridin die Katecholamin-Freisetzung erhöht. In der vorliegenden Untersuchung sollte überprüft werden, ob dies auch am Nebennierenmark stattfindet. Dazu wurde die Katecholamin-Freisetzung am Nebennierenmark direkt voltammetrisch bestimmt. Da mit einer Konzentration von 0,5 μ M am Ductus deferens der größte Effekt erzielt wurde, wurde diese Konzentration auch für die folgenden Versuche gewählt.

Veratridin alleine konnte keine Freisetzung induzieren (Abb. 74). Der maximale Oxidationsstrom (209 ± 79 pA) und die AUC (4887 ± 2317 pAs) unterschieden sich nicht wesentlich von den entsprechenden Werten bei reinem Wechsel der Superfusions-Lösung ohne Substanz (Abb. 64). Bei Stimulation mit Kalium kam es unter dem Einfluss von Veratridin wie am Ductus deferens zu einer Erhöhung der Freisetzung (Abb. 75). Der maximale Oxidationsstrom mit 0,5 μ M Veratridin betrug $148\% \pm 18\%$ ($p < 0,05$ im Vergleich zur ersten Stimulation) und die AUC betrug $141\% \pm 27\%$ (n. s. im Vergleich zur ersten Stimulation) von der ersten Stimulation

ohne Veratridin. Das ergibt eine Steigerung der AUC und des maximalen Oxidationsstroms jeweils um 43% gegenüber den Kontrollwerten (zweimalige Stimulation nur mit Kalium). Von den Kontrollwerten unterscheidet sich die prozentuale Steigerung der Freisetzung (maximaler Oxidationsstrom und AUC) allerdings nicht signifikant (p-Werte: 0,06 und 0,15).

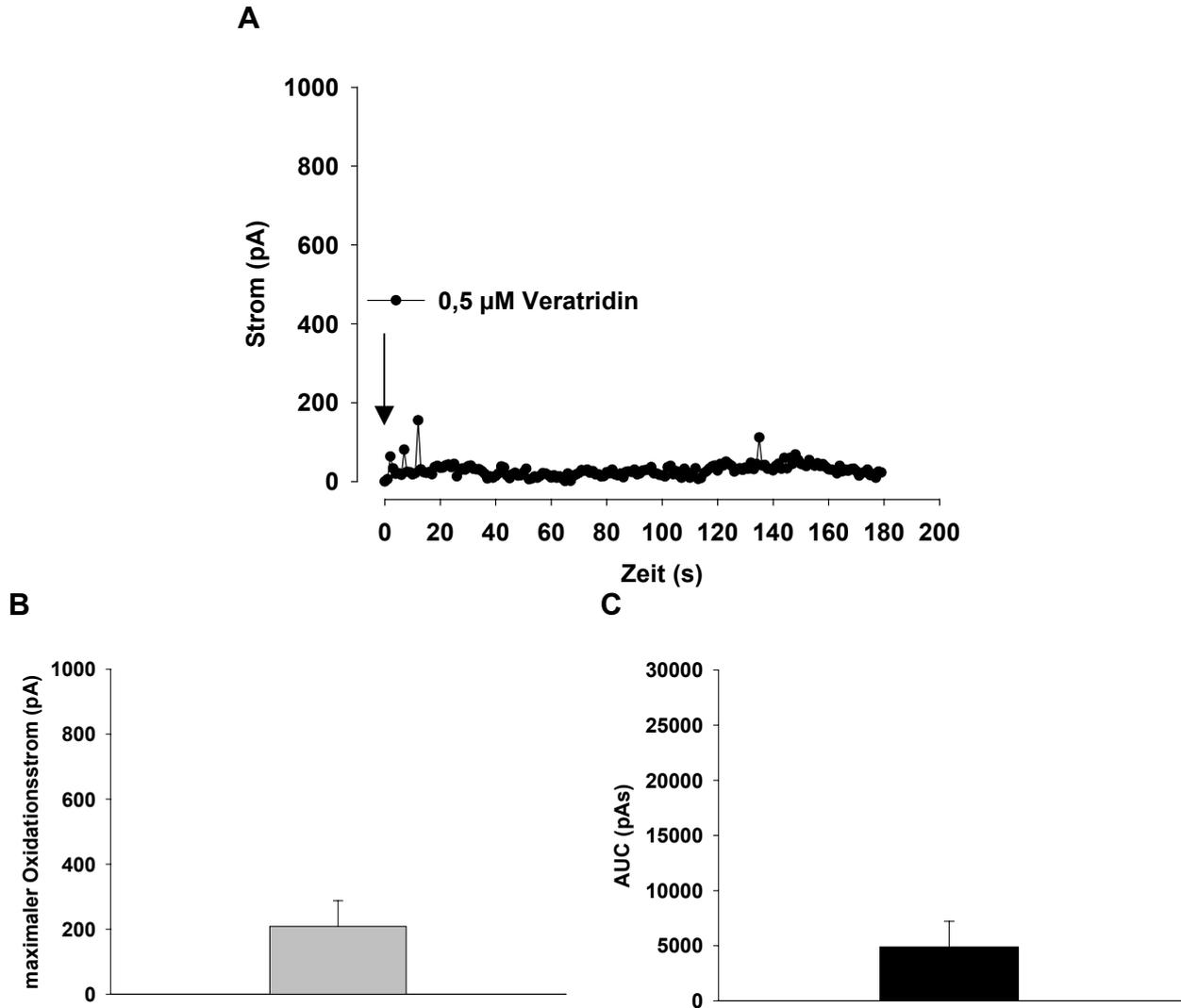


Abb. 74

A: Einzelbeispiel des gemessenen Oxidationsstroms bei Stimulation mit 0,5 μM Veratridin alleine. Zeitpunkt 0 entspricht dem Beginn der Superfusion mit Veratridin.
B: Mittelwert des maximalen Oxidationsstroms aus 6 Versuchen.
C: Mittelwert der AUC im Zeitraum 0 s bis 50 s aus 6 Versuchen.

Bei Stimulation mit Carbachol und DMPP kam es dagegen zu einer deutlichen Hemmung der Freisetzung durch 0,5 μM Veratridin (Abb. 75). Der maximale Oxidationsstrom war bei Stimulation mit Carbachol um 44% und bei Stimulation mit DMPP um 19% gegenüber den Kontrollwerten reduziert. Die AUC wurde bei Stimulation mit Carbachol um 46% und bei Stimulation mit DMPP um 33% gegenüber den Kontrollwerten vermindert.

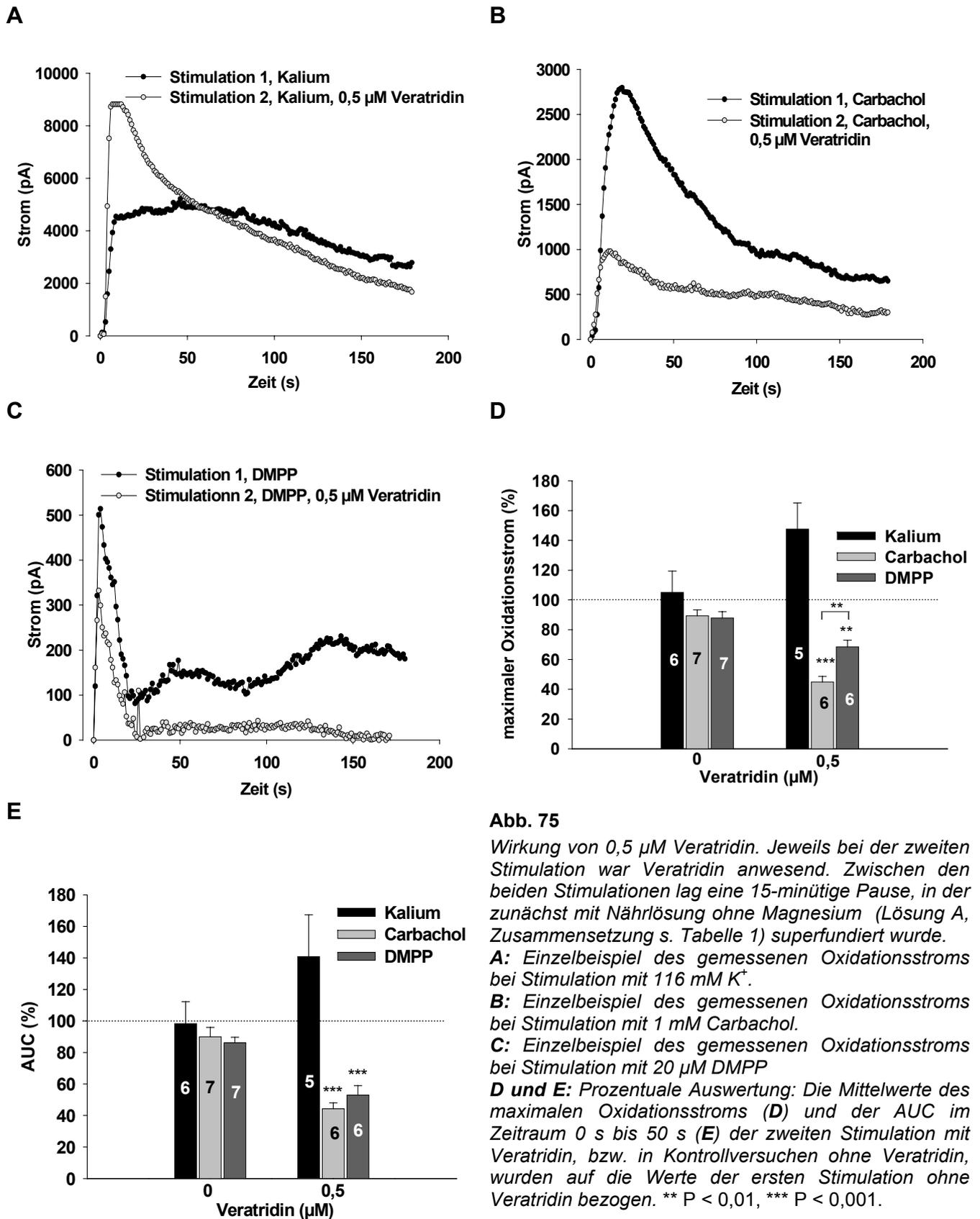


Abb. 75

Wirkung von 0,5 μM Veratridin. Jeweils bei der zweiten Stimulation war Veratridin anwesend. Zwischen den beiden Stimulationen lag eine 15-minütige Pause, in der zunächst mit Nährlösung ohne Magnesium (Lösung A, Zusammensetzung s. Tabelle 1) superfundiert wurde.

A: Einzelbeispiel des gemessenen Oxidationsstroms bei Stimulation mit 116 mM K^+ .

B: Einzelbeispiel des gemessenen Oxidationsstroms bei Stimulation mit 1 mM Carbachol.

C: Einzelbeispiel des gemessenen Oxidationsstroms bei Stimulation mit 20 μM DMPP

D und E: Prozentuale Auswertung: Die Mittelwerte des maximalen Oxidationsstroms (**D**) und der AUC im Zeitraum 0 s bis 50 s (**E**) der zweiten Stimulation mit Veratridin, bzw. in Kontrollversuchen ohne Veratridin, wurden auf die Werte der ersten Stimulation ohne Veratridin bezogen. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

	Kalium	Carbachol	DMPP
Max. Strom (pA), 1. Stim.	2731 ± 1108	2372 ± 7331	691 ± 89
Max. Strom (pA), 2. Stim., Veratridin	3645 ± 1622	1045 ± 330	464 ± 54
AUC (pAs), 1. Stim.	92068 ± 39697	76016 ± 23451	17412 ± 3834
AUC (pAs), 2. Stim., Veratridin	107694 ± 39697	35601 ± 12229	9884 ± 2943

Tabelle 11

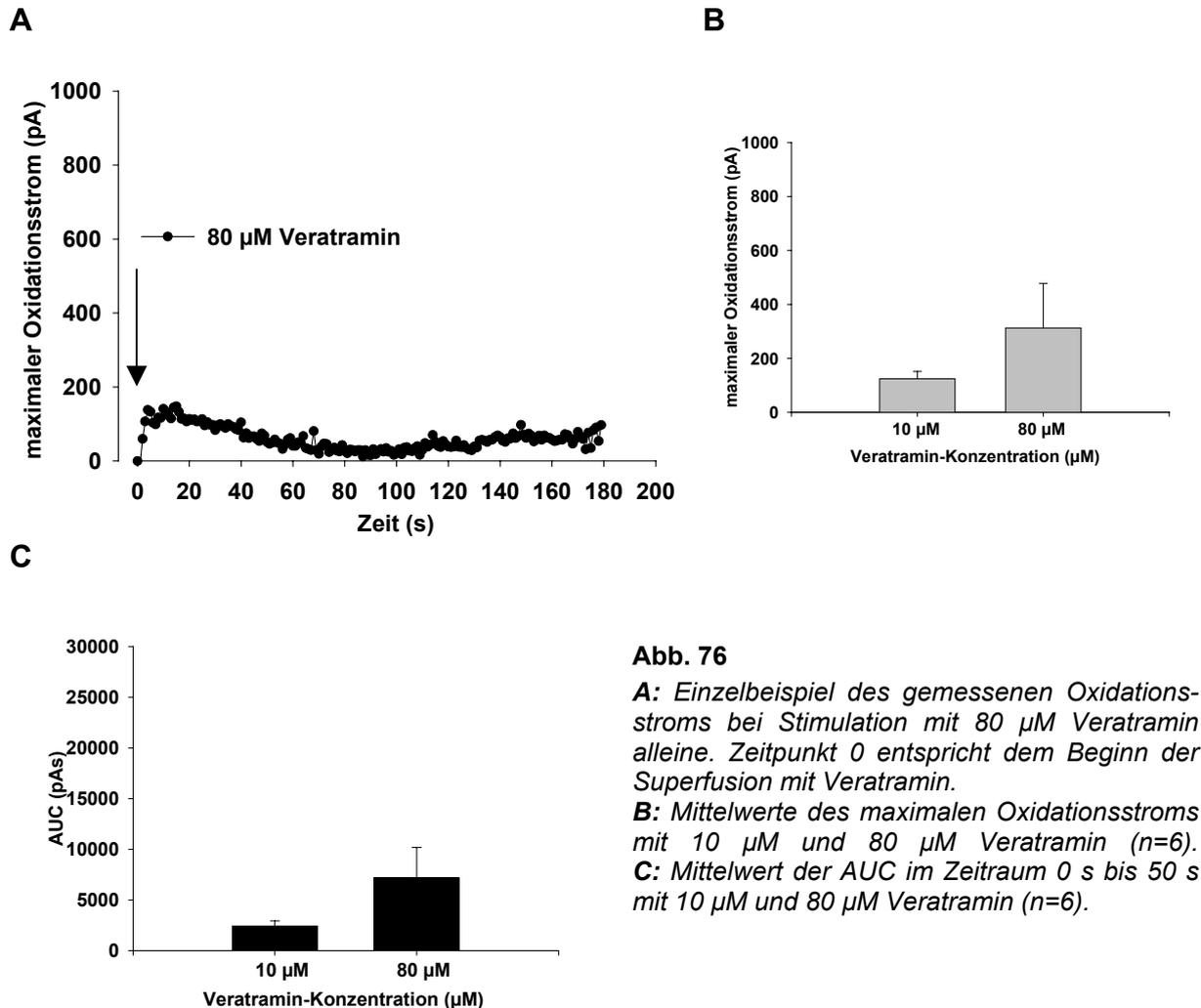
Übersicht über die Absolutwerte bei den Versuchen mit 0,5 µM Veratridin.

3.3.2.2 Veratramin

Veratramin führte am Ductus deferens zunächst zu einer leichten Erhöhung der elektrisch induzierten Kontraktionskraft, die erst bei höheren Konzentrationen reduziert wurde. Die Neurotransmitter-Freisetzung wurde zunächst nicht beeinflusst, dann aber vermindert. Bei 10 µM Veratramin war die elektrisch induzierte Kontraktionskraft erhöht, die Neurotransmitter-Freisetzung dagegen bereits leicht reduziert. Mit 80 µM dagegen war die elektrisch induzierte Kontraktionskraft vermindert. Die Neurotransmitter-Freisetzung war ebenfalls vermindert. Betrachtet man allerdings den Verlauf der Wirkungskurve insgesamt, verringerte sich die Wirkung auf die Freisetzung mit steigenden Konzentrationen (vgl. Abb. 48 A). Aus diesem Grund wurden am Nebennierenmark die Konzentrationen 10 µM und 80 µM untersucht.

Zunächst wurde wie bei Veratridin die Wirkung von Veratramin alleine überprüft. Hier ergab sich kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollwerten mit Nährlösung alleine (Abb. 76). Bei 10 µM war der maximale Oxidationsstrom (124 pA ± 27 pA) und die AUC (2422 pAs ± 516 pAs) allerdings im Vergleich zu den Werten mit 80 µM (max. Oxidationsstrom 124 pA ± 27pA und AUC 7176 pAs ± 3002 pAs) und zu den Kontrollwerten (max. Oxidationsstrom 231 pA ± 72 pA und AUC 3794 pAs ± 737 pAs, vgl. Abb. 64) leicht vermindert. 10 µM Veratramin könnten hier auch die geringe Freisetzung, die durch die mechanische Belastung des Präparates beim Umschalten der Superfusionslösungen entsteht, beeinflussen. Mit 80 µM war dieser Effekt nicht zu beobachten. Im Gegenteil waren die Werte hier sogar etwas erhöht.

Bei Kalium-induzierter Freisetzung war der hemmende Effekt mit 10 µM Veratramin deutlich stärker ausgeprägt als mit

**Abb. 76**

A: Einzelbeispiel des gemessenen Oxidationsstroms bei Stimulation mit 80 µM Veratramin alleine. Zeitpunkt 0 entspricht dem Beginn der Superfusion mit Veratramin.

B: Mittelwerte des maximalen Oxidationsstroms mit 10 µM und 80 µM Veratramin (n=6).
C: Mittelwert der AUC im Zeitraum 0 s bis 50 s mit 10 µM und 80 µM Veratramin (n=6).

80 µM (Abb. 77). Die AUC wurde um 43% (10 µM) und um 25% (80 µM) reduziert, der maximale Oxidationsstrom um 43% (10 µM) und um 21% (80 µM). Auch die DMPP induzierte Freisetzung wurde durch 10 µM Veratramin gehemmt. Dies drückte sich allerdings nur in einer Verminderung der AUC aus (um 31% gegenüber der Kontrolle), der maximale Oxidationsstrom wurde dagegen nicht beeinflusst.

Wie am Ductus deferens wurde die Freisetzung am Nebennieren-Mark durch 10 µM Veratramin vermutlich durch die Hemmung von Calcium-Kanälen reduziert. Dabei wurde die Kalium- und DMPP-induzierte Freisetzung ähnlich beeinflusst. Bei Kalium induzierter Freisetzung wurde zusätzlich die Wirkung von 80 µM Veratramin untersucht, die weniger stark ausgeprägt war als die Wirkung von 10 µM. Im Vergleich zum Ductus deferens war die Wirkung von 10 µM stärker und die Wirkung von 80 µM schwächer ausgeprägt. Allerdings kam es auch am Ductus deferens ab 30 µM Veratramin mit steigender Konzentration zu einer Abnahme der Wirkung auf die Freisetzung.

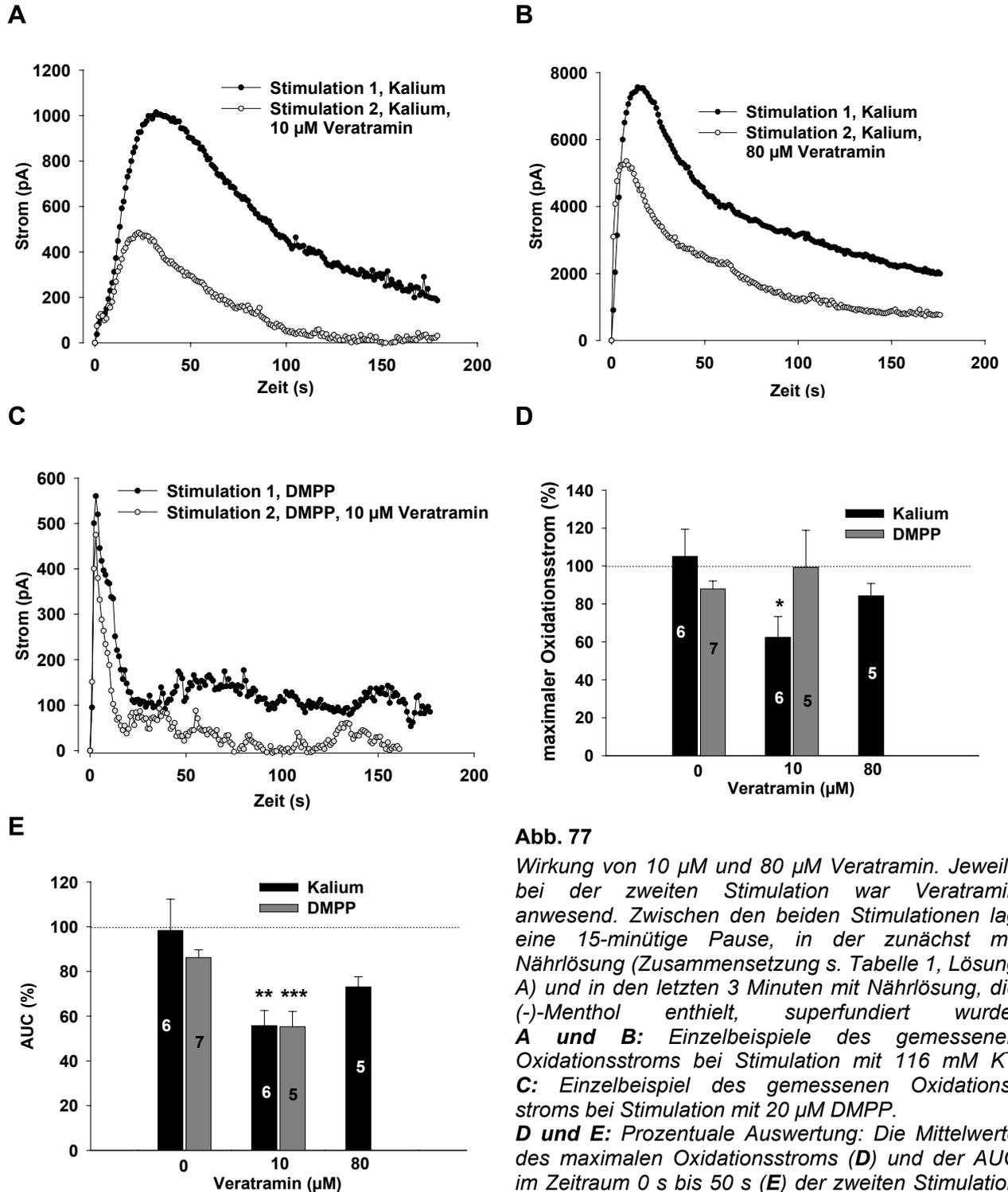


Abb. 77

Wirkung von 10 μ M und 80 μ M Veratramin. Jeweils bei der zweiten Stimulation war Veratramin anwesend. Zwischen den beiden Stimulationen lag eine 15-minütige Pause, in der zunächst mit Nährlösung (Zusammensetzung s. Tabelle 1, Lösung A) und in den letzten 3 Minuten mit Nährlösung, die (-)-Menthol enthielt, superfundiert wurde. **A und B:** Einzelbeispiele des gemessenen Oxidationsstroms bei Stimulation mit 116 mM K^+ . **C:** Einzelbeispiel des gemessenen Oxidationsstroms bei Stimulation mit 20 μ M DMPP.

D und E: Prozentuale Auswertung: Die Mittelwerte des maximalen Oxidationsstroms (**D**) und der AUC im Zeitraum 0 s bis 50 s (**E**) der zweiten Stimulation mit Veratramin, bzw. in Kontrollversuchen ohne Veratramin, wurden auf die Werte der ersten Stimulation ohne Veratramin bezogen. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

	Kalium	DMPP
Max. Strom (pA), 1. Stim.	686 ± 157	546± 77
Max. Strom (pA), 2. Stim., 10 µM Veratramin	362 ± 60	508± 78
AUC (pAs), 1. Stim.	25494 ± 5757	10391± 1174
AUC (pAs), 2. Stim., 10 µM Veratramin	12706 ± 2341	5709± 1027
Max. Strom (pA), 1. Stim.	4649 ± 912	--
Max. Strom (pA), 2. Stim., 80 µM Veratramin	3680 ± 494	--
AUC (pAs), 1. Stim.	177318 ± 39433	--
AUC (pAs), 2. Stim., 80 µM Veratramin	125612 ± 23681	--

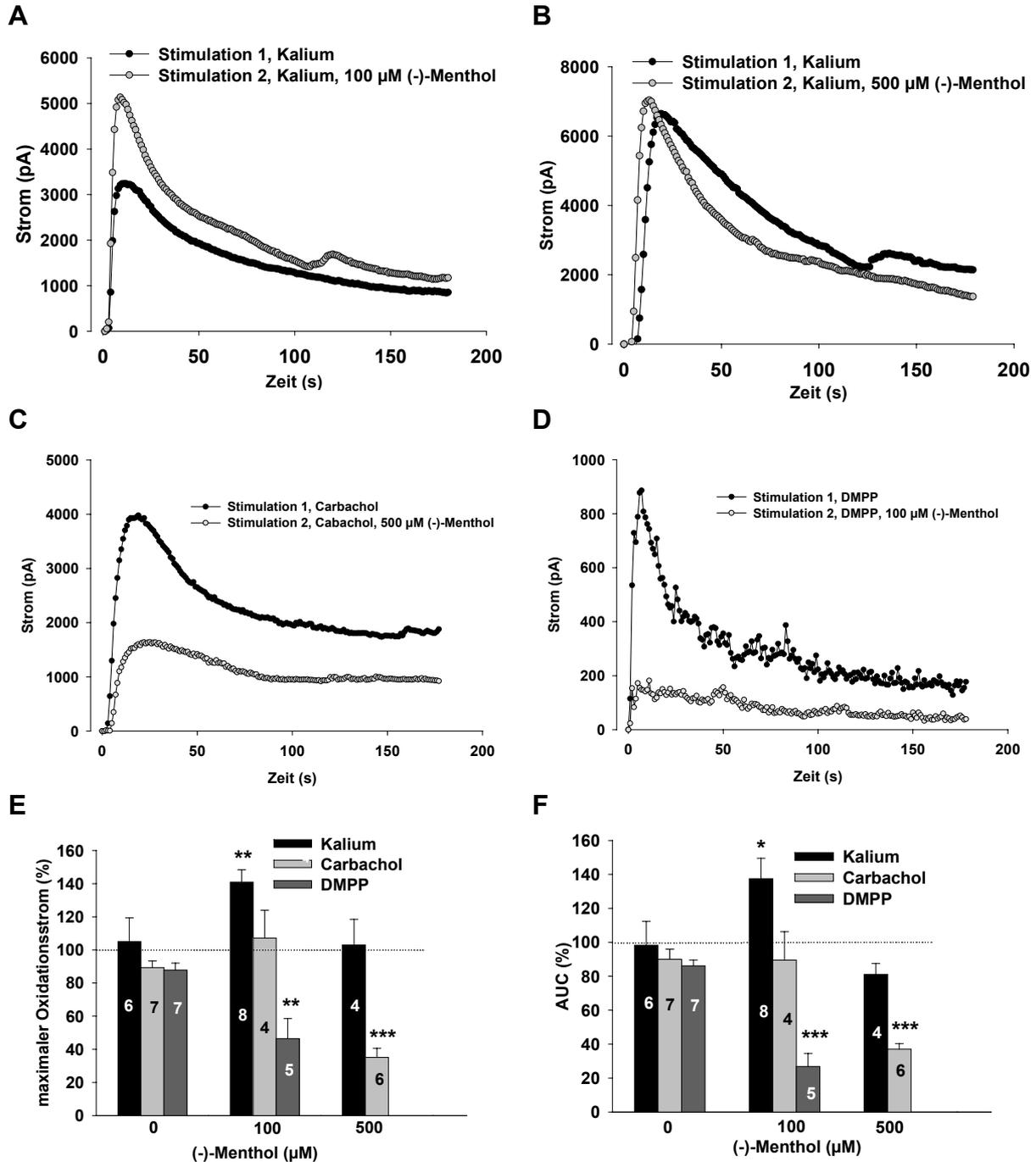
Tabelle 12

Übersicht über die Absolutwerte bei den Versuchen mit 10 µM und 80 µM Veratramin.

3.3.3 (-)-Menthol

3.3.3.1 Wirkung von (-)-Menthol

Am Ductus deferens zeigte (-)-Menthol allgemein eine hemmende Wirkung auf die Kontraktionskraft und die Freisetzung. Mit einer Konzentration von 100 µM (-)-Menthol wurde dabei die Freisetzung am stärksten reduziert. Mit 500 µM konnte fast keine elektrisch oder durch NA induzierte Kontraktion mehr beobachtet werden. Beide Konzentrationen sollten auch am Nebennierenmark untersucht werden. Dabei konnte die hemmende Wirkung des (-)-Menthols auf die Katecholamin-Freisetzung bei Stimulation mit Carbachol und DMPP bestätigt werden (Abb. 78). Allerdings wurde bei Stimulation mit DMPP die Freisetzung bereits mit 100 µM stark reduziert (max. Oxidationsstrom um 41%, AUC um 59% gegenüber dem Kontrollwert) während diese Wirkung bei Stimulation mit Carbachol erst bei einer Konzentration von 500 µM eintrat (Reduktion des max. Oxidationsstrom um 49% und der AUC um 53% gegenüber dem Kontrollwert). Dagegen wurde die Kalium-induzierte Freisetzung mit 100 µM gesteigert. Hier kam es zu einer signifikanten Erhöhung des maximalen Oxidationsstroms um 36% und der AUC um 39%. 500 µM (-)-Menthol hatten allerdings keine steigernde Wirkung mehr. Die AUC schien sogar leicht reduziert zu werden (um 17%). Es ergab sich dafür allerdings kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollwerten.

**Abb. 78**

Wirkung von 100 μM und 500 μM (-)-Menthol. Jeweils bei der zweiten Stimulation war (-)-Menthol anwesend. Zwischen den beiden Stimulationen lag eine 15-minütige Pause, in der zunächst mit Nährlösung (Zusammensetzung s. Tabelle 1, Lösung A) und in den letzten 3 Minuten mit Nährlösung, die (-)-Menthol enthielt, superfundiert wurde.

A, B, C und D: Einzelbeispiele des gemessenen Oxidationsstroms bei Stimulation mit 116 mM K^+ , 1 mM Carbachol und 20 μM DMPP.

E und F: Prozentuale Auswertung: Die Mittelwerte des maximalen Oxidationsstroms (D) und der AUC im Zeitraum 0 s bis 50 s (E) der zweiten Stimulation mit (-)-Menthol, bzw. in Kontrollversuchen ohne (-)-Menthol, wurden auf die Werte der ersten Stimulation ohne (-)-Menthol bezogen.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

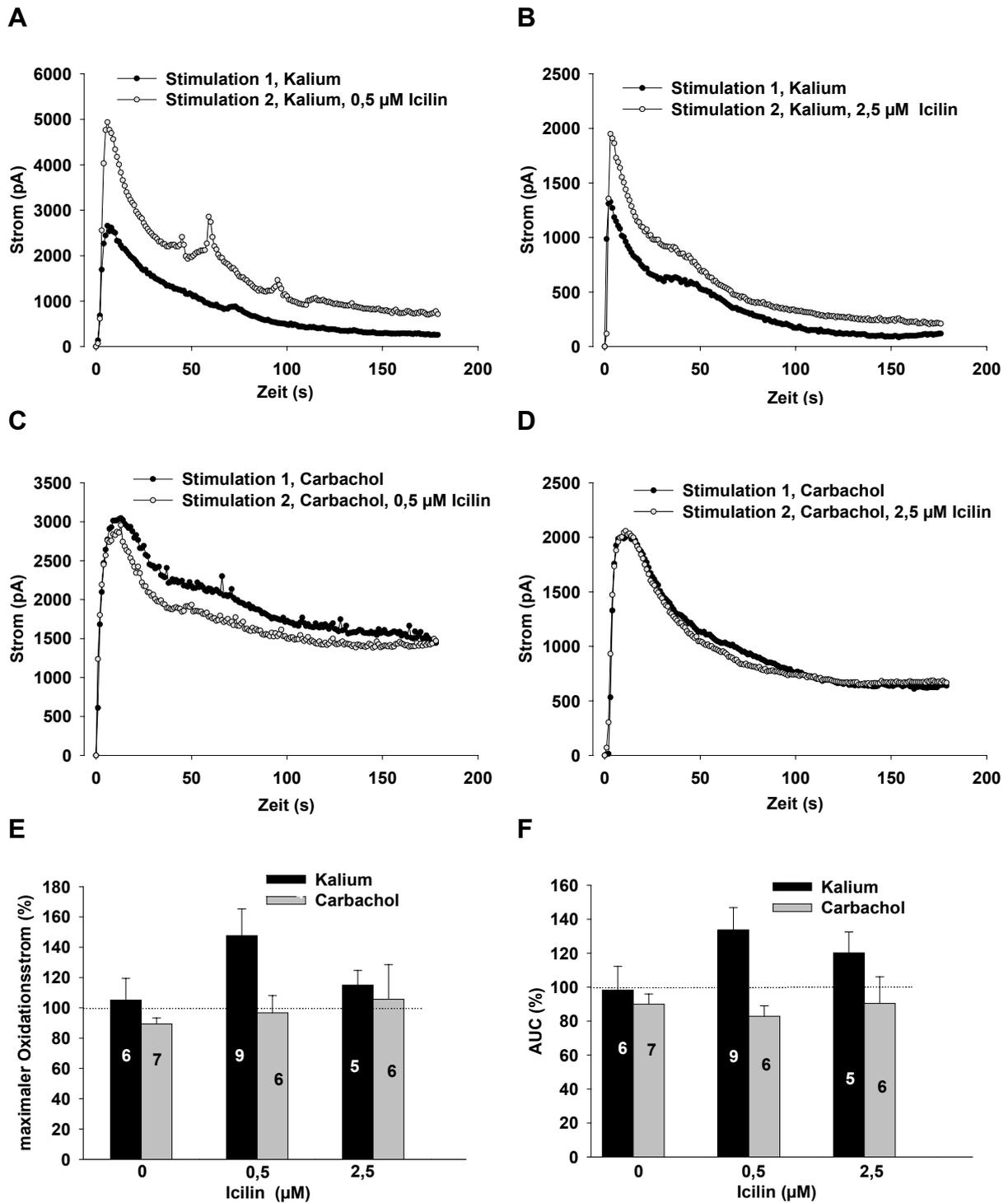
	Kalium	Carbachol	DMPP
Max. Strom (pA), 1. Stim.	4473 ± 1531	1422 ± 369	472 ± 135
Max. Strom (pA), 2. Stim., 100 µM (-)-Menthol	6177 ± 2032	1359 ± 198	159 ± 13
AUC (pAs), 1. Stim.	159335 ± 65353	50506 ± 14172	14183 ± 4046
AUC (pAs), 2. Stim., 100 µM (-)-Menthol	207046 ± 79560	40587 ± 8546	3317 ± 1052
Max. Strom (pA), 1. Stim.	5534 ± 795	3381 ± 680	--
Max. Strom (pA), 2. Stim., 500 µM (-)-Menthol	5420 ± 604	1319 ± 310	--
AUC (pAs), 1. Stim.	187398 ± 34126	123623 ± 29158	--
AUC (pAs), 2. Stim., 500 µM (-)-Menthol	154112 ± 33233	46657 ± 12288	--

Tabelle 13

Übersicht über die Absolutwerte bei den Versuchen mit 100 µM und 500 µM (-)-Menthol.

3.3.3.2 Vergleich mit der Wirkung von Icilin

Im Folgenden sollte auch am Nebennierenmark die Wirkung des TRPM8- und TRPA1-Agonisten Icilin untersucht werden, um weitere Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung der Freisetzung durch Modulation von TRP-Kanälen zu erhalten. Am Ductus deferens war die Wirkung von Icilin auf die Neurotransmitter-Freisetzung mit der Wirkung von (-)-Menthol vergleichbar. Beide Substanzen hemmten die Freisetzung. Auch am Nebennierenmark war die Wirkung beider Substanzen auf die Kalium-induzierte Freisetzung vergleichbar. Allerdings kam es, anders als am Ductus deferens, sowohl mit Icilin als auch mit (-)-Menthol zu einer Steigerung der Freisetzung. 0,5 µM Icilin erhöhte den maximalen Oxidationsstrom um 43% und die AUC um 36% gegenüber den Kontrollwerten (Abb. 79). Der Unterschied war allerdings nicht signifikant, es ergaben sich p-Werte von 0,08 und 0,1. Mit 2,5 µM Icilin war die Freisetzung zwar immer noch leicht erhöht, die Wirkung war aber geringer als mit 0,5 µM (Abb. 79 B). Das entspricht tendenziell der Wirkung von (-)-Menthol, welches in einer Konzentration von 500 µM die Kalium-induzierte Freisetzung nicht beeinflusste. Auf die Stimulation mit Carbachol zeigte Icilin allerdings, anders als (-)-Menthol, keine Wirkung (Abb. 79 C und D).

**Abb. 79**

Wirkung von 0,5 μM und 2,5 μM Icilin. Jeweils bei der zweiten Stimulation war Icilin anwesend. Zwischen den beiden Stimulationen lag eine 15-minütige Pause, in der zunächst mit Nährlösung (Zusammensetzung s. Tabelle 1, Lösung A) und in den letzten 3 Minuten mit Nährlösung, die Icilin enthielt, superfundiert wurde.

A, B, C und D: Einzelbeispiele des gemessenen Oxidationsstroms bei Stimulation mit 116 mM K^+ und 1 mM Carbachol.

E und F: Prozentuale Auswertung: Die Mittelwerte des maximalen Oxidationsstroms (E) und der AUC im Zeitraum 0 s bis 50 s (F) der zweiten Stimulation mit Icilin, bzw. in Kontrollversuchen ohne Icilin, wurden auf die Werte der ersten Stimulation ohne Icilin bezogen.

	Kalium	Carbachol
Max. Strom (pA), 1. Stim.	2318 ± 436	2554 ± 693
Max. Strom (pA), 2. Stim., 0,5 µM Icilin	3352 ± 649	2295 ± 518
AUC (pAs), 1. Stim.	78953 ± 17784	102720 ± 29621
AUC (pAs), 2. Stim., 0,5 µM Icilin	105428 ± 24403	83240 ± 21938
Max. Strom (pA), 1. Stim.	1234 ± 134	2079 ± 438
Max. Strom (pA), 2. Stim., 2,5 µM Icilin	1391 ± 144	2046 ± 425
AUC (pAs), 1. Stim.	42448 ± 4851	70854 ± 13137
AUC (pAs), 2. Stim., 2,5 µM Icilin	49511 ± 4321	59986 ± 9985

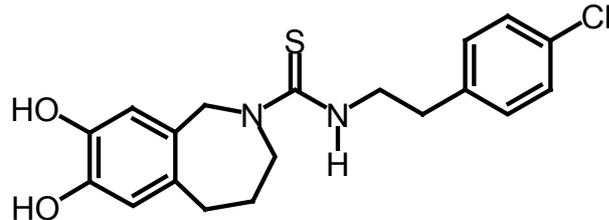
Tabelle 14

Übersicht über die Absolutwerte bei den Versuchen mit 0,5 µM und 2,5 µM Icilin.

3.3.3.3 Einfluss von Capsazepin auf die (-)-Menthol-Wirkung

Abb. 80

Strukturformel von Capsazepin



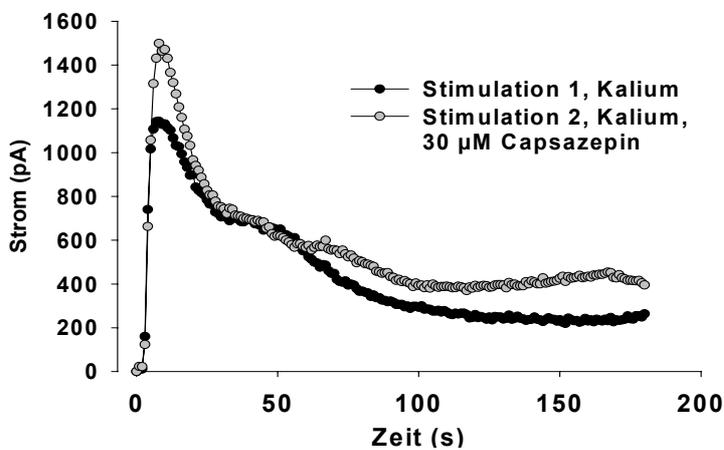
Der TRPM8- und TRPA1-Agonist Icilin zeigte sowohl auf die Kalium-induzierte Freisetzung am Nebennierenmark als auch auf die elektrisch induzierte Freisetzung am Ductus deferens ähnliche Wirkungen

wie (-)-Menthol. Umgekehrt sollte nun am Nebennierenmark der Einfluss eines Antagonisten am TRPM8-Kanal auf die (-)-Menthol-Wirkung bei Kalium-induzierter Freisetzung untersucht werden. Dazu wurde das synthetische Capsaicin-Analogen Capsazepin (Abb. 80) verwendet. Capsazepin ist ein Antagonist von Capsaicin (Bevan *et al.*, 1992), hemmt aber nach Behrendt *et al.* (2004) in einer Konzentration von 30 µM auch die(-)-Menthol-induzierte Aktivierung des TRPM8-Kanals. Falls die Steigerung der Kalium-induzierten Freisetzung durch (-)-Menthol TRPM8-abhängig ist, sollte sie durch 30 µM Capsazepin unterdrückt werden.

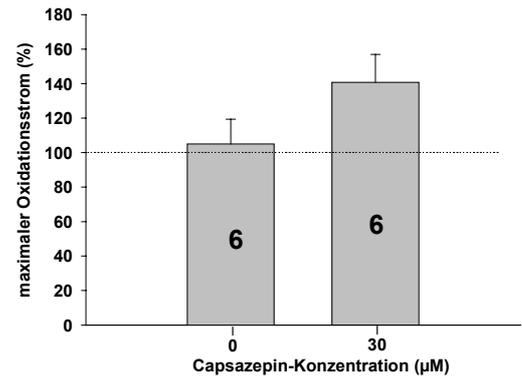
Capsazepin beeinflusst allerdings auch andere Ionenkanäle: Zum einen kann es N-Cholinozeptoren inhibieren (Liu *et al.*, 1997), zum anderen zeigte es eine hemmende Wirkung auf spannungsabhängige Calcium-Kanäle an sensorischen Neuronen (Docherty *et al.*, 1997). Bei der Stimulation mit Kalium sollten N-Cholinozeptoren jedoch nicht beeinflusst werden. Außerdem trat die Hemmung von Calcium-Kanälen erst bei sehr hohen Konzentrationen (100 µM) und stark zeitverzögert auf. Erst nach 1 Minute Dauer-Applikation von Capsazepin zeigten sich Effekte. Eine Applikation von 30 s führte zu keiner Hemmung des Calcium-Stroms (Docherty *et al.*, 1997). Da in den folgenden Versuchen niedrige Konzentrationen (30 µM) verwendet wurden, sollte die unspezifische Wirkung von Capsazepin unerheblich sein.

Um eine Hemmung der Freisetzung durch Capsazepin auszuschließen, wurde zunächst dessen Wirkung alleine untersucht. Abb. 81 zeigt, dass 30 μM Capsazepin die Kalium-induzierte Katecholamin-Freisetzung nicht reduzierte. Im Gegenteil kam es sogar zu einer leichten Steigerung des maximalen Oxidationsstroms um 36% und der AUC um 22% gegenüber dem Kontrollwert (nicht signifikant). Unter den gewählten Versuchsbedingungen sollte es also nicht zu einer Hemmung von N-Cholinozeptoren oder spannungsabhängigen Calcium-Kanälen durch Capsazepin kommen.

A



B



C

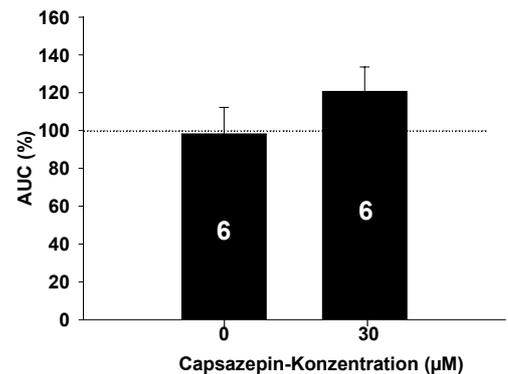


Abb. 81

Wirkung von 30 μM Capsazepin auf die Stimulation mit 116 mM K^+ .

A: Einzelbeispiel des gemessenen Oxidationsstroms. Bei der zweiten Stimulation war Capsazepin anwesend. Zwischen den beiden Stimulationen lag eine 15-minütige Pause, in der zunächst mit Nährlösung (Lösung A, Zusammensetzung s. Tabelle 1) und in den letzten 3 Minuten mit Nährlösung, die 30 μM Capsazepin enthielt, superfundiert wurde.

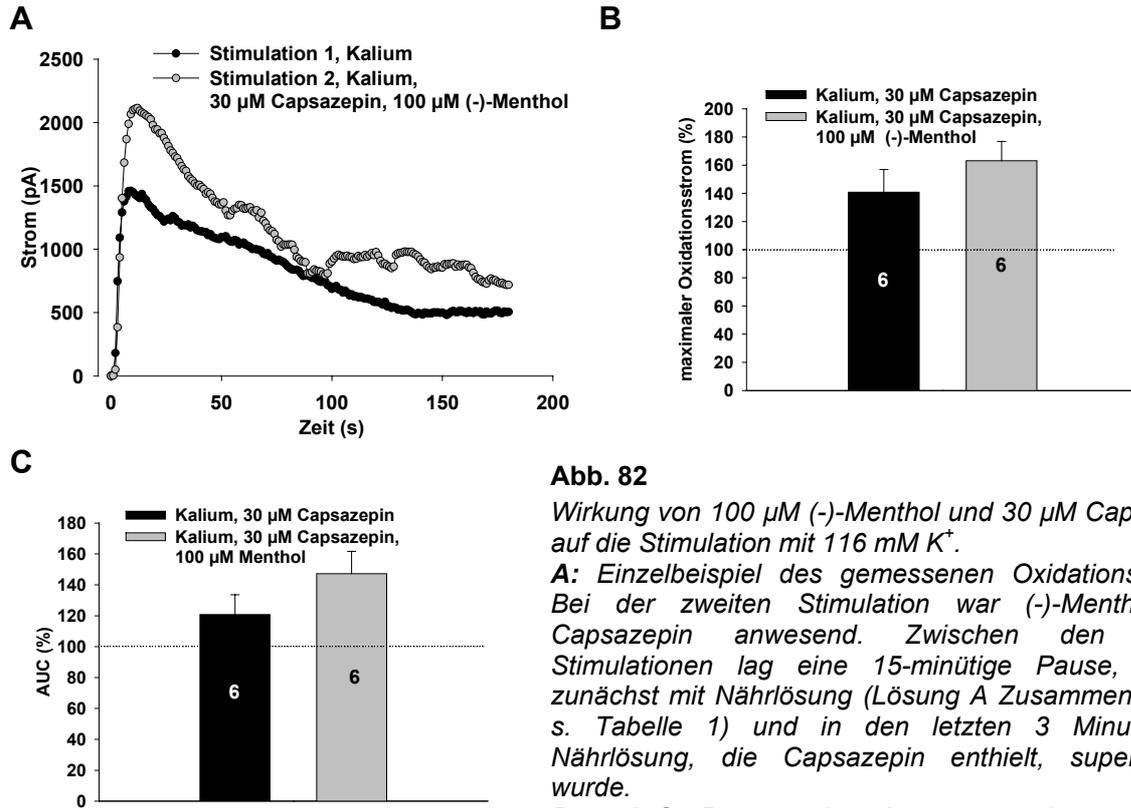
B und C: Prozentuale Auswertung des maximalen Oxidationsstroms und der AUC im Zeitraum 0 s bis 50 s ($n = 6$). Die Werte der zweiten Stimulation wurden auf die Werte der ersten Stimulation bezogen.

	Kalium
Max. Strom (pA), 1. Stim.,	1698 ± 777
Max. Strom (pA), 2. Stim., 30 µM Capsazepin	1834 ± 432
AUC (pAs), 1. Stim.,	52613 ± 19422
AUC (pAs), 2. Stim., 30 µM Capsazepin	55416 ± 13011

Tabelle 15

Übersicht über die Absolutwerte bei den Versuchen mit 30 µM Capsazepin.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Capsazepin die steigernde Wirkung von (-)-Menthol auf die Stimulation mit Kalium inhibieren kann. Dazu wurde bei der ersten Stimulation die Freisetzung nur mit Kalium induziert. 3 Minuten vor der zweiten Stimulation wurde das Präparat bereits einer Konzentration von 30 µM Capsazepin ausgesetzt. Bei der zweiten Stimulation waren dann 30 µM Capsazepin und 100 µM (-)-Menthol anwesend. Abb. 81 zeigt, dass es mit Capsazepin und (-)-Menthol zusammen zu einer Erhöhung des maximalen Oxidationsstroms auf 147% ± 15% und der AUC auf 163% ± 14% von der ersten Stimulation (nur mit Kalium) kam. Gegenüber der Wirkung von Capsazepin alleine (Abb. 82) entspricht das einer Erhöhung des maximalen Oxidationsstroms um 22% und der AUC um 27%. Obwohl die (-)-Menthol-Wirkung unter dem Einfluss von Capsazepin damit zwar etwas geringer als die (-)-Menthol-Wirkung alleine war (Erhöhung des maximalen Oxidationsstroms um 36% und der AUC um 39%, vgl. Abb. 78), konnte keine eindeutige Hemmung der (-)-Menthol-induzierten Steigerung der Katecholamin-Freisetzung durch den Menthol-Antagonisten Capsazepin gefunden werden. Somit kann eine Beteiligung des TRPM8-Kanals nicht bestätigt werden.

**Abb. 82**

Wirkung von 100 µM (-)-Menthol und 30 µM Capsazepin auf die Stimulation mit 116 mM K^+ .

A: Einzelbeispiel des gemessenen Oxidationsstroms. Bei der zweiten Stimulation war (-)-Menthol und Capsazepin anwesend. Zwischen den beiden Stimulationen lag eine 15-minütige Pause, in der zunächst mit Nährlösung (Lösung A Zusammensetzung s. Tabelle 1) und in den letzten 3 Minuten mit Nährlösung, die Capsazepin enthielt, superfundiert wurde.

B und C: Prozentuale Auswertung des maximalen Oxidationsstroms und der AUC im Zeitraum 0 s bis 50 s. Zum Vergleich ist zusätzlich die Wirkung von Capsazepin alleine dargestellt (vgl. auch Abb. 81). Die Werte der zweiten Stimulation wurden auf die Werte der ersten Stimulation bezogen.

	Kalium
Max. Strom (pA), 1. Stim.,	1643 ± 342
Max. Strom (pA), 2. Stim., 30 µM Capsazepin, 100 µM (-)-Menthol	2472 ± 335
AUC (pAs), 1. Stim.	65561 ± 14860
AUC (pAs), 2. Stim., 30 µM Capsazepin, 100 µM (-)-Menthol	87963 ± 13758

Tabelle 16

Übersicht über die Absolutwerte bei den Versuchen mit 30 µM Capsazepin.

3.3.4 Magnesium

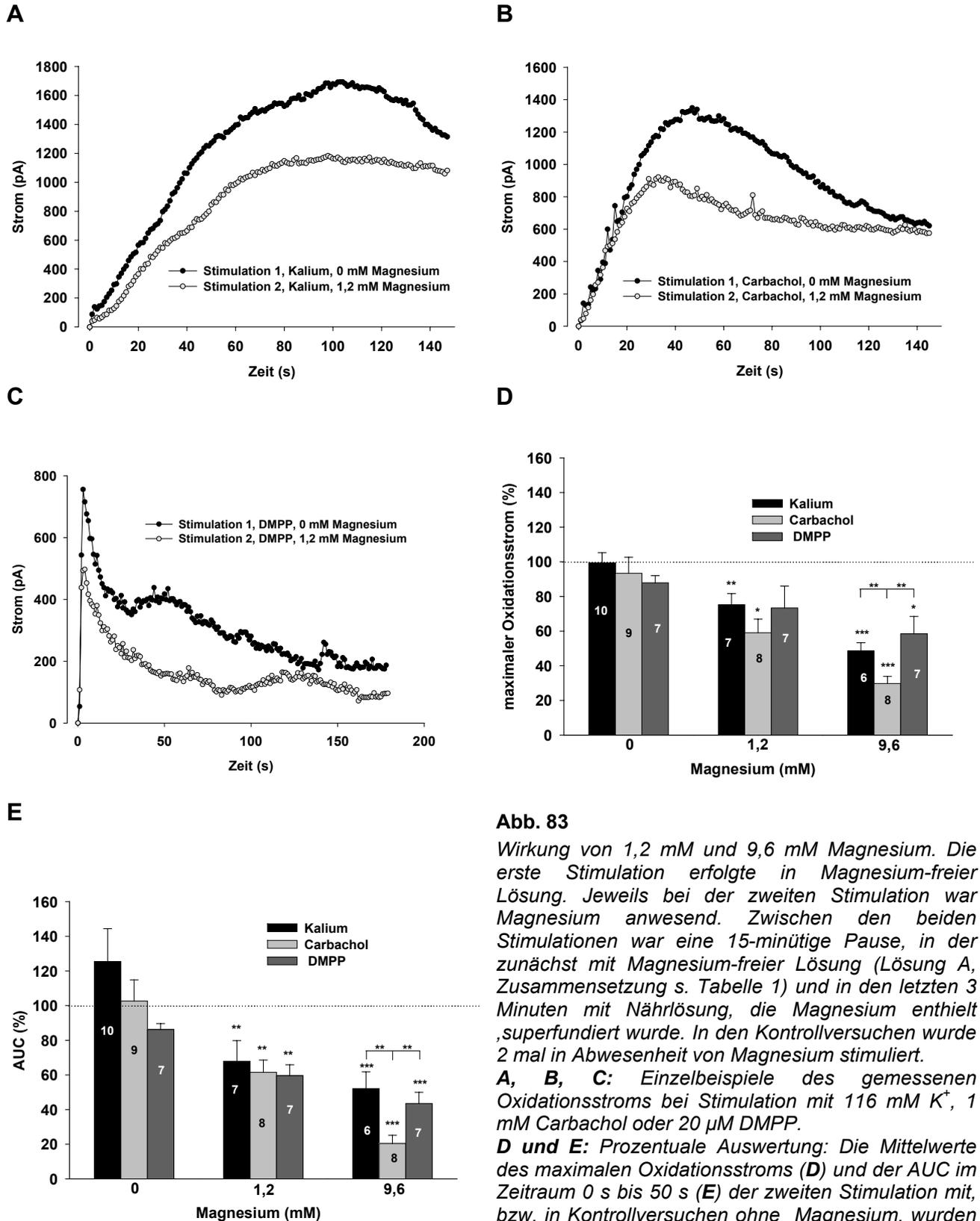
3.3.4.1 *Wirkung von Magnesium*

Bei den Versuchen mit Magnesium wurde die Stimulation der Freisetzung mit Kalium, Carbachol und DMPP induziert. Während die Stimulation mit DMPP wie bisher durch Superfusion der Stimulationslösung durchgeführt wurde, erfolgte die Stimulation mit Kalium und Carbachol unter leicht abweichenden Bedingungen. Hier befand sich der Zulauf der Stimulationslösung am Rand der Versuchskammer und die entsprechenden Lösungen wurden nicht durch Superfusion des Präparats, sondern durch Einwaschen in die Versuchs-Kammer eingebracht. Abb. 83 A und B zeigen jeweils den dabei erzielten typischen Freisetzungsverlauf. Wie bei den anderen Versuchen war das Präparat jeweils 3 Minuten lang der Stimulationslösung ausgesetzt. Allerdings war durch den Vorgang des Einwaschens der Beginn der Freisetzung etwas zeitverzögert. Erst ca. 40 s nach Öffnen des Zulaufventils der entsprechenden Stimulationslösung kam es zum Anstieg des Oxidationsstroms. Dabei war der Anstieg der Freisetzung etwas langsamer. Insgesamt war der Verlauf dem Freisetzungsverlauf bei Superfusion (vgl. Abb. 65 A und Abb. 66 A) jedoch sehr ähnlich. Auch für diesen leicht abgeänderten Versuchsaufbau wurde ein Blindwert (zweimalige Stimulation nur mit Kalium bzw. Carbachol) ermittelt, wobei sich die Ergebnisse nicht wesentlich von den Ergebnissen bei Superfusion (vgl. Abb. 65 und Abb. 66) unterschieden. Abb. 83 D zeigt, dass auch hier der maximale Oxidationsstrom bei der zweiten Stimulation annähernd 100% des maximalen Oxidationsstroms der ersten Stimulation entspricht. Die AUC der zweiten Kalium-Stimulation war, anders als bei der Stimulation mittels Superfusion, im Verhältnis zur ersten Stimulation leicht erhöht (Abb. 83 E). Vergleicht man die Kontrollwerte der Kalium-Stimulation bei Superfusion (AUC der zweiten Stimulation entspricht $98\% \pm 14\%$ der ersten Stimulation) mit den Kontrollwerten der Kalium-Stimulation bei Einwaschen (AUC der zweiten Stimulation entspricht $126\% \pm 19\%$ der ersten Stimulation) ist der Unterschied allerdings nicht signifikant (p-Wert: 0,315). Da die Stimulation mit DMPP nach dem allgemeinen Ablauf mittels Superfusion durchgeführt wurde, konnte bei den Versuchen mit DMPP der bereits zuvor erstellte Kontrollwert verwendet werden.

Am Nebennierenmark zeigte Magnesium, wie am Ductus deferens eine hemmende Wirkung auf die Freisetzung. Die Kalium-, Carbachol- und DMPP-induzierten Freisetzungen wurden bereits durch 1,2 mM Magnesium deutlich reduziert (Abb. 83 D und E). Der maximale Oxidationsstrom betrug unter dem Einfluss von 1,2 mM Magnesium nur noch $75\% \pm 6\%$ bei Stimulation mit Kalium, $59\% \pm 8\%$ bei Stimulation mit Carbachol und $73\% \pm 13\%$ bei Stimulation mit DMPP des maximalen Oxidationsstroms bei der entsprechenden ersten Stimulation ohne Magnesium. Die

AUC war noch $68\% \pm 12\%$ (Kalium), $61\% \pm 7\%$ (Carbachol) und $60\% \pm 6\%$ (DMPP). Gegenüber den Kontrollwerten verminderte sich der maximale Oxidationsstrom dadurch um 24% (Kalium), 34% (Carbachol) und 15% (DMPP) und die AUC um 58% (Kalium), 41% (Carbachol), und 27% (DMPP). Mit 9,6 mM Magnesium wurde die Carbachol-induzierte Freisetzung am stärksten beeinflusst. Betrachtet man hier die Relativ-Werte (Werte der 2. Stimulation bezogen auf die Werte der ersten Stimulation, Abb. 83 D und E) ergibt sich ein signifikanter Unterschied zu den Werten bei Stimulation mit Kalium oder DMPP. Berücksichtigt man allerdings die Kontrollversuche (zweimalige Stimulation ohne Magnesium), ergibt sich eine Verminderung des maximalen Oxidationsstroms um 73% (Kalium), 82% (Carbachol) und 43% (DMPP) und der AUC um 51% (Kalium), 64% (Carbachol) und 29% (DMPP). Dadurch zeigt sich, dass der Unterschied zwischen der Beeinflussung der Kalium-induzierten und der Carbachol-induzierten Freisetzung doch nicht so stark ausgeprägt ist. Außerdem scheint v.a. im Hinblick auf die Kontrollversuche die DMPP-induzierte Freisetzung insgesamt am wenigsten beeinflusst zu werden. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass der Versuchsaufbau verschieden war (DMPP → Superfusion, Carbachol und Kalium → Einwaschen) und die Freisetzung unter DMPP insgesamt wesentlich geringer war als unter Kalium oder Carbachol.

Direkt vergleichbar ist die Wirkung von Magnesium auf die Kalium- und Carbachol-induzierte Freisetzung, da hier die exakt gleichen Versuchsbedingungen herrschten. Hier kam es v.a. im Verhältnis zu den Kontrollwerten zu keinen nennenswerten Unterschieden in der Wirkung von Magnesium. Magnesium scheint hier also als Calcium-Kanal-Blocker die direkte Aktivierung von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen durch Kalium zu hemmen. In gleichem Maße wird aber auch die Freisetzung durch Carbachol gehemmt, bei der zunächst ligandengesteuerte Kanäle und erst sekundär spannungsabhängige Calcium-Kanäle geöffnet werden.

**Abb. 83**

Wirkung von 1,2 mM und 9,6 mM Magnesium. Die erste Stimulation erfolgte in Magnesium-freier Lösung. Jeweils bei der zweiten Stimulation war Magnesium anwesend. Zwischen den beiden Stimulationen war eine 15-minütige Pause, in der zunächst mit Magnesium-freier Lösung (Lösung A, Zusammensetzung s. Tabelle 1) und in den letzten 3 Minuten mit Nährlösung, die Magnesium enthielt, superfundiert wurde. In den Kontrollversuchen wurde 2 mal in Abwesenheit von Magnesium stimuliert.

A, B, C: Einzelbeispiele des gemessenen Oxidationsstroms bei Stimulation mit 116 mM K^+ , 1 mM Carbachol oder 20 μ M DMPP.

D und E: Prozentuale Auswertung: Die Mittelwerte des maximalen Oxidationsstroms (**D**) und der AUC im Zeitraum 0 s bis 50 s (**E**) der zweiten Stimulation mit, bzw. in Kontrollversuchen ohne Magnesium, wurden auf die Werte der ersten Stimulation ohne Magnesium bezogen. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

	Kalium	Carbachol	DMPP
Max. Strom (pA), 1. Stim., 0 mM Magnesium	4531 ± 710	2188 ± 614	850 ± 57
Max. Strom (pA), 2. Stim., 0 mM Magnesium	4597 ± 797	1945 ± 468	753 ± 53 (s. Abb. 68)
AUC (pAs), 1. Stim., 0 mM Magnesium	85224 ± 17509	70975 ± 17479	29606 ± 2339
AUC (pAs), 2. Stim., 0 mM Magnesium	100936 ± 24235	64304 ± 12482	25533 ± 2188 (s. Abb. 68)
Max. Strom (pA), 1. Stim., 0 mM Magnesium	4603 ± 1024	1803 ± 489	687 ± 119
Max. Strom (pA), 2. Stim., 1,2 mM Magnesium	3452 ± 806	1062 ± 275	440 ± 47
AUC (pAs), 1. Stim., 0 mM Magnesium	120835 ± 38445	53684 ± 15671	20997 ± 2907
AUC (pAs), 2. Stim., 1,2 mM Magnesium	74357 ± 19983	32208 ± 8195	12209 ± 1928
Max. Strom (pA), 1. Stim., 0 mM Magnesium	3258 ± 624	1594 ± 405	673 ± 132
Max. Strom (pA), 2. Stim., 9,6 mM Magnesium	1535 ± 291	518 ± 153	306 ± 49
AUC (pAs), 1. Stim., 0 mM Magnesium	68417 ± 20550	52499 ± 11782	18100 ± 3074
AUC (pAs), 2. Stim., 9,6 mM Magnesium	30333 ± 7620	10052 ± 2657	6800 ± 405

Tabelle 17

Übersicht über die Absolutwerte bei den Versuchen mit 0 mM, 1,2 mM und 9,6 mM Magnesium.

3.3.4.2 Einfluss von Magnesium auf die Protonen-induzierte Freisetzung

Am Nebennierenmark kam es durch Absenkung des pH-Wertes von pH 7,4 auf pH 6,4 zu einer spontanen Freisetzung von Katecholaminen (vgl. Abb. 71). Im folgenden sollte die Wirkung von Magnesium auf diese Freisetzung untersucht werden. Zunächst scheint zumindest 1,2 mM Magnesium die Protonen-induzierte Freisetzung nur wenig zu beeinflussen (Abb. 84 A). Bei Absenken des pH-Wertes auf 6,4 kam es in den Kontrollversuchen bei wiederholter Stimulation aber zu einer Steigerung der Freisetzung (Steigerung der AUC um 45%, Abb. 73 B). Vergleicht man nun die Wirkung von Magnesium mit den Kontrollwerten, hemmte Magnesium auch die Protonen-induzierte Freisetzung (Abb. 84). 1,2 mM Magnesium reduzierte die AUC

um 35% gegenüber dem Kontrollwert. Allerdings ist der Unterschied bei einem p-Wert von 0,1 nicht signifikant. Erst bei 9,6 mM Magnesium kam es zu einer signifikanten Verminderung der Freisetzung um 60%.

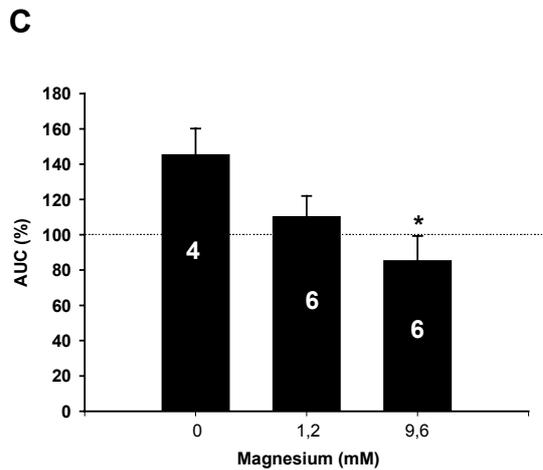
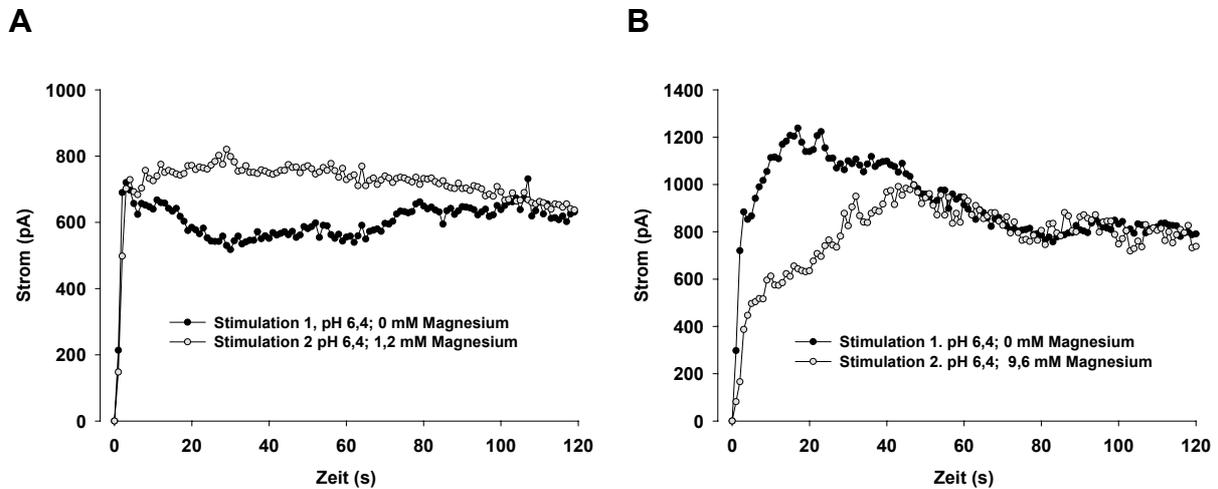


Abb. 84

Wirkung von 1,2 mM und 9,6 mM Magnesium auf die Protonen-induzierte Freisetzung. Jeweils bei der zweiten Stimulation war Magnesium anwesend. Zwischen den beiden Stimulationen war eine 10-minütige Pause, in der zunächst mit Nährlösung mit pH 7,4 (Lösung F, Zusammensetzung s. Tabelle 1) und in den letzten 3 Minuten mit dieser Lösung, die zusätzlich Magnesium enthielt, superfundiert wurde.

A und B: Einzelbeispiele des gemessenen Oxidationsstroms.

C: Prozentuale Auswertung: Die Werte der AUC im Zeitraum 0 s bis 50 s der zweiten Stimulation mit Magnesium, bzw. in Kontrollversuchen ohne Magnesium, wurden auf die Werte der ersten Stimulation ohne Magnesium bezogen. * $p < 0,05$.

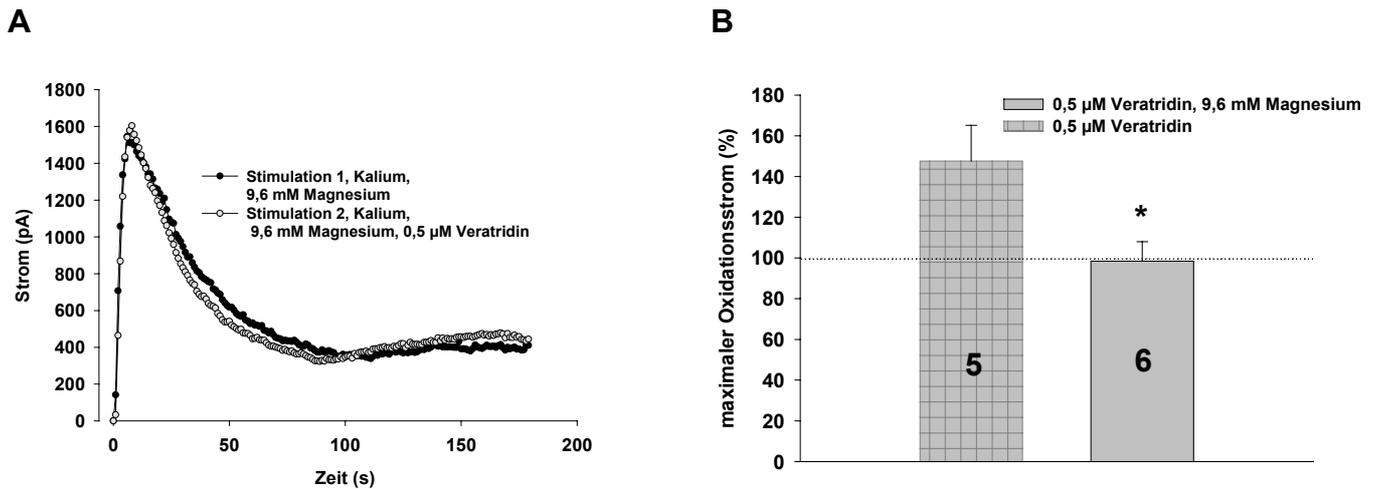
	pH 6,5
AUC (pAs), 1. Stim.	31227 ± 8395
AUC (pAs), 2. Stim., 1,2 mM Magnesium	37120 ± 11661
AUC (pAs), 1. Stim.	24957 ± 6154
AUC (pAs), 2. Stim., 9,6 mM Magnesium	19566 ± 4157

Tabelle 18

Übersicht über die Absolutwerte bei den Versuchen mit 1,2 mM und 9,6 mM Magnesium bei Protonen-induzierter Freisetzung.

3.3.4.3 Einfluss von Magnesium auf die Veratridin-Wirkung

Veratridin steigerte, vermutlich durch eine Verstärkung des Natrium-Einstroms über spannungsabhängige Natrium-Kanäle, sowohl die elektrisch induzierte Freisetzung am Ductus deferens (Abb. 43) als auch die Kalium-induzierte Freisetzung am Nebennierenmark (Abb. 75). Dabei konnten bereits 1,2 mM Magnesium am Ductus deferens die steigernde Wirkung von Veratridin unterdrücken (Abb. 47 B). Es sollte nun untersucht werden, ob Magnesium auch am Nebennierenmark die Veratridin-Wirkung beeinflusst. Hier wurde eine Konzentration von 9,6 mM Magnesium verwendet. Dabei wurde die erste Stimulation mit Kalium in Anwesenheit von 9,6 mM Magnesium und die zweite Stimulation zusätzlich zu Magnesium in Anwesenheit von 0,5 μ M Veratridin durchgeführt. Abb. 85 zeigt, dass in Anwesenheit von 9,6 mM Magnesium auch am Nebennierenmark keine Steigerung der Freisetzung durch Veratridin ausgelöst werden konnte.

**Abb. 85**

Beeinflussung der Veratridin-Wirkung (0,5 µM) durch Magnesium (9,6 mM) bei Stimulation mit 116 mM K^+ . Bei der ersten Stimulation war bereits 9,6 mM Magnesium anwesend, bei der zweiten Stimulation ebenfalls 9,6 mM Magnesium und zusätzlich 0,5 µM Veratridin. Zwischen den beiden Stimulationen war eine 15-minütige Pause, in der zunächst mit Nährlösung mit 9,6 mM Magnesium und in den letzten 3 Minuten mit Nährlösung mit 9,6 mM Magnesium, die zusätzlich 0,5 µM Veratridin enthielt, superfundiert wurde.

A: Einzelbeispiele des gemessenen Oxidationsstroms. **B und C:** Prozentuale Auswertung: Die Mittelwerte des maximalen Oxidationsstroms (**B**) und der AUC im Zeitraum 0 s bis 50 s (**C**) der zweiten Stimulation wurden auf die Werte der ersten Stimulation bezogen. Zusätzlich ist als Kontrolle die Wirkung von Veratridin alleine (ohne Magnesium) aus vorherigen Versuchen (vgl. auch Abb. 75) dargestellt * $p < 0,05$.

	Kalium
Max. Strom (pA), 1. Stim., 9,6 mM Magnesium	1592 ± 482
Max. Strom (pA), 2. Stim., 9,6 mM Magnesium, 0,5 µM Veratridin	1571 ± 485
AUC (pAs), 1. Stim., 9,6 mM Magnesium	55028 ± 19360
AUC (pAs), 2. Stim., 9,6 mM Magnesium, 0,5 µM Veratridin	51607 ± 18968

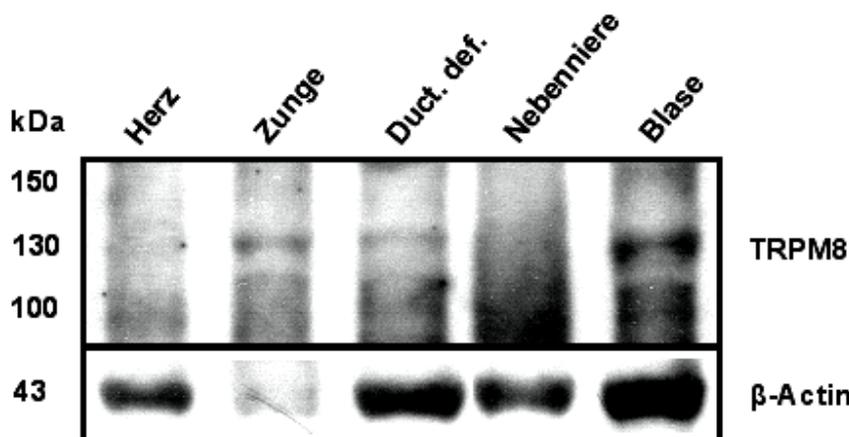
Tabelle 19

Übersicht über die Absolutwerte bei den Versuchen mit 0,5 µM Veratridin und 9,6 mM Magnesium.

3.4 Proteinexpression des TRPM8-Kanals

Aufgrund der Versuche mit (-)-Menthol, Icilin und Capsazepin konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob der TRPM8-Kanal an der Beeinflussung der Freisetzung durch diese Substanzen beteiligt ist. Deshalb sollte mittels Westernblot untersucht werden, ob der TRPM8-Kanal im Ductus deferens und in der Nebenniere exprimiert wird. Zur Detektion wurde ein TRPM8-spezifischer Antikörper verwendet. Abb. 86 A zeigt einen Westernblot, bei dem jeweils 40 µg Gesamtprotein aufgetragen wurde. Es konnte hier im Gesamtproteinextrakt aus Blasen-Gewebe der TRPM8-Kanal durch den verwendeten Antikörper nachgewiesen werden (Bande bei 130 kDa). Auch in der Spur, in der der Proteinextrakt der Zunge aufgetragen wurde, ist eine deutliche Bande bei 130 kDa zu erkennen. Trotz schwacher Ladungskontrolle (β -Actin) kann man davon ausgehen, dass auch hier der TRPM8-Kanal von dem spezifischen Antikörper erkannt wurde. Beide Gewebe dienten als Positivkontrolle, da bereits bekannt ist, dass der TRPM8-Kanal dort exprimiert wird (Abe *et al.*, 2005; Stein *et al.*, 2004). Als Negativkontrolle wurde ein Gesamtproteinextrakt des Herzmuskels verwendet. Hier ist erwartungsgemäß keine Bande zu erkennen. Im Ductus deferens scheint der TRPM8-Kanal vorhanden zu sein, im Extrakt der Nebenniere (Rinde und Mark) konnte er dagegen nicht detektiert werden. Der TRPM8-Kanal könnte aber möglicherweise nur in der Rinde oder nur im Mark vorhandenen sein. Um sicher zu gehen, dass bei Verwendung der gesamten Nebenniere der Anteil des TRPM8-Kanals nicht zu gering und damit unter der Nachweisgrenze ist, wurde nochmals ein Westernblot mit 80 µg Gesamtprotein durchgeführt (Abb. 86 B). Auch hier konnte der TRPM8-Kanal nicht nachgewiesen werden.

A



B

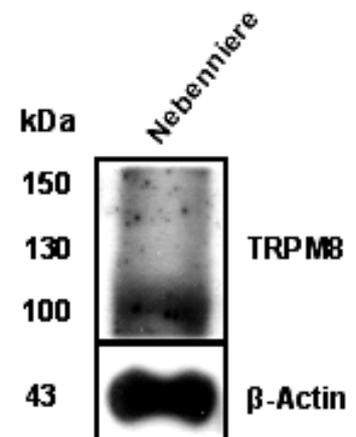


Abb. 86

Westernblot mit Gesamtproteinextrakt aus Herz-, Zungen-, Ductus deferens-, Nebennieren-, und Blasengewebe der Ratte zur Analyse der TRPM8-Expression. Detektiert wurde mittels eines spezifischen Antikörpers gegen den TRPM8-Kanal unter Verwendung des ECL-Systems. Es wurden

jeweils 40 μg (A) bzw. 80 μg (B) Gesamtprotein aufgetragen. Jeweils links ist die Größe der Proteine in kDa angegeben. Als Ladungskontrolle diente β -Actin.

3.5 Amperometrie

Mittels Amperometrie können Einzelfreisetzungen von Katecholaminen erfasst werden. Mit dieser Methode sollte untersucht werden, wie (-)-Menthol und Magnesium die Freisetzungsfrequenz und die Menge an Katecholaminen pro Einzelfreisetzung beeinflussen. Für die Versuche wurden PC12-Zellen verwendet, die in ihrer Funktion den chromaffinen Zellen ähnlich sind. Der Vorteil der PC12-Zellen gegenüber den Nebennierenschnitten für amperometrische Messungen besteht darin, dass sie gezüchtet werden können und dadurch Einzelzellen für die Versuche zur Verfügung stehen.

3.5.1 (-)-Menthol

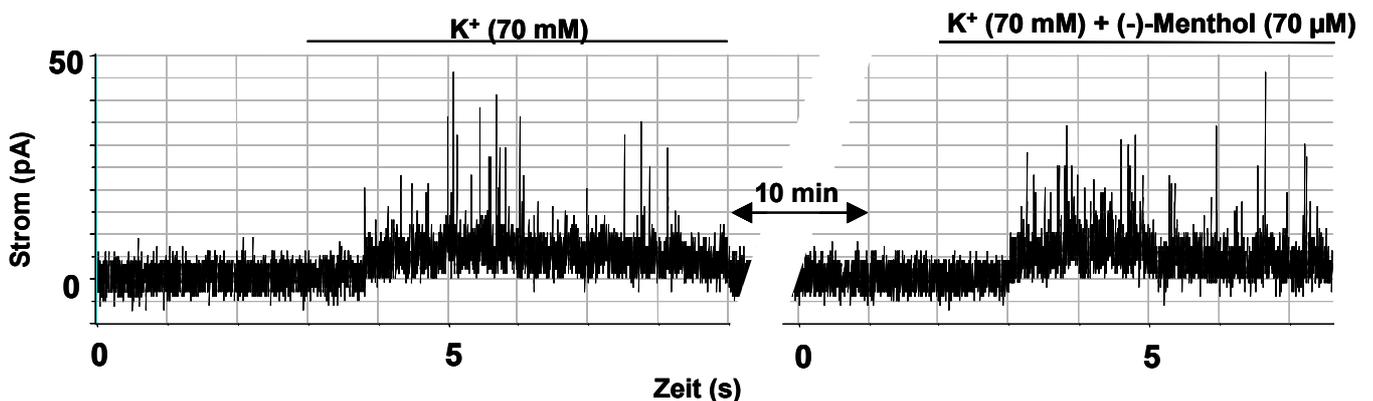
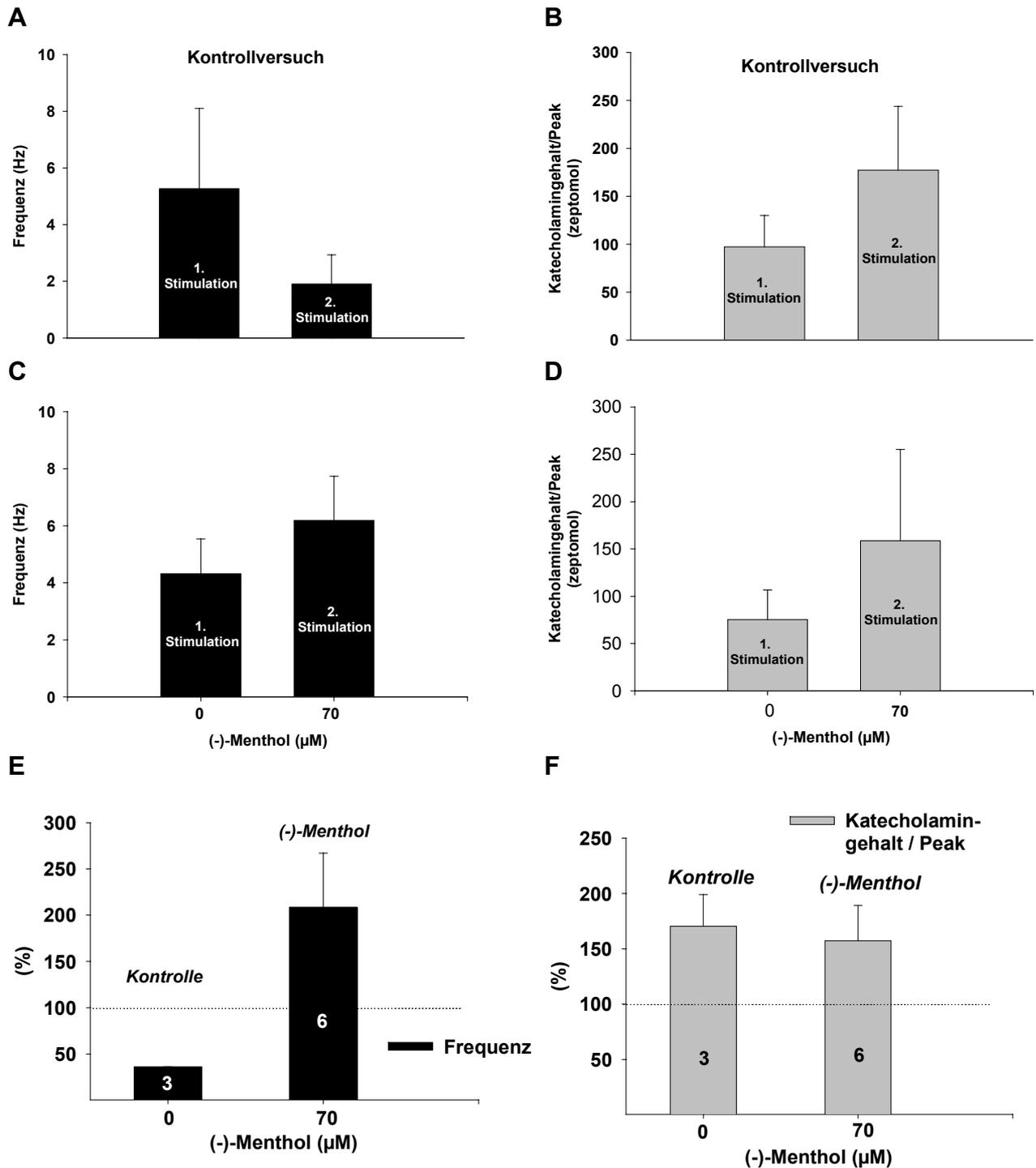


Abb. 87

Einzelbeispiel amperometrisch gemessener Einzelfreisetzungen und Wirkung von (-)-Menthol. Die Freisetzung wurde zweimal hintereinander mit 70 mM K⁺ im Abstand von 10 Minuten induziert. 3 Minuten vor und während der zweiten Stimulation war 70 μM (-)-Menthol anwesend.

Bei den PC12-Zellen konnte bei Stimulation mit Kalium eine relativ schnelle Entleerung der intrazellulären Vesikel-Speicher und damit verbunden eine Abnahme der Freisetzung beobachtet werden. Um diese Abnahme in Grenzen zu halten, wurde die Freisetzung nicht mit 116 mM K⁺ wie an den Nebennierenschnitten, sondern mit 70 mM K⁺ induziert.

Mit (-)-Menthol war aufgrund der voltammetrischen Untersuchungen eine Steigerung der Freisetzung bei Stimulation mit Kalium zu erwarten. Um die Wirkung von (-)-Menthol an den PC12-Zellen zu untersuchen, wurde die Freisetzung wie am Nebennierenmark zweimal hintereinander allerdings im Abstand von 10 Minuten, durch Superfusion mit Kalium-reicher Lösung induziert. Außerdem wurde hier jeweils nur 6 Sekunden lang stimuliert. Bei der 2. Stimulation war zusätzlich 70 μM (-)-Menthol anwesend.

**Abb. 88**

A: Freisetzung-Frequenz während der ersten und zweiten Stimulation unter Kontrollbedingungen (zweimalige Stimulation mit 70 mM K^+).

B: Mittlerer Katecholamin-Gehalt pro Peak während der ersten und zweiten Stimulation unter Kontrollbedingungen.

C: Einfluss von (-)-Menthol auf die Freisetzung-Frequenz bei Stimulation mit 70 mM K^+ . Bei der zweiten Stimulation war 70 μM (-)-Menthol anwesend.

D: Einfluss von (-)-Menthol auf den Katecholamin-Gehalt pro Peak bei Stimulation mit 70 mM K^+ . Bei der zweiten Stimulation war 70 μM (-)-Menthol anwesend. **E:** Prozentuale Auswertung der

Kontrollversuche und der Wirkung von (-)-Menthol auf die Freisetzung-Frequenz: Dargestellt ist jeweils der Wert der zweiten Stimulation bezogen auf den Wert der ersten Stimulation. F: Prozentuale Auswertung der Kontrollversuche und der Wirkung von (-)-Menthol auf den Katecholamin-Gehalts pro Peak: Dargestellt ist jeweils der Wert der zweiten Stimulation bezogen auf den Wert der ersten Stimulation.

Abb. 87 zeigt einen Einzelversuch. Mit (-)-Menthol scheint die Freisetzung gegenüber der ersten Stimulation ohne (-)-Menthol deutlich erhöht zu sein. Die mittlere Freisetzungsfrequenz aus 6 Versuchen betrug bei der ersten Stimulation $4,3 \text{ Hz} \pm 1,2 \text{ Hz}$ und bei der zweiten Stimulation $6,2 \text{ Hz} \pm 1,6 \text{ Hz}$ (Abb. 88 C). Bei der prozentualen Auswertung (Werte der zweiten Stimulation bezogen auf die Werte der ersten Stimulation) ergibt sich im Mittel ein Wert von $208\% \pm 58\%$ (Abb. 88 E). Damit wurde die Freisetzung durch (-)-Menthol erheblich gesteigert. Vergleicht man dieses Ergebnis mit den Kontrollwerten (zweimalige Stimulation nur mit 70 mM K^+) wird dieser Effekt noch deutlicher, da es an den PC12-Zellen zu einer deutlichen Verminderung der Freisetzungsfrequenz bei wiederholter Stimulation (von $5,3 \text{ Hz} \pm 2,8 \text{ Hz}$ auf $1,9 \text{ Hz} \pm 1,0 \text{ Hz}$, Abb. 88 A) kam. In den Kontrollversuchen betrug die Frequenz bei der zweiten Stimulation nur noch $36\% \pm 0,1\%$ der ersten Stimulation (Abb. 88 E). Außerdem wurde aus der Peak-Fläche über das Faradaysche Gesetz die mittlere Menge an pro Freisetzung umgesetzten Katecholaminen berechnet. Diese betrug in den Kontrollversuchen bei der ersten Stimulation $97 \text{ zeptomol} \pm 33 \text{ zeptomol}$ und bei der zweiten Stimulation $177 \text{ zeptomol} \pm 67 \text{ zeptomol}$ (Abb. 88 B). Damit stieg in den Kontrollversuchen bei der zweiten Stimulation die Menge an freigesetzten Katecholaminen auf $170\% \pm 29\%$ an (Abb. 91 E). (-)-Menthol hatte auf die Menge an Katecholaminen pro Freisetzung keinen Einfluss. Bei der ersten Stimulation betrug der Wert $75 \text{ zeptomol} \pm 31 \text{ zeptomol}$ und bei der zweiten Stimulation unter dem Einfluss von (-)-Menthol $159 \text{ zeptomol} \pm 97 \text{ zeptomol}$. Der Wert der zweiten Stimulation entspricht damit $157\% \pm 32\%$ und ist somit vergleichbar mit dem Wert bei Kontrollversuchen.

(-)-Menthol scheint somit durch die Erhöhung der Freisetzungsfrequenz die Katecholamin-Freisetzung zu steigern.

3.5.2 Magnesium

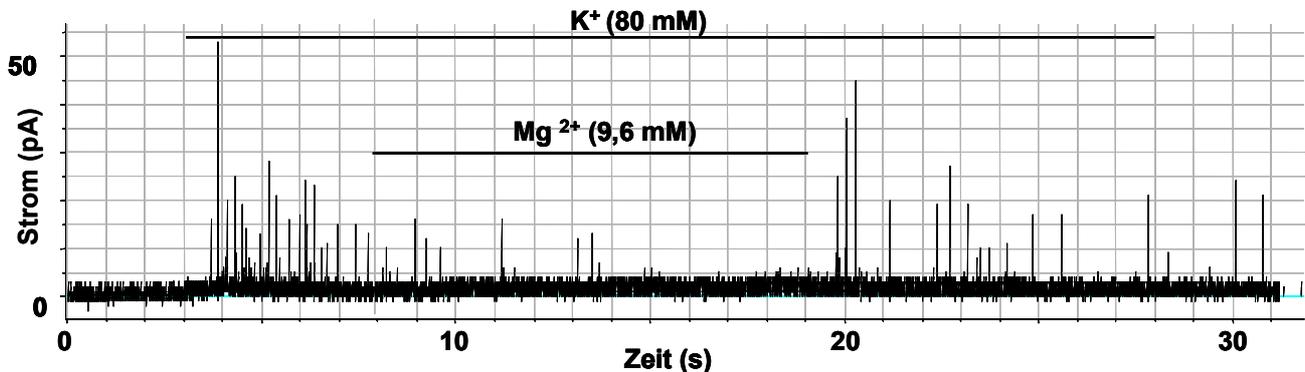
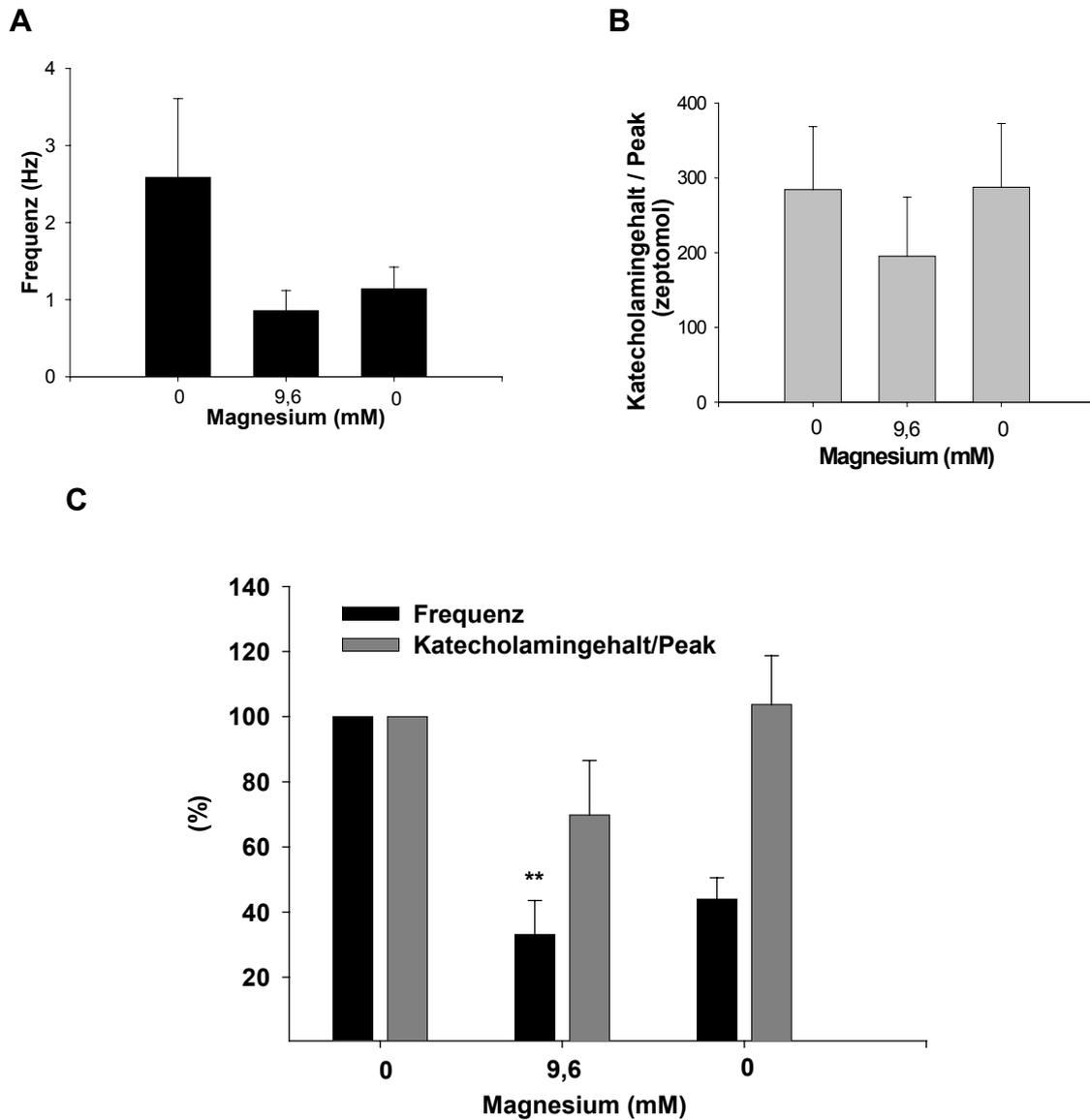


Abb. 89

Einzelbeispiel amperometrisch gemessener Einzelfreisetzungen und der Wirkung von Magnesium. Zunächst wurde nur mit 80 mM K^+ , dann in Anwesenheit von 9,6 mM Magnesium und anschließend wieder nur mit 80 mM K^+ stimuliert.

Aufgrund der bereits durchgeführten Versuche war mit Magnesium eine Verringerung der Freisetzung zu erwarten. Da es aber bereits in den Kontrollversuchen bei wiederholter Stimulation mit 70 mM K^+ zu einer deutlichen Verminderung der Freisetzungsfrequenz kam, wurde zur Untersuchung des Magnesium-Effekts der Versuchsablauf abgewandelt. Es wurde zunächst 4 s bis 5 s lang nur mit einer 80 mM K^+ enthaltenden Lösung superfundiert, wodurch es zur Katecholamin-Freisetzung an den PC12-Zellen kam. Unmittelbar im Anschluss wurde mit einer Nährlösung superfundiert, die 80 mM K^+ und 9,6 mM Magnesium enthielt (11 s bis 12 s). Dadurch verminderte sich die Freisetzung deutlich (Abb. 89). Anschließend wurde wieder auf Kalium-reiche Stimulationslösung ohne Magnesium umgeschaltet, wodurch die Freisetzung wieder leicht erhöht wurde. In Abb. 90 ist die Auswertung dargestellt: In der initialen Stimulationsphase nur mit Kalium betrug die Frequenz der Freisetzung $2,6 \text{ Hz} \pm 0,8 \text{ Hz}$. Durch 9,6 mM Magnesium wurde die Frequenz auf $0,9 \text{ Hz} \pm 0,2 \text{ Hz}$ reduziert, was nur noch $33\% \pm 11\%$ des Wertes der initialen Stimulation ohne Magnesium entspricht. Durch die danach folgende Unterbrechung der Magnesium-Einwirkung wurde entgegen der Entleerung der Vesikel-Speicher die Frequenz der Freisetzung im Mittel wieder von $0,9 \text{ Hz} \pm 0,2 \text{ Hz}$ auf $1,2 \text{ Hz} \pm 0,2 \text{ Hz}$ gesteigert (Abb. 90 A). Prozentual bedeutet das eine Erhöhung von $33\% \pm 11\%$ auf $44\% \pm 7\%$ (Abb. 90 C). Zu diesem Zeitpunkt war bereits 14 s bis 16 s lang dauerhaft die Freisetzung induziert worden.

Auch der Katecholamin-Gehalt pro Freisetzung wurde durch Magnesium leicht von $284 \text{ zeptomol} \pm 84 \text{ zeptomol}$ auf $195 \text{ zeptomol} \pm 79 \text{ zeptomol}$ verringert und ohne Magnesium wieder auf $287 \text{ zeptomol} \pm 85 \text{ zeptomol}$ erhöht. Somit kam es durch Magnesium zu einer Verminderung des Katecholamin-Gehalts auf $70\% \pm 18\%$ und ohne Magnesium wieder zu einer Erhöhung auf $103\% \pm 15\%$.

**Abb. 90**

Mittelwerte aus 5 Versuchen mit 9,6 mM Magnesium

A: Freisetzungsfrequenz während der Kalium-Stimulation (80 mM) ohne und mit Magnesium

B: Mittlerer Katecholamin-Gehalt pro Peak während der Kalium-Stimulation (80 mM) ohne und mit Magnesium.

C: Prozentuale Auswertung: Der Wert der initialen Stimulations-Phase ohne Magnesium beträgt 100%. Die Werte der Stimulations-Phase mit Magnesium und der wieder darauf folgenden Phase ohne Magnesium wurden auf den Wert der initialen Stimulations-Phase bezogen. ** $p < 0,01$.

3.6 Untersuchungen mittels HPLC

Der Vorteil einer Bestimmung der Katecholamin-Konzentration mittels HPLC liegt in der Möglichkeit einer differenzierteren Analyse der Katecholamine. Durch unterschiedliche Elutionszeiten können Katecholamine von anderen Substanzen abgetrennt werden. Somit wird sichergestellt, dass keine anderen oxidierbaren Substanzen (z.B. Ascorbinsäure) mit erfasst werden. Die Auftrennung auf der HPLC-Säule ermöglicht außerdem eine getrennte Untersuchung von Adrenalin und Noradrenalin, wodurch eine eventuell unterschiedliche Beeinflussung der Freisetzung von beiden Katecholaminen sichtbar wird. Um die Freisetzung von Noradrenalin und Adrenalin zu untersuchen, wurden Nebennierenschnitte wie unter Abschnitt 2.6.1 beschrieben, perfundiert und das Perfusat gesammelt.

Ein entscheidender Nachteil dieser Methode gegenüber den elektrochemischen Messungen mit Kohlefaser-Mikroelektroden besteht darin, dass die Katecholamin-Konzentration nicht direkt am Präparat verfolgt werden kann, sondern erst im Perfusat bestimmt wird. Außerdem wird die Katecholamin-Konzentration nicht fortlaufend, sondern nur in Fraktionen untersucht und durch Verdünnungseffekte kann die Bestimmung ungenauer werden. Zusätzlich können Mess-Ungenauigkeiten bei der Aufarbeitung der Proben entstehen. Dadurch können kleine Unterschiede in der Freisetzung u.U. nicht erkannt werden.

3.6.1 Etablierung der Methode

Wie bei der Voltammetrie wurden zunächst Kontrollversuche durchgeführt. Nebennierenschnitte wurden perfundiert und das Perfusat gesammelt. Die Freisetzung wurde mit Kalium-reicher Lösung (116 mM K^+) zweimal hintereinander im Abstand von 15 min induziert. Dabei wurde das Perfusat jeweils 40 s, 60 s, 120 s und 180 s nach Start der Perfusion mit Kalium-reicher Lösung (Lösung C, Zusammensetzung vgl. Tabelle 1) 20 s lang aufgefangen (Perfusions-Schema vgl. Abb. 25) und in den einzelnen Fraktionen anschließend die Noradrenalin- und Adrenalin-Konzentration mittels HPLC bestimmt. Unmittelbar vor dem Beginn der Stimulation wurde eine Fraktion bei Perfusion mit Standardlösung gesammelt, um den Grundwert an Katecholaminen ohne Stimulation zu ermitteln. Abb. 91 A zeigt den Mittelwert der absoluten Konzentration an Noradrenalin und Adrenalin aus 6 Versuchen. Vor Beginn der Stimulation war die Konzentration an Katecholaminen annähernd 0. Durch Perfusion mit Kalium-reicher Lösung stieg die Katecholamin-Konzentration im Perfusat an. Dabei wurde mehr Adrenalin als Noradrenalin freigesetzt. Wie bei der Voltammetrie kam es zu einer erheblichen Schwankung der Absolutwerte. In Abb. 91 B wurden deshalb Relativwerte für Noradrenalin und Adrenalin berechnet. Dabei wurden die Werte für jede Einzelmessung auf die in

beiden Durchgängen maximal erzielte Freisetzung bezogen, die 100% entsprach. Anschließend wurde der Mittelwert gebildet. Dadurch konnten die Schwankungen um den Mittelwert deutlich reduziert werden. Dies zeigt, dass die Unterschiede bei den Absolutwerten zu einem großen Teil durch die unterschiedliche maximal zu erzielende Freisetzung bei den einzelnen Präparaten zustande kam. Durch die Relativierung wird allerdings der Unterschied zwischen der Noradrenalin- und Adrenalin-Freisetzung wertgleich aufgehoben, weshalb im Folgenden auf diese Darstellung verzichtet wurde. Insgesamt war bei der zweiten Stimulation die Freisetzung höher als bei der ersten Stimulation. Betrachtet man die Fraktion nach 40 s ergab sich für die Adrenalin-Konzentration eine Steigerung von 100% (1. Stimulation) auf $157\% \pm 39\%$ (2. Stimulation) und für die Noradrenalin-Konzentration eine Steigerung von 100% (1. Stimulation) auf $190\% \pm 37\%$ (2. Stimulation) (Abb. 96). Der Anteil an Noradrenalin an insgesamt freigesetzten Katecholaminen betrug im Mittel zwischen 30% und 40% (Abb. 91 C). Dies entspricht den Angaben, dass in der Nebenniere ca. 20% - 30% Noradrenalin und 70% - 80% Adrenalin freigesetzt werden. Bei der zweiten Stimulation kam es zu einer leichten Erhöhung des NA-Anteils. Es ergaben sich allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Messungen.

Da in den Kontrollversuchen bei der ersten und zweiten Stimulation im Zeitraum bis 60 s der größte Anstieg an Katecholaminen zu beobachten war, wurde bei den folgenden Untersuchungen mit den verschiedenen Testsubstanzen die Katecholamin-Konzentration in den Fraktionen 40 s und 60 s bestimmt.

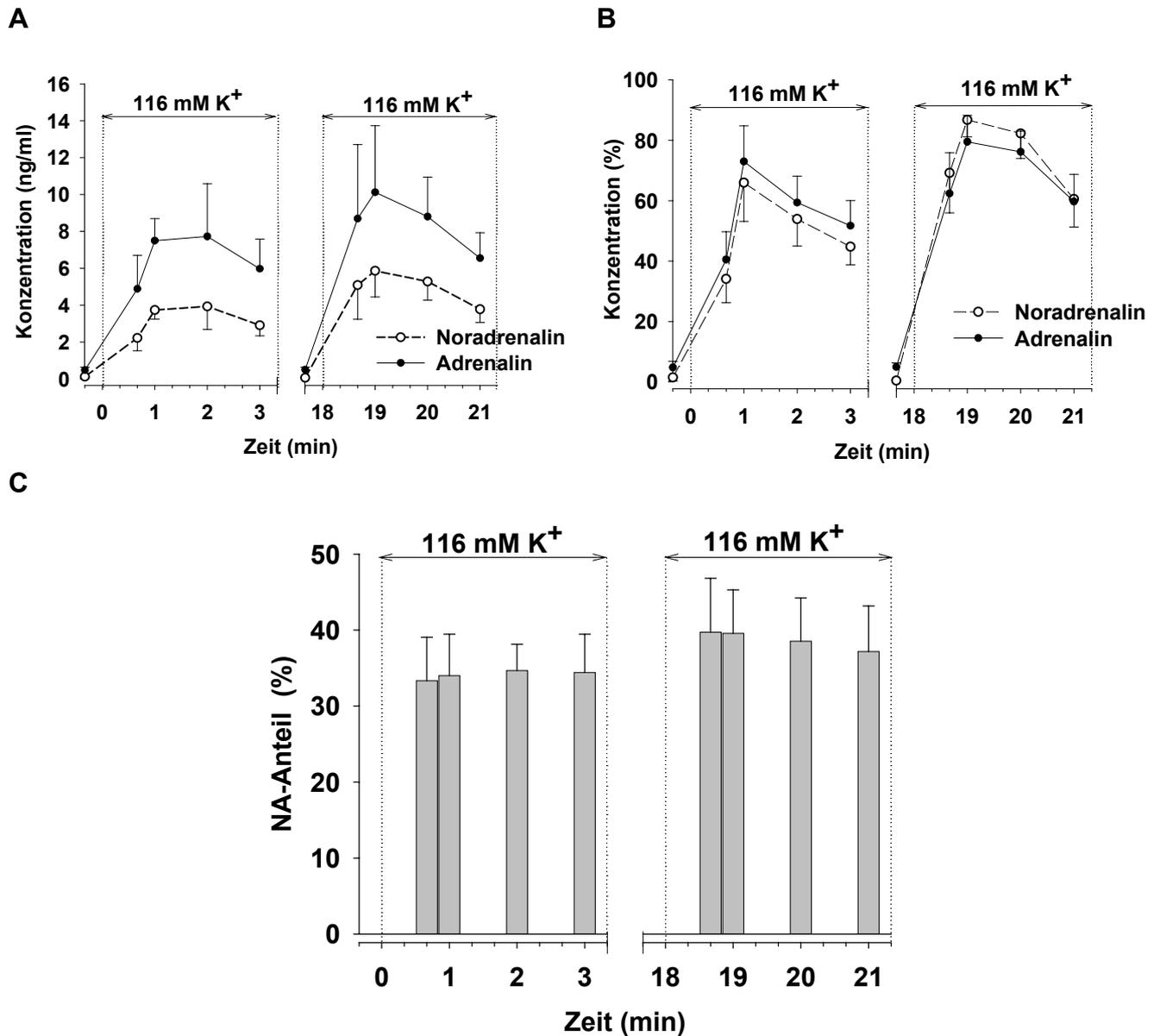


Abb. 91

Kontrollversuche: Zweimalige Stimulation mit 116 mM K⁺ n = 6.

A: Absolutwerte der im Perfusat gemessenen Konzentration an Noradrenalin und Adrenalin. Die einzelnen Punkte entsprechen den Konzentrationen in den einzelnen Fraktionen. Die Fraktionen wurden jeweils zu den dargestellten Zeitpunkten über den Zeitraum von 20 s gesammelt.

B: Prozentuale Werte: Die jeweils in beiden Durchläufen maximal gemessene Konzentration entspricht 100%.

C: Anteil von Noradrenalin an der insgesamt gemessenen Katecholamin-Konzentration in den einzelnen Fraktionen.

3.6.2 Veratridin

Zur Untersuchung des Einflusses von Veratridin wurden die Versuche nach dem Schema der Kontrollversuche durchgeführt. Allerdings war bei der zweiten Stimulation $0,5 \mu\text{M}$ Veratridin anwesend. Veratridin zeigte bei den HPLC-Versuchen folgende Wirkung:

Bei der zweiten Stimulation unter Veratridin kam es zwar zu einem Anstieg der Noradrenalin- und Adrenalin-Konzentration gegenüber der ersten Stimulation (Abb. 92 A). Allerdings unterschieden sich sowohl der Adrenalin-Wert ($140\% \pm 48\%$) als auch der NA-Wert ($202\% \pm 98\%$) unter Veratridin nur wenig von den Kontrollwerten (Abb. 96). Der NA-Anteil war bei der zweiten Stimulation unter Veratridin gegenüber der ersten Stimulation leicht erhöht (Abb. 94 B). Allerdings ergab sich auch hier kein wesentlicher Unterschied zu den Kontrollversuchen. Somit konnte für Veratridin die mit der Voltammetrie beobachtete Erhöhung der Kalium-induzierten Freisetzung mittels HPLC nicht nachgewiesen werden.

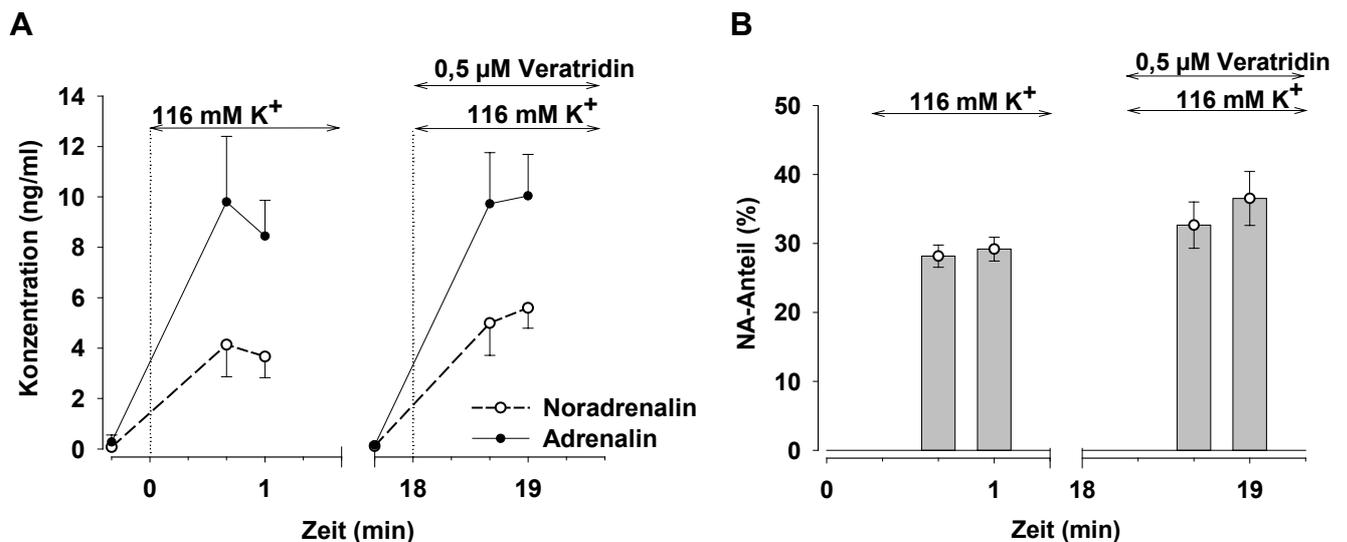


Abb. 92

Wirkung von $0,5 \mu\text{M}$ Veratridin: Zweimalige Stimulation mit 116 mM K^+ . 3 Minuten vor und während der zweiten Stimulation war $0,5 \mu\text{M}$ Veratridin anwesend, $n = 5$.

A: *Absolutwerte der im Perfusat gemessenen Konzentrationen an Noradrenalin und Adrenalin. Die einzelnen Punkte entsprechen den Konzentrationen in den einzelnen Fraktionen. Die Fraktionen wurden jeweils zu den dargestellten Zeitpunkten über den Zeitraum von 20 s gesammelt.*

B: *Anteil von Noradrenalin an der insgesamt gemessenen Katecholamin-Konzentration in den einzelnen Fraktionen.*

3.6.3 Veratramin

Bei den voltammetrischen Messungen am Nebennierenmark konnte mit 10 μM Veratramin die Kalium-induzierte Freisetzung um 43% vermindert werden. Betrachtet man die mittels HPLC ermittelten Absolutwerte (Abb. 93), scheint auch aus diesem Versuch eine Verminderung der Freisetzung durch Veratramin zu resultieren. Bei der Berechnung der Relativ-Werte aus Fraktion 40 s ergibt sich ein Adrenalin-Wert von $61\% \pm 21\%$ und ein Noradrenalin-Wert von $77\% \pm 27\%$ (vgl. Abb. 96). Das entspricht einer Reduktion des Adrenalin-Wertes um 96% und des NA-Wertes um 113% gegenüber den Kontrollwerten. Auch die HPLC-Messungen weisen also auf eine Verminderung der Katecholamin-Freisetzung durch Veratramin hin. Diese Abnahme war allerdings nach 1 Minute nicht mehr nachweisbar. Der NA-Anteil lag sowohl bei der ersten als auch bei der zweiten Stimulation mit Veratramin zwischen 25% und 30% und somit etwas unter den Werten der Kontrollversuche (Abb. 93 B). Es war dabei kein Unterschied zwischen den Stimulationen ohne und mit Veratramin zu erkennen.

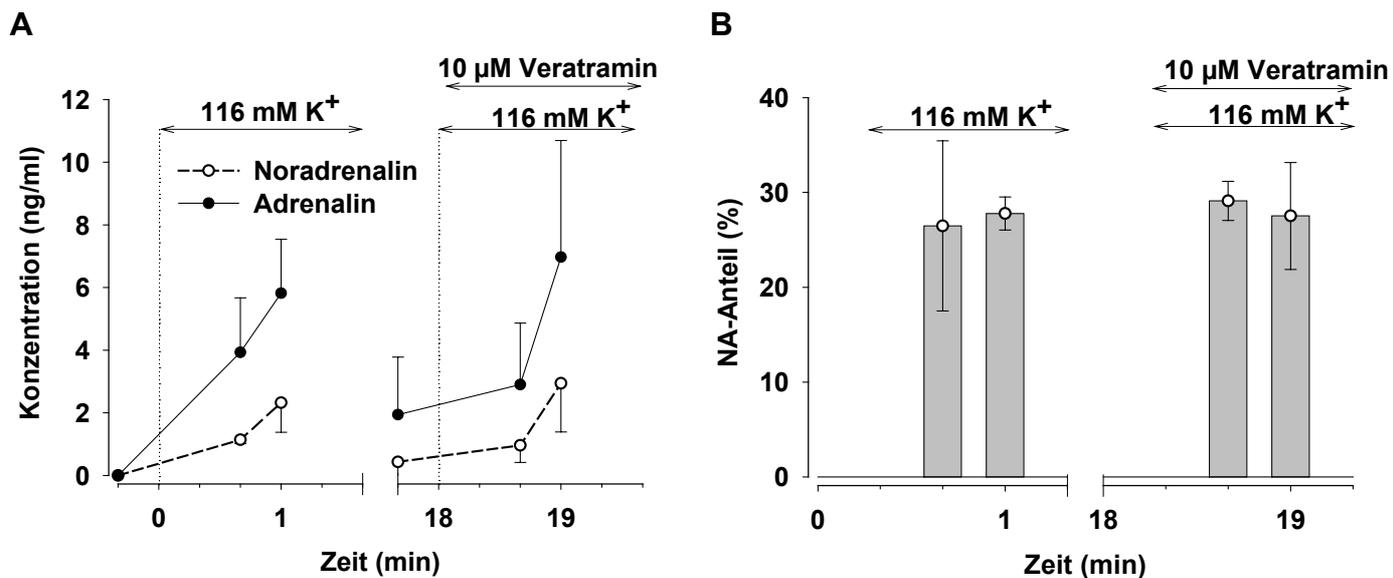


Abb. 93

Wirkung von 10 μM Veratramin: Zweimalige Stimulation mit 116 mM K^+ , 3 Minuten vor und während der zweiten Stimulation war 10 μM Veratramin anwesend, $n = 4$

A: Absolutwerte der im Perfusat gemessenen Konzentration an Noradrenalin und Adrenalin. Die einzelnen Punkte entsprechen den Konzentrationen in den einzelnen Fraktionen, die Fraktionen wurden jeweils zu den dargestellten Zeitpunkten über den Zeitraum von 20 s gesammelt.

B: Anteil an Noradrenalin von der insgesamt gemessenen Katecholamin-Konzentration in den einzelnen Fraktionen.

3.6.4 (-)-Menthol

Auch der Einfluss von 100 μM (-)-Menthol wurde mittels HPLC untersucht. Allerdings wurden mit (-)-Menthol nur zwei Einzelversuche durchgeführt. (-)-Menthol führte hier bei der zweiten Stimulation zu einem leichten Anstieg der Noradrenalin- und Adrenalin-Konzentration gegenüber der ersten Stimulation ohne (-)-Menthol (Abb. 94 A). Die Adrenalin-Konzentration in Fraktion 40 s bei der zweiten Stimulation mit (-)-Menthol entspricht 115% des Wertes der ersten Stimulation ohne (-)-Menthol (Abb. 96 A). Im Vergleich zu den Kontrollversuchen (157%) ist dieser Wert sogar um 42% vermindert. Der NA-Wert (211%) ist gegenüber dem Kontrollwert (190%) mit 21% leicht erhöht (Abb. 96 B). Entsprechend kommt es bei der zweiten Stimulation unter (-)-Menthol zu einem leichten Anstieg des NA-Anteils (Abb. 94 B). Es ergeben sich also Hinweise, dass (-)-Menthol die Adrenalin- und NA-Freisetzung unterschiedlich beeinflussen könnte. Die steigernde Wirkung von (-)-Menthol, die bei Kalium-Stimulation mittels Voltammetrie gefunden wurde, konnte allerdings, in Anbetracht der sehr geringen Steigerung der NA-Freisetzung und unter Verminderung der Freisetzung von Adrenalin, in den HPLC-Versuchen nicht nachgewiesen werden.

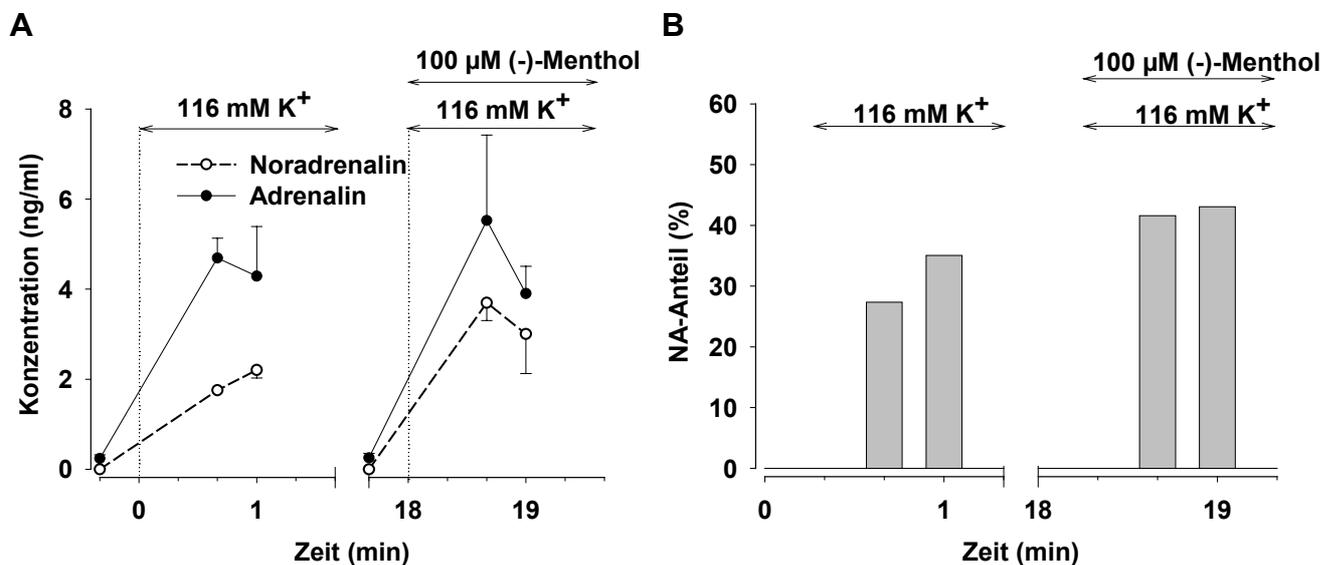


Abb. 94

Wirkung von 100 μM (-)-Menthol: Zweimalige Stimulation mit 116 mM K^+ , 3 Minuten vor und während der zweiten Stimulation war 100 μM (-)-Menthol anwesend, $n = 2$.

A: Absolutwerte der im Perfusat gemessenen Konzentration an Noradrenalin und Adrenalin. Die einzelnen Punkte entsprechen den Konzentrationen in den einzelnen Fraktionen, die Fraktionen wurden jeweils zu den dargestellten Zeitpunkten über den Zeitraum von 20 s gesammelt.

B: Anteil an Noradrenalin von der insgesamt gemessenen Katecholamin-Konzentration in den einzelnen Fraktionen.

3.6.5 Magnesium

Zur Untersuchung des Einflusses von Magnesium wurde bei der zweiten Stimulation mit einer Lösung, die 9,6 mM Magnesium enthielt, perfundiert. Wie Abb. 95 A zeigt, führte dies zu einer Verminderung der Konzentration von Adrenalin und Noradrenalin im Perfusat. Betrachtet man den Wert der Fraktion bei 40 s resultieren bei der zweiten Stimulation ein Adrenalinwert von $68\% \pm 29\%$ (Abb. 96 A) und ein Noradrenalin-Wert von $83\% \pm 53\%$ (Abb. 96 B) im Bezug auf die erste Stimulation. Das entspricht einer Verminderung der Adrenalin-Freisetzung um 89% und der Noradrenalin-Freisetzung um 107% gegenüber den Werten in den Kontrollversuchen. Obwohl die Streuung um den Mittelwert relativ hoch ist, kann man dennoch erkennen, dass Magnesium die Freisetzung reduzierte. Der Anteil an Noradrenalin an insgesamt freigesetzten Katecholaminen lag bei der ersten Stimulation, wie bei den Kontrollversuchen zwischen 30% und 40%. Bei der zweiten Stimulation in Anwesenheit von 9,6 mM Magnesium war der NA-Anteil in der Fraktion bei 60 s signifikant erhöht (um 9% gegenüber der ersten Stimulation). Allerdings kam es auch bei den Kontrollversuchen tendenziell zu einem leichten Anstieg des NA-Anteils bei der zweiten Stimulation (Abb. 91 C), der allerdings nicht signifikant war. Deshalb lässt sich aus diesem Ergebnis nicht unbedingt auf eine unterschiedliche Beeinflussung der Noradrenalin- und Adrenalin-Freisetzung durch Magnesium schließen.

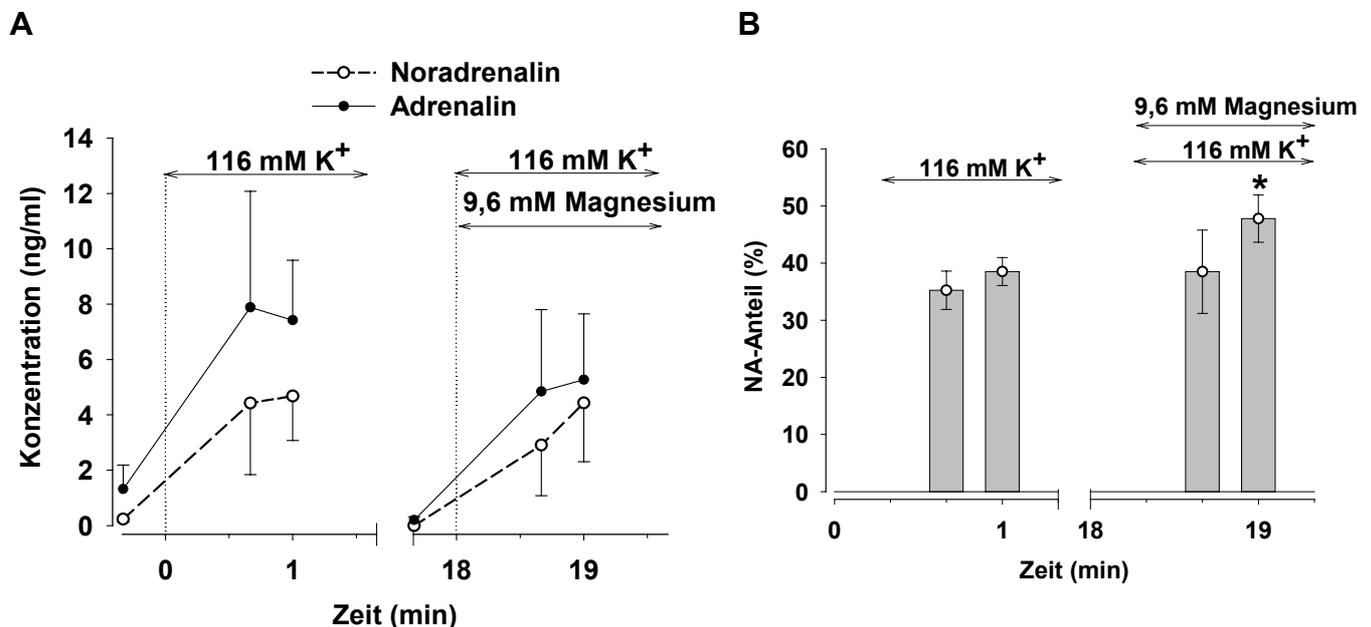


Abb. 95

Wirkung von 9,6 mM Magnesium: Zweimalige Stimulation mit 116 mM K⁺, 3 Minuten vor und während der zweiten Stimulation war 9,6 mM Magnesium anwesend, $n = 4$.

A: Absolutwerte der im Perfusat gemessenen Konzentrationen an Noradrenalin und Adrenalin. Die einzelnen Punkte entsprechen den Konzentrationen in den einzelnen Fraktionen. Die Fraktionen wurden jeweils zu den dargestellten Zeitpunkten über den Zeitraum von 20 s gesammelt.

B: Anteil an Noradrenalin an der insgesamt gemessenen Katecholamin-Konzentration in den einzelnen Fraktionen * $< 0,05$.

3.6.6 Zusammenfassung

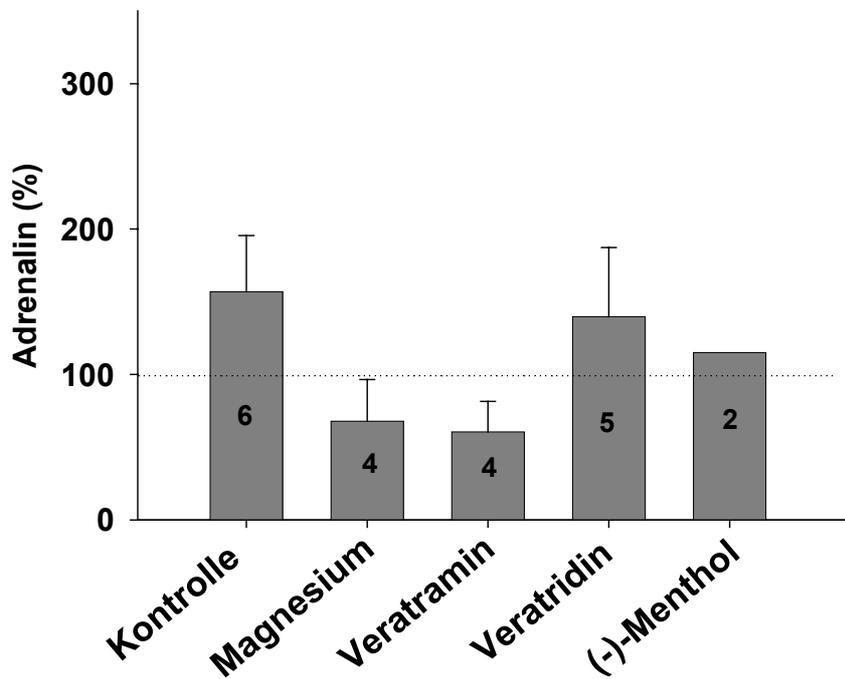
Mittels HPLC konnten Noradrenalin und Adrenalin getrennt untersucht werden. Bei wiederholter Stimulation mit Kalium ergab sich bei der 2. Stimulation eine stärkere Freisetzung an Katecholaminen als bei der ersten Stimulation.

Wenn man diese Verhältnisse berücksichtigt, resultierte aus den Versuchsergebnissen eine Hemmung der Freisetzung durch Magnesium und Veratramin, während Veratridin und (-)-Menthol die Freisetzung nur unwesentlich veränderten. Freisetzungssteigernde Wirkungen von Veratridin und (-)-Menthol konnten nicht nachgewiesen werden.

Bezüglich des Anteils an Adrenalin und Noradrenalin, ergab sich bereits in den Kontrollversuchen bei der 2. Stimulation ein leichter Anstieg des NA-Anteils. Dieser Anstieg des NA-Anteils nahm unter dem Einfluss von Magnesium und (-)-Menthol tendenziell zu. Allerdings waren die Unterschiede insgesamt nur gering, so dass nicht mit Sicherheit auf eine unterschiedliche Beeinflussung der Adrenalin- und NA-Freisetzung geschlossen werden kann (vgl. Abb. 96).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass für den Nachweis einer fördernden oder hemmenden Beeinflussung der Freisetzung von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark die direkte Messung mit Mikroelektroden am Präparat wahrscheinlich besser geeignet ist als die Bestimmung der Katecholamine im Perfusat mittels HPLC. Die letztere Methode bietet aber den Vorteil einer Differenzierung zwischen der Beeinflussung von Adrenalin und Noradrenalin.

A



B

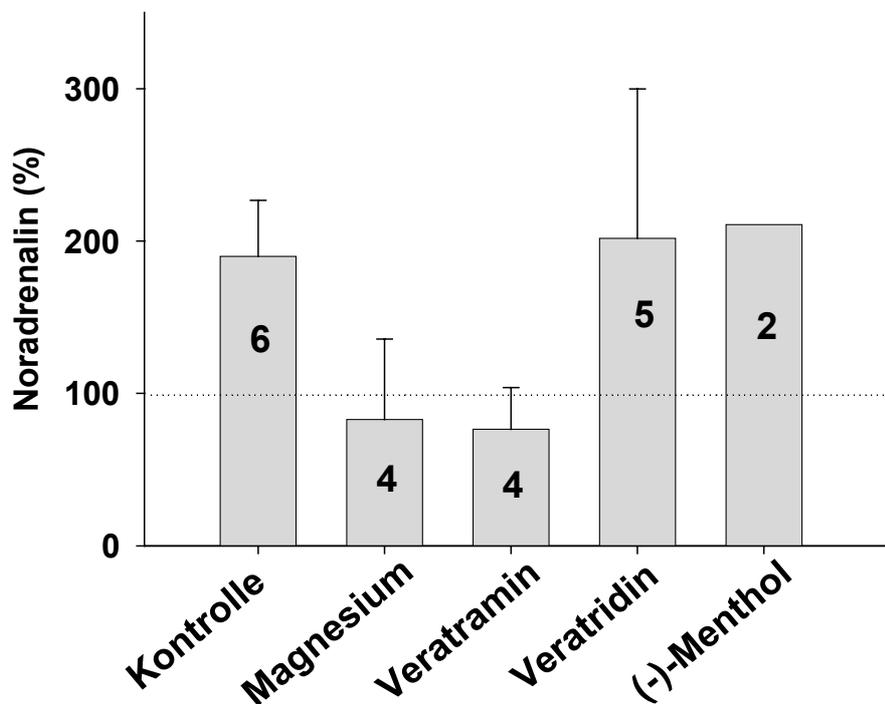


Abb. 96

Zusammenfassung der HPLC-Untersuchungen: Die Freisetzung wurde durch 116 mM K^+ induziert und der Einfluss von 9,6 mM Magnesium, 10 μ M Veratramin, 0,5 μ M Veratridin und 100 μ M (-)-Menthol untersucht. Dargestellt ist der Noradrenalin- bzw. Adrenalinwert der zweiten Stimulation aus der Fraktion nach 40 s unter dem Einfluss der entsprechenden Substanzen in %. Der Wert der ersten Stimulation aus der Fraktion nach 40 s ohne zusätzliche Substanz entspricht jeweils 100%. Bei den Kontrollwerten wurde zwei mal hintereinander die Freisetzung nur durch 116 mM K^+ induziert.

4 Diskussion und Zusammenfassung

4.1 Etablierung und Charakterisierung der Versuchsmodelle

Die Wirkung der ausgewählten Substanzen auf die Katecholamin-Freisetzung wurde sowohl mit Hilfe eines indirekten Versuchsmodells (Abschätzung der Katecholamin-Freisetzung durch Kontraktionskraft-Messungen am Ductus deferens der Ratte) als auch mit Hilfe verschiedener direkter Versuchsmodelle (elektrochemische Messverfahren mit Kohlefaser-Mikroelektroden und HPLC-Bestimmungen von Katecholaminen, die am Nebennierenmark der Ratte freigesetzt wurden) untersucht. Durch die Kombination dieser Verfahren konnte ein differenziertes Bild über den Einfluss der untersuchten Substanzen auf die Freisetzung von Katecholaminen, sowohl in Ihrer Funktion als Neurotransmitter als auch als Hormone gewonnen werden.

4.1.1 Bewertung der indirekten Messverfahren

4.1.1.1 Kontraktionskraft-Messung am Ductus deferens

Der **Ductus deferens** eignet sich aufgrund reichhaltiger sympathischer Nervenbahnen besonders gut zur Untersuchung von Vorgängen im Bereich des Sympathikus (Blattner *et al.*, 1978). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte v.a. die Wirkung von Substanzen auf die Neurotransmitter-Freisetzung mit der Wirkung auf die glatte Muskulatur direkt verglichen werden. Deshalb wurde zunächst die Reaktion des Muskels auf verschiedene Arten der Stimulation (elektrische Stimulation, Zugabe von Kalium, NA und Tyramin) charakterisiert. Es wurde untersucht, ob es dabei eher zur Aktivierung der Neurotransmitter-Freisetzung oder zur direkten Stimulation der glatten Muskulatur kommt.

Es zeigte sich, dass dieses Modell zur Beurteilung und zum Vergleich der Wirkungen auf die Freisetzung und die Kontraktionskraft der glatten Muskulatur gut geeignet ist. Durch elektrische Stimulation und Zugabe von Tyramin wurde hauptsächlich die Freisetzung von Neurotransmittern induziert, während durch Zugabe von NA und Erhöhung der Kalium-Ionen-Konzentration die Kontraktion der glatten Muskulatur direkt ausgelöst wurde.

Bei der hier durchgeführten elektrischen Stimulation (0,1 Hz, 30 V) wurde die Kontraktion durch ω -Conotoxin GVIA, einem selektiven Blocker neuronaler Calcium-Kanäle, fast vollständig unterdrückt. Dies zeigt, dass bei elektrischer Stimulation die Kontraktion hauptsächlich durch Freisetzung von Neurotransmittern zustande kommt.

Im Gegensatz zur glatten Muskulatur spielen an Nervenzellen TTX-sensitive Natrium-Kanäle eine große Rolle (Szulczyk *et al.*, 2003). Das primär durch spannungsabhängige Natrium-Kanäle getragene Aktionspotential führt zur Depolarisation und zur Aktivierung der spannungsabhängigen Calcium-Kanäle, was schließlich zur Calcium-induzierten Freisetzung von Neurotransmittern führt.

Die Wirkung von NF279 (einem P2X-Rezeptor-Antagonisten) und Prazosin (einem α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten) zeigen, dass die maximale Kontraktion bei der elektrischen Stimulation hauptsächlich durch die postsynaptische Wirkung der Neurotransmitter NA und ATP ausgelöst wird. Die maximal entwickelte Kraft wurde durch NF279 um 34% und durch Prazosin um weitere 46% reduziert, was darauf hinweist, dass die NA-vermittelte Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren die Hauptkomponente der elektrisch induzierten Kontraktion darstellt. Es verbleiben ca. 20%, die nicht durch die Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren oder P2X-Rezeptoren induziert sind. Dabei könnten andere Transmitter, wie z.B. Neuropeptide eine Rolle spielen. So kann z.B. Substanz P Kontraktionen am Ductus deferens induzieren (Moritoki *et al.*, 1987).

Nach Vorbehandlung der Ratten mit Reserpin resultierte eine deutliche Verminderung der Kontraktionskraft bei elektrischer Stimulation und es verblieb nur noch eine Restkraft von 6,3% gegenüber der Kontraktionskraft ohne Reserpin. Reserpin führt nicht nur durch Hemmung des vesikulären Monoamin-Transporters zu einer Entleerung der Monoamin-Speicher (Dorfman *et al.*, 1953; Martinez-Olivares *et al.*, 2006), sondern kann in höheren Konzentrationen auch eine Zerstörung von Vesikeln bewirken. Außerdem besitzt Reserpin auch eine direkte hemmende Wirkung auf den Calcium-Kanal des glatten Muskels (Casteels *et al.*, 1983). Dass Reserpin bei den hier gewählten Konzentration auch die glatte Muskulatur direkt beeinflusst, bestätigte sich durch dessen hemmende Wirkung auf die NA-induzierte Kontraktion (Verminderung der Kontraktionskraft um 72,6%, vgl. Abb. 39). Der in dieser Arbeit beobachtete Reserpin-Effekt setzt sich deshalb vermutlich aus Verminderung der Katecholamin-Freisetzung und Verminderung der Kontraktionskraft des glatten Muskel zusammen.

Durch Zugabe von NA wurde die Kontraktion der glatten Muskulatur direkt, ohne Stimulation der Neurotransmitter-Freisetzung, aktiviert. ω -Conotoxin GVIA zeigte hier keine Wirkung, während Amlodipin, ein Blocker von neuronalen und glattmuskulären Calcium-Kanälen, die Kontraktionskraft deutlich verminderte ($EC_{50} = 1,6 \mu M$, s. Abb. 38). Dies ist auch ein Hinweis darauf, dass am Ductus deferens die durch NA induzierte maximale Kontraktionskraft stark von der Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle des glatten Muskels abhängt.

Durch die gezielte Induktion der Kontraktion aufgrund von Neurotransmitter-Freisetzung bei elektrischer Stimulation und durch die direkte Aktivierung der glatten Muskulatur bei NA-Zugabe, bietet sich die Möglichkeit, die Wirkung einer Substanz auf die Freisetzung und die glatte Muskulatur zu untersuchen. Aus der Beeinflussung

der NA-induzierten Kontraktion lässt sich deren Wirkung auf die glatte Muskulatur ableiten, während eine Wirkung bei elektrischer Stimulation sowohl durch Beeinflussung der glatten Muskulatur, als auch durch Beeinflussung der Neurotransmitter-Freisetzung zustande kommen kann. Durch Vergleich der Effekte bei NA-induzierter Kontraktion und elektrischer Stimulation lässt sich die Wirkung einer Substanz auf die Freisetzung abschätzen. Außerdem kann zusätzlich ein Vergleich der Wirkstärken gezogen werden. Somit stellt der Ductus deferens ein gut geeignetes Modell dar, um das Zusammenspiel von Beeinflussung der Transmitter-Freisetzung aus sympathischen Nervenbahnen und Wirkung auf die glatte Muskulatur zu untersuchen. Dadurch können Rückschlüsse gezogen werden, wie untersuchte Substanzen z.B. auch das Herzkreislauf-System im Hinblick auf eine kombinierte Wirkung auf Katecholamin-Freisetzung und Gefäßmuskulatur beeinflussen. So könnte eine kombinierte Hemmung der Katecholamin-Freisetzung und der Kontraktion von Gefäßmuskulatur besonders wirksam bei der Behandlung von Herzinsuffizienz sein. Die steigende Katecholamin-Freisetzung und damit verbundene Erhöhung des peripheren Widerstandes könnte so vermindert werden. Diese Wirkung könnte besonders effektiv zur Durchbrechung des Kreislaufs von kompensatorisch einsetzender Steigerung des Sympathikus-Tonus und Verschlechterung der Herzinsuffizienz beitragen.

Der Vorteil des Ductus deferens als Modell liegt auch in der leichten Zugänglichkeit und einfachen Handhabung, wodurch zahlreiche Substanzen untersucht werden konnten.

Die durch Depolarisation mit Kalium induzierte Kontraktion wurde, wie die NA-induzierte Kontraktion, nur wenig durch ω -Conotoxin GVIA vermindert. Es scheint dabei also weniger zu einer Freisetzung von Neurotransmittern zu kommen. Anders als bei der elektrischen Stimulation kommt es bei der Zugabe einer konzentrierten Kalium-Lösung in das Organbad zu einem langsamen Anstieg der Kalium-Konzentration. Dies könnte dazu beitragen, dass spannungsabhängige Natrium-Kanäle der neuronalen Zellen nicht gleichzeitig geöffnet werden, sondern vom geschlossen aktiven Zustand sukzessive in den offenen und dann in den geschlossen inaktiven Zustand übergehen. So könnte es zu einer fehlenden Aktivierung einer größeren Anzahl an Natrium-Kanälen bei Stimulation mit Kalium kommen, so dass kein Aktionspotential ausgelöst wird. Dies könnte ein Grund für die fehlende Stimulation der Freisetzung sein. Der kurz andauernde elektrische Stimulus (wenige ms) scheint am Ductus deferens die physiologischen Vorgänge bei der Stimulation der Neuronen besser nachzuahmen, als die durch Kalium induzierte Dauer-Depolarisation.

Amlodipin reduzierte die Kontraktionskraft auch bei Kalium-induzierter Kontraktion deutlich (EC_{50} -Wert von 2,4 μ M), was die überwiegende Beteiligung von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen an der Kontraktion der glatten Muskulatur am Ductus deferens widerspiegelt. Das Ruhemembranpotential von glatten Muskeln liegt bei ca. -50 mV. Hier liegen spannungsabhängige Natrium-Kanäle eher im

geschlossen inaktiven Zustand vor. Deshalb sind diese vermutlich an der Kalium-induzierten Kontraktion der glatten Muskulatur wenig beteiligt und es kommt direkt zur Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle.

Durch Zugabe von Tyramin konnte eine Calcium-Kanal-unabhängige Freisetzung induziert werden. Tyramin ist in seiner chemischen Struktur dem NA sehr ähnlich. Es gelangt zunächst im Cotransport mit Na^+ ins Axoplasma und hemmt dort kompetitiv sowohl die Aufnahme von freiem NA in die Speichervesikel als auch den Abbau von NA über die Monoaminoxidase. Durch den Anstieg der Konzentration von freiem NA und Na^+ im Axoplasma kommt es zur Umkehr der Transportrichtung des Noradrenalin-Natrium-Cotransporters. Dadurch wird NA zusammen mit Na^+ Calcium-unabhängig freigesetzt. Außerdem hemmt Tyramin kompetitiv die Wiederaufnahme von NA aus dem synaptischen Spalt (Starke, 2006b).

Die Calcium-Kanal-unabhängige Freisetzung wurde durch die Wirkung des selektiven Antagonisten an neuronalen Calcium-Kanälen ω -Conotoxin GVIA bestätigt. Erwartungsgemäß zeigte ω -Conotoxin GVIA keine Wirkung auf die Tyramin-induzierte Kontraktion.

Wiederholte Stimulation durch elektrische Reizung, NA- und Tyramin-Zugabe führte auch über einen längeren Zeitraum zur Entwicklung konstanter Kontraktionskräfte. Mit Kalium nahm die Kontraktionskraft bei wiederholter Stimulation dagegen kontinuierlich zu, was bei der Beurteilung der Wirkung einzelner Substanzen berücksichtigt wurde.

4.1.2 Bewertung der direkten Messverfahren

Eine detailliertere Aussage über die Beeinflussung der Katecholamin-Freisetzung können nur direkte Messmethoden liefern. Hier gibt es verschiedene Möglichkeiten, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Messprinzipien Vor- und Nachteile aufweisen. Je nach Messprinzip können verschiedene Parameter der Freisetzung nicht erfasst werden. Um eine möglichst differenzierte Aussage treffen zu können, wurde in dieser Arbeit eine Kombination aus voltammetrischer, amperometrischer und HPLC-gestützter Katecholamin-Bestimmung gewählt.

Mittels **Voltammetrie** mit Kohlefaser-Mikroelektroden konnte eine zeitnahe Bestimmung der Katecholamin-Konzentration direkt an Nebennieren-Schnitten durchgeführt werden. Dadurch konnte die Freisetzung an chromaffinen Zellen in Echtzeit kontinuierlich beobachtet werden. Messungen an Gewebsschnitten bieten außerdem den Vorteil, dass Untersuchungen im Vergleich zu Versuchen an kultivierten Zellen unter physiologischeren Bedingungen durchgeführt werden können. Bei der Voltammetrie ist eine Identifizierung von Substanzen im Rahmen unterschiedlicher Oxidationsmaxima möglich. So können z.B. Adrenalin und

Noradrenalin von Dopamin unterschieden werden. Allerdings war bei dieser Methode eine Unterscheidung von NA und Adrenalin nicht möglich. Außerdem war nicht auszuschließen, dass Substanzen wie z.B. Ascorbinsäure, die im gleichen Bereich oxidiert werden, mit erfasst wurden.

Eine sehr hohe Empfindlichkeit und zeitliche Auflösung bietet die **Amperometrie**, wodurch die Darstellung von Einzelfreisetzungen einer Zelle ermöglicht wird. Bei dieser Methode ist allerdings eine Identifizierung von Substanzen nur in begrenztem Maße möglich. An der Kohlefaser-Mikroelektrode wird eine konstante Spannung (hier 650 mV) angelegt. Dadurch werden alle Substanzen erfasst, die unterhalb dieser Spannung oxidiert werden können. Außerdem ist eine amperometrische Messung an Gewebsschnitten sehr schwierig, da Einzelzellen hier sehr schwer zugänglich sind. Deshalb musste auf kultivierte PC12-Zellen zurückgegriffen werden.

Die beste Möglichkeit der Identifizierung der Neurotransmitter bot die **Bestimmung der Katecholamine mittels HPLC**. Bei dieser Methode können Adrenalin und Noradrenalin aufgetrennt und deren Konzentrationen einzeln bestimmt werden: Die Bestimmung konnte aber nicht direkt am Präparat erfolgen. Deshalb wurde in bestimmten Zeitabschnitten das Perfusat in Fraktionen von 20 s gesammelt und die Konzentration von Adrenalin und Noradrenalin bestimmt. Die mittels HPLC ermittelte Katecholamin-Konzentration einer Fraktion stellt damit einen Mittelwert aus der freigesetzten Menge über 20 s dar. Dadurch ist die Methode relativ ungenau im Bezug auf die direkte Beobachtung der Stärke und der zeitlichen Auflösung der Katecholamin-Freisetzung. Diese Parameter sind weniger gut zu erfassen als bei der Amperometrie oder Voltammetrie.

4.1.2.1 Voltammetrie an Nebennieren-Schnitten

Die Messung von Katecholaminen an Nebennieren-Schnitten mittels Voltammetrie konnte erfolgreich etabliert werden. Zunächst konnten mittels Glyoxylsäure-Färbung die Katecholamine in den chromaffinen Zellen in den Nebennieren-Schnitten der Ratte sichtbar gemacht werden (Abb. 59 und Abb. 60). Dadurch konnte die Verteilung der Katecholamin-haltigen chromaffinen Zellen eindeutig identifiziert werden. Es zeigte sich, dass praktisch im gesamten Mark chromaffine Zellen vorhanden sind, so dass die Kohlefaser-Mikroelektrode bei den voltammetrischen Messungen beliebig im Bereich des Nebennieren-Marks platziert werden konnte.

Außerdem zeigten Versuche mit definierten Konzentrationen an Adrenalin und Noradrenalin, dass das Messverfahren im untersuchten Bereich (Adrenalin: 0,010 mM bis 0,201 mM, Noradrenalin: 0,026 mM bis 0,262 mM) lineare Ergebnisse liefert (vgl. Abb. 62).

Die Freisetzung von Katecholaminen aus Nebennieren-Schnitten wurde durch Stimulation mit Kalium, Carbachol und DMPP ausgelöst.

Es steht außer Frage, dass die Aktivierung von N-Cholinozeptoren (durch Carbachol und DMPP) die Freisetzung von Katecholaminen am Nebennierenmark induzieren kann. Dies zeigte auch die deutliche Reduzierung der Carbachol- und DMPP-induzierten Freisetzung durch den selektiven N-Cholinozeptor-Antagonisten Tubocurarin. Allerdings gibt es in der Literatur unterschiedliche Aussagen über die Beteiligung von M-Cholinozeptoren an der Freisetzung. Eine selektive Aktivierung von M-Cholinozeptoren führt zwar zu einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration. Allerdings kann dadurch eine direkte Freisetzung vermutlich nur in Abhängigkeit von der basalen Calcium-Konzentration in der Zelle induziert werden (Borges, 1997). M-Cholinozeptoren spielen wahrscheinlich eine wichtigere Rolle bei der Calciumhomöostase der Zelle und beeinflussen die Freisetzung eher indirekt als direkt. Am Nebennierenmark konnte dies durch Untersuchungen mit Oxotremorin, einem selektiven Agonisten am M-Cholinozeptor, bestätigt werden. Oxotremorin konnte keine direkte, messbare Freisetzung induzieren (s. Abb. 70).

An der Kalium-induzierten Freisetzung aus Zellen des Nebennierenmarks sind vermutlich hauptsächlich spannungsabhängige Calcium-Kanäle beteiligt. Bei einem Ruhemembranpotential von ca. -50 mV an chromaffinen Zellen (Marcantoni *et al.*, 2007) befinden sich die spannungsabhängigen Natrium-Kanäle eher in einem geschlossen inaktiven Zustand. Aus diesem Grund sind sie, anders als bei der elektrisch induzierten Freisetzung am Ductus deferens, an der Freisetzung von Neurotransmittern aus chromaffinen Zellen vermutlich eher weniger beteiligt. Dies wird durch Versuche von Borges *et al.* (1997) bestätigt, der fand, dass TTX die Kalium-induzierte Freisetzung an der Nebenniere der Ratte nicht beeinflusst.

In Kontrollversuchen wurde der Einfluss einer Wiederholung der Stimulation ohne Zusatz von Testsubstanzen auf das Messsignal untersucht. Dies war wichtig, um eine Änderung des Freisetzungsverhaltens der Zellen bzw. Änderung der Empfindlichkeit der Elektroden bei den Folgeversuchen berücksichtigen zu können. Eine wiederholte Stimulation bietet einen Bezugspunkt, um Präparate- oder Elektroden-bedingte Schwankungen auszugleichen. Dazu wurde jeweils das Verhalten bei zweimaliger Stimulation mit der entsprechenden Stimulationslösung untersucht. Die Stimulations-Zeit betrug in der Regel 3 Minuten. Zwischen den beiden Stimulationen wurde eine Wartezeit von 15 Minuten eingehalten. Sowohl bei der Kalium-, der Carbachol-, als auch bei der DMPP-induzierten Freisetzung wurde bei der zweiten Stimulation jeweils annähernd der maximale Oxidationsstrom bzw. der AUC-Wert der ersten Stimulation erreicht. Bei Stimulation mit Kalium und Carbachol wurde bei einigen Versuchen die Freisetzung nicht durch direkte Superfusion, sondern durch Einwaschen der Stimulationslösung in die Versuchskammer induziert. Dabei kam es zu einem etwas langsameren Aufstieg des Oxidationsstroms (vgl. Abb. 83). Außerdem war bei der Kalium-induzierten

Freisetzung die zweite Stimulation gegenüber der ersten Stimulation leicht erhöht (AUC der zweiten Stimulation betrug 125% der AUC der ersten Stimulation, vgl. Abb. 83 E). Durch das Einwaschen kommt es zu einem graduellen Anstieg der Kalium-Konzentration in der Badlösung. Auch war das Präparat nicht, wie bei der Superfusion, direkt den aus der Pipette strömenden Lösungen ausgesetzt wodurch freigesetzte Substanzen, die eine Autoinhibition bewirken, länger am Präparat verbleiben können. Dies könnte zu einer langsameren und weniger starken Freisetzung bereits bei der ersten Stimulation geführt haben, wodurch es zu einer geringeren Entleerung der Vesikel-Speicher kam. Außerdem zeigen die verschiedenen spannungsabhängigen Calcium-Kanäle unterschiedliche Aktivierungs-Kinetik. Somit könnte es bei der Superfusion und bei Einwaschen der Stimulationslösung zu einer unterschiedlichen Aktivierung der Kanäle gekommen sein.

Durch die oben beschriebenen Versuche wurde gezeigt, dass mit der Voltammetrie die Wirkung von Substanzen auf die Freisetzung am Nebennieren-Schnitt direkt untersucht und eine Aussage über deren Beeinflussung von N-Cholinozeptoren und spannungsabhängigen Calcium-Kanälen getroffen werden kann. Durch die wiederholte Stimulation wurde ein Bezugspunkt geschaffen, so dass die Wirkung von Substanzen unabhängig von individuellen Schwankungen der Freisetzung beurteilt werden kann.

4.1.2.2 Amperometrie an PC12-Zellen

Mit Hilfe der **Amperometrie** kann sowohl die Häufigkeit (Frequenz) der Freisetzung aus einem Vesikel, als auch die Menge der pro Vesikel freigesetzten Neurotransmitter bestimmt werden.

PC12-Zellen wurden je nach dem, ob die Wirkung von (-)-Menthol oder von Magnesium untersucht werden sollte, entweder mit 70 mM Kalium oder mit 80 mM Kalium stimuliert. Dabei fiel auf, dass die durchschnittlich pro Vesikel freigesetzte Menge an Katecholaminen bei der Stimulation mit 70 mM Kalium bei 97 zeptomol und bei der Stimulation mit 80 mM Kalium bei 284 zeptomol lag. Dies könnte zum einen an der Verwendung von PC12-Zellen mit unterschiedlicher Anzahl an Zellpassagen liegen. Eine andere Erklärung dafür könnte auch der sogenannte Mechanismus der „Compound Fusion“ sein. Bei chromaffinen Zellen kommt es bei starker Stimulation und hoher intrazellulärer Calcium-Konzentration zur Fusion einzelner Vesikel unmittelbar vor oder während der Exocytose (Garcia *et al.*, 2006). Dieser Vorgang könnte einen erhöhten Katecholamin-Gehalt pro Freisetzung bei Stimulation mit höherer Kalium-Konzentration erklären. In ihrer Größenordnung stimmen die hier erzielten Werte mit den Werten in der Literatur überein. Westerink *et al.* beobachteten z.B. bei einer Stimulation mit 125 mM Kalium einen mittleren

Gehalt an Katecholaminen von 182 zeptomol pro Freisetzung (Westerink *et al.*, 2000).

Mittels Amperometrie an PC12-Zellen werden meist Substanzen untersucht, die selbst eine Freisetzung induzieren können. Da es bei längerer Stimulation von PC12-Zellen relativ schnell zu einer Verminderung der Freisetzung kommt, gestaltet sich die Untersuchung von Substanzen, die selbst keine Freisetzung induzieren, sondern nur die Freisetzung beeinflussen, relativ schwierig. Bei wiederholter Stimulation (mit 70 mM Kalium) kam es bei der 2. Stimulation zu einer deutlichen Reduktion der Freisetzungsfrequenz, was auf eine schnelle Entleerung bzw. langsame Regeneration des freisetzungsbereiten Vesikelpools in den PC12-Zellen hindeutet. Die durchschnittliche Menge an Katecholaminen pro Einzelfreisetzung stieg bei wiederholter Stimulation allerdings an. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es bei einem länger andauernden Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration in der präsynaptischen Zelle bereits vor der Exocytose zu einer Fusion einzelner Vesikel kommen könnte.

4.1.2.3 Bestimmung der Katecholamin-Konzentration mittels HPLC

Durch die Untersuchung der Katecholamin-Freisetzung mittels HPLC sollte v.a. die Freisetzung von Adrenalin und Noradrenalin differenziert betrachtet werden. An Nebennieren-Schnitten konnte bei Stimulation mit Kalium ein deutlicher Anstieg der Katecholamin-Konzentration im Perfusat nachgewiesen werden. Der Anteil von Noradrenalin an den insgesamt freigesetzten Katecholaminen betrug dabei bei der ersten Stimulation im Mittel zwischen 30% und 40%. Dies entspricht den Angaben, dass von der Nebenniere ca. 20% - 30% Noradrenalin und 70% - 80% Adrenalin freigesetzt werden. Bei wiederholter Stimulation mit Kalium war die Katecholamin-Konzentration im Perfusat bei der zweiten Stimulation deutlich höher als bei der ersten Stimulation (NA: Anstieg um den Faktor 2,3; Adrenalin: Anstieg um den Faktor 1,8; vgl. Abb. 91). Diese Ergebnisse unterscheiden sich deutlich von den Ergebnissen der voltammetrischen Messungen, bei denen die Kalium-Konzentration mittels Superfusion abrupt verändert wurde. Hier war bei der zweiten Stimulation kein Anstieg des Oxidationsstroms gegenüber der ersten Stimulation zu beobachten. Bei einem Teil der voltammetrischen Messungen wurde die Kalium-Konzentration dagegen nicht mittels Superfusion, sondern durch Einbringen der Stimulationslösung am Rand der Versuchskammer erhöht. Bei diesen Versuchen konnte wie bei den HPLC-gestützten Untersuchungen eine Erhöhung des Messsignals bei der zweiten Stimulation beobachtet werden (Anstieg der AUC um den Faktor 1,3). Auch hier kam es, wie bei der Perfusion, zu einem langsamen Anstieg der Kalium-Konzentration am Präparat. Dadurch könnten bei der 1. Stimulation weniger Vesikel entleert werden, die dann bei der 2. Stimulation noch zur Verfügung stehen.

4.2 Beurteilung der Wirkung der untersuchten Substanzen

4.2.1 Veratrum-Alkaloide

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der Ceveratrum-Alkaloide Veratridin, Cevadin, Germitrin und Germin-3-Acetat und des Jerveratrum-Alkaloids Veratramin untersucht. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse am Ductus deferens wurden Veratramin und Veratridin für weiterführende Versuche an der Nebenniere der Ratte ausgewählt.

4.2.1.1 Jerveratrum-Alkaloid Veratramin

Von Gödecke (1997) wurde gezeigt, dass Veratramin glattmuskuläre Calcium-Kanäle blockieren kann. Am Herzen fand Gödecke eine negativ inotrope Wirkung von Veratramin, die auf eine Calcium-Kanal blockierende Wirkung zurückgeführt werden kann. Außerdem können höhere Dosen einen besonderen periodischen Rhythmus am Sinusknoten induzieren, der von Phasen ohne elektrischer Aktivität und Phasen mit normalem Sinus-Rhythmus geprägt ist (Sures *et al.*, 1979; Thron *et al.*, 1999; Thron *et al.*, 1998). Von Gödecke wurde aufgrund von Versuchen am Herzmuskel auch eine Kalium-Kanal blockierende Wirkung von Veratramin vermutet (Gödecke, 1997).

Diese Daten aus der Literatur lassen eher auf eine hemmende Wirkung von Veratramin auf die Neurotransmitter-Freisetzung schließen. Dies konnte sowohl am Ductus deferens als auch am Nebennierenmark bestätigt werden. Allerdings ergaben sich Unterschiede in der Wirkung auf die Freisetzung und auf die glatte Muskulatur in Abhängigkeit von der Veratramin-Konzentration.

Aufgrund der von Gödecke gefundenen hemmenden Wirkung von Veratramin auf den L-Typ-Calcium-Kanal wurde auch eine Hemmung der Kontraktionskraft am Ductus deferens erwartet. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Konzentrationsbereich von 1 μM bis 80 μM untersucht. Ab einer Konzentration von 10 μM kam es bei elektrischer Stimulation und ab einer Konzentration von 30 μM bei NA-induzierter Kontraktion zu einer starken Hemmung der Kontraktionskraft. Im Bereich von 1 μM bis 10 μM führte Veratramin allerdings sowohl bei elektrisch induzierter als auch bei NA-induzierter Kontraktion in gleichem Maße zu einer leichten Steigerung der Kontraktionskraft. Damit scheint dieser Effekt eher durch eine direkte Beeinflussung der glatten Muskulatur zustande zu kommen.

Von Gödecke wurde am Papillarmuskel des Meerschweinchens eine Verlängerung der Kontraktionsdauer durch Veratramin beobachtet, die wahrscheinlich auf eine Verlängerung der Aktions-Potential-Dauer zurückgeführt werden kann. Deshalb wurde neben der hemmenden Wirkung auf Calcium-Kanäle auch eine hemmende

Wirkung auf Kalium-Kanäle postuliert (Gödecke, 1997). Diese Wirkung könnte auch am glatten Muskel zum Tragen kommen. Am Ductus deferens wird die NA-induzierte Kontraktion zu einem großen Teil vom Calcium-Einstrom über spannungsabhängige Calcium-Kanäle getragen. Die Blockade von Kalium-Kanälen könnte die Repolarisation verzögern und so zunächst der Calcium-Kanal-hemmenden Wirkung von Veratramin entgegenwirken. Trotz reduziertem Calcium-Einstrom über den Calcium-Kanal könnte es zunächst durch dessen längere Öffnung insgesamt zu einem Anstieg der Calcium-Konzentration in der Muskelzelle kommen. In diesem Fall würde erst in höheren Konzentrationen ($> 30 \mu\text{M}$) die Hemmung des Calcium-Kanals überwiegen und die Kontraktionskraft unter Veratramin abnehmen. An den sympathischen Nervenbahnen scheint Veratramin in niedrigen Konzentrationen zunächst keinen Einfluss auf die Freisetzung zu haben. Bei einer Konzentration von über $10 \mu\text{M}$ wurde diese allerdings deutlich reduziert (Verminderung der Freisetzung um 24% mit $10 \mu\text{M}$). Eine maximale Hemmung der Freisetzung wurde bei $30 \mu\text{M}$ Veratramin gefunden (praktisch vollständige Unterdrückung der Freisetzung). Bei $80 \mu\text{M}$ Veratramin lässt diese Wirkung jedoch bereits wieder etwas nach.

Sowohl die Applikation des P2X-Rezeptor-Blockers NF279 als auch eine Vorbehandlung der Ratten mit Reserpin beeinflussten die Veratramin-Wirkung auf die elektrische Stimulation kaum. Der EC_{50} -Wert bei elektrischer Stimulation lag bei $27,1 \mu\text{M}$, unter NF279 bei $35,6 \mu\text{M}$ und unter Reserpin bei $33,2 \mu\text{M}$. Die Freisetzung und postsynaptische Wirkung von NA und ATP am Ductus deferens scheint also gleichermaßen durch Veratramin beeinflusst zu werden.

Auch bei der direkten Messungen der Freisetzung am Nebennierenmark wurde eine hemmende Wirkung von Veratramin auf die Freisetzung gefunden. Voltammetrische Untersuchungen ergaben eine Verminderung der Kalium-induzierten Freisetzung. Hier war die Wirkung von $10 \mu\text{M}$ Veratramin (Reduktion der Freisetzung um ca. 43%) stärker als die Wirkung von $80 \mu\text{M}$ (Reduktion der Freisetzung um ca. 25%). Im Vergleich zum Ductus deferens ist die Wirkung von $10 \mu\text{M}$ damit stärker und die von $80 \mu\text{M}$ schwächer ausgeprägt. Die Tendenz, dass mit zunehmender Konzentration die Wirkung auf die Freisetzung wieder nachlässt, stimmt allerdings überein. Eine Ursache für die unterschiedlich starke Wirkung könnte sein, dass am Nebennierenmark und am Ductus deferens die Freisetzung von unterschiedlichen Calcium-Kanälen getragen wird (Chromaffine Zellen: Hauptsächlich L-Typ, Ductus deferens: Hauptsächlich N-Typ). Diese könnten unterschiedlich stark von Veratramin beeinflusst werden.

Die Hemmung der Katecholamin-Freisetzung durch Veratramin konnte auch durch die Bestimmung der Katecholamin-Freisetzung am Nebennierenmark mittels HPLC bestätigt werden. $10 \mu\text{M}$ Veratramin führten hier gegenüber den Kontrollwerten zu einer Verminderung der Adrenalin- und Noradrenalin-Freisetzung. Eine unterschiedliche Beeinflussung der Freisetzung der beiden Katecholamine konnte dabei nicht festgestellt werden.

4.2.1.2 Ceveratrum-Alkaloide

Alle hier untersuchten Ceveratrum-Alkaloide sind für ihre Natrium-Kanal-aktivierende Wirkung bekannt. Allerdings wurden individuelle Unterschiede in ihrer Wirkstärke gefunden. Im Folgenden sollen nun zunächst die Wirkungen der einzelnen Ceveratrum-Alkaloide auf die NA-induzierten und elektrisch induzierten Kontraktionen und die daraus resultierende Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung am Ductus deferens miteinander verglichen werden. Im Anschluss wird die Wirkung von Veratridin unter Einbeziehung der weiteren Untersuchungen diskutiert.

4.2.1.2.1 Veratridin

Veratridin gilt allgemein als Aktivator von spannungsabhängigen Natrium-Kanälen. Durch elektrophysiologische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Veratridin die Inaktivierung von Natrium-Kanälen verzögert (Ulbricht, 1998). In Konzentrationen über 10 μM kann es auch zur Öffnung von spannungsabhängigen Natrium-Kanälen kommen (Honerjäger, 1982). Es gibt außerdem Hinweise auf eine spontane NA-Freisetzung am Ductus deferens besonders bei hohen Konzentrationen von Veratridin (30 – 100 μM) (Bönisch *et al.*, 1983). Dafür wurden von Bönisch *et al.* drei mögliche Mechanismen diskutiert:

- Calcium-abhängige Exocytose.
- Calcium-unabhängiger Transport von freiem NA über den Monoamin-Transporter der neuronalen Zellen, bedingt durch die erhöhte Natrium-Konzentration in der Zelle.
- Eine Reserpin-artige Wirkung von Veratridin direkt an den Vesikeln, die zu einer Entleerung der Vesikel-Speicher führt. Dieser Mechanismus wäre unabhängig von Natrium-Kanälen, da er nicht von TTX beeinflusst wird.

In der vorliegenden Arbeit sollte allerdings die Wirkung von Veratridin im niedrigen Konzentrationsbereich untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass Veratridin auch im niedrigen Konzentrationsbereich von 0,3 μM bis 1 μM am Ductus deferens die Freisetzung beeinflusst. Veratridin konnte in dieser Konzentration zwar ohne zusätzliche Stimulation keine Kontraktion induzieren, die Kontraktion bei Elektro-Stimulation wurde allerdings deutlich gesteigert. Da die NA-induzierte Kontraktion nicht beeinflusst wurde, kann dieser Effekt vermutlich auf die neuronale Wirkung von Veratridin zurückgeführt werden. Ein verlängerter Natrium-Einstrom führt zu einer Verlängerung der Depolarisation der Nervenzelle, wodurch spannungsabhängige Calcium-Kanäle länger offen bleiben. Dadurch kann mehr Calcium präsynaptisch in die Zellen einströmen und so die Freisetzung gesteigert werden. Außerdem kann durch den Anstieg der intrazellulären Natrium-Konzentration der Calcium--Auswärtstransport über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher gehemmt werden, was zu einer

Verstärkung des Effektes führt. Mit steigender Konzentration (ab 1 μM) nimmt dieser Effekt jedoch wieder ab und es treten zunehmend Kontraktionen der Muskulatur auf. Dies weist, trotz der fehlenden Wirkung auf die NA-induzierte Kontraktion, auf einen zusätzlichen, direkten Effekt von Veratridin auf die glatte Gefäßmuskulatur hin. Natrium-Kanäle spielen offenbar auch bei der Erregung der glatten Muskelzellen des Ductus deferens eine gewisse Rolle. Von Holman et al. (1995) wurde gezeigt, dass bei einem Ruhemembranpotential von etwa -60 mV in „aktiven“ Zellen biphasische Aktionspotentiale ausgelöst werden konnten, wobei die schnelle Komponente von Natrium-Ionen und die langsame Komponente von Calcium-Ionen getragen wurde. Belevych et al. (1999) fand allerdings in einer späteren Untersuchung, dass das Ruhemembranpotential nur etwa -43 mV betrug und deshalb nur etwa 10% der Natrium-Kanäle, aber 90% der Calcium-Kanäle sich in einem aktivierbaren Zustand befanden. Dies hätte zur Folge, dass die Aktionspotentiale primär Calcium-getragen sind und Natrium-Ionen bei der Erregung nur eine Nebenrolle spielen. Trotzdem könnten diese Kanäle von Bedeutung sein, wenn unter dem Einfluss von Veratridin deren Inaktivierung verzögert ist. Dies könnte, wie für die Nervenzelle bereits diskutiert, auch an den glatten Muskelzellen zu einer Verlängerung der Depolarisation und damit zu einem verlängerten Calcium-Einstrom führen. Zusätzlich könnte eine Zunahme der intrazellulären Natrium-Konzentration die Elimination von Calcium aus der Zelle via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher verschlechtern und im Extremfall zu einer Umkehr der Funktion dieses Austauschers mit der Folge eines Calcium-Einwärtstransports in die Zelle führen.

Bei elektrischer Stimulation ist an diesem Effekt wahrscheinlich auch das freigesetzte ATP beteiligt, das zusätzlich postsynaptisch Calcium-permeable Ionenkanäle aktivieren kann. Unter NF279 wurden keine Kontraktionen beobachtet, allerdings nahm auch hier die Kontraktionskraft ab 1 μM mit steigender Veratridin-Konzentration ab. Trotz der Unterdrückung der ATP-Wirkung kommt es postsynaptisch wahrscheinlich auch zu einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration, der aber geringer ausfällt, so dass die Schwelle zur Kontraktur noch nicht überschritten wird.

Bei Vorbehandlung der Ratten mit Reserpin ist die steigernde Wirkung von Veratridin auf die elektrisch induzierte Kontraktion stärker ausgeprägt als ohne Reserpin. Es kommt außerdem bei höheren Konzentrationen Veratridin nicht zu einer Abnahme der Kontraktionskraft. Außerdem konnten keine Kontraktionen beobachtet werden. Hier ist zum einen zu berücksichtigen, dass die absolute Kontraktion durch Reserpin stark vermindert wurde. Der steigernde Effekt durch Veratridin könnte so stärker ins Gewicht fallen. Zum anderen wurde gezeigt, dass Reserpin auch eine direkte Calcium-antagonistische Wirkung besitzt. Dadurch könnte einer Calcium-Überladung entgegengewirkt werden.

Eine Erhöhung der Katecholamin-Freisetzung durch Veratridin konnte auch mit Hilfe voltammetrischer Messungen am Nebennierenmark nachgewiesen werden. Bereits

früher war gezeigt worden, dass hohe Konzentrationen Veratridin (30 μM) ohne zusätzliche Stimulation eine Katecholamin-Freisetzung an der Nebenniere induzieren können (Kirpekar *et al.*, 1979). Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen, bei denen eine niedrige Veratridin-Konzentration verwendet wurde, führte Veratridin, wie am Ductus deferens, ohne Stimulation nicht zu einer Freisetzung. Die Kalium-induzierte Freisetzung wurde aber durch 0,5 μM Veratridin um ca. 40% gesteigert. Die Wirkung war damit etwas schwächer als am Ductus deferens. Dieser Unterschied könnte damit zusammenhängen, dass am Ductus deferens die postsynaptische Konzentration von Katecholaminen unter Veratridin zusätzlich erhöht wird, da der Wiederaufnahmemechanismus für NA in das präsynaptische Neuron über den Na^+ /Monoamin-Cotransporter durch die erhöhte Natrium-Konzentration vermindert wird. Dadurch könnte der Effekt von Veratridin verstärkt werden. An chromaffinen Zellen der Nebenniere spielt die Wiederaufnahme von Katecholaminen dagegen keine Rolle (Borges, 1997). Spannungsabhängige Natrium-Kanäle der chromaffinen Zellen haben im Vergleich mit den sympathischen Neuronen wahrscheinlich nur eine untergeordnete Bedeutung. Sie sind z.B. an der Bildung spontaner Aktionspotentiale (Marcantoni *et al.*, 2007) beteiligt. Bei der Kalium-induzierten Freisetzung scheinen sie eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Borges (1997) fand z.B. dass die Kalium-induzierte Freisetzung, anders als die Acetylcholin-induzierte Freisetzung, nicht durch TTX beeinflussbar ist. Es scheinen also ähnlich Verhältnisse wie am glatten Muskel des Ductus deferens zu herrschen. Durch die Veratridin-bedingte Verzögerung der Inaktivierung von spannungsabhängigen Natrium-Kanälen scheint es aber, trotz deren geringer direkter Beteiligung, zu einer Steigerung der Kalium-induzierten Freisetzung zu kommen.

Überraschenderweise wurde die Carbachol- und DMPP-induzierte Freisetzung durch Veratridin deutlich reduziert. Carbachol und DMPP aktivieren N-Cholinozeptoren, die unspezifische Kationen-Kanäle sind und v.a. eine Permeabilität für Natrium aber auch für Calcium aufweisen. Zudem fand Borges (1997), dass die durch Acetylcholin induzierte Freisetzung an der perfundierten Nebenniere, bei der es auch zur Aktivierung von N-Cholinozeptoren kommt, durch TTX vermindert wird. Umso erstaunlicher ist es, dass die durch N-Cholinozeptoren vermittelte Freisetzung durch Veratridin in der vorliegenden Arbeit gehemmt wurde. Eine mögliche Erklärung dafür wäre ein direkter hemmender Einfluss von Veratridin auf die Funktion des N-Cholinozeptors. Betrachtet man die Versuchsergebnisse genauer, so fällt auf, dass die Freisetzung zunächst mit gleicher Geschwindigkeit wie bei den Kontrollen beginnt, dann aber frühzeitig abgebremst wird. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Interaktion zwischen Veratridin und N-Cholinozeptor nicht direkt, sondern indirekt stattfindet. So könnte die Akkumulation von Natrium ab einer kritischen Konzentration zu einer Funktionseinschränkung des N-Cholinozeptors führen. Genaue Untersuchungen des N-Cholinozeptors haben gezeigt, dass es für Natrium neben

Bindungsstellen im Kanal auch extrazelluläre und intrazelluläre Bindungsstellen gibt (Haddadian *et al.*, 2008).

Möglicherweise führt eine höhere intrazelluläre Natrium-Konzentration nach Bindung von Natrium an die intrazelluläre Bindungsstelle zu einer Reduktion der Leitfähigkeit oder einer Änderung der Ionenselektivität des Kanals. Weitere Untersuchungen sind notwendig um diesen Sachverhalt aufzuklären.

Mittels HPLC-Untersuchungen konnte keine Erhöhung der Kalium-induzierten Freisetzung gefunden werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die HPLC-Methode weniger sensitiv ist, wodurch die geringere Steigerung der Freisetzung am Nebennierenmark u.U. nicht erfasst wurde. Zum anderen kommt es, bedingt durch den Versuchsaufbau bei diesen Experimenten, zu einem langsamen Anstieg der Kalium-Konzentration am Präparat. Dadurch könnten spannungsabhängige Natrium-Kanäle sukzessive in den geschlossen-inaktiven Zustand übergehen. Veratridin, das in diesen Konzentrationen keine direkte Öffnung von Natrium-Kanälen bewirkt, sondern die Inaktivierung von bereits geöffneten Natrium-Kanälen verzögert, kann dadurch weniger stark wirken.

4.2.1.2.2 Cevadin

An kultivierten ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte wurde gefunden, dass Cevadin (10 μM bis 30 μM), wie Veratridin, die Inaktivierung von Natrium-Kanälen verzögert (Honerjäger *et al.*, 1992).

Von Honerjäger wurde außerdem die Wirkung von Cevadin an kultivierten Neuroblastoma-Zellen untersucht. Dabei wurde die Aufnahme von $^{22}\text{Na}^+$ gemessen. Bis zu einer Konzentration von 1 mM konnte Cevadin keine Steigerung des Natrium-Einstroms induzieren und antagonisierte sogar den stimulierenden Effekt des Veratridins (Honerjäger *et al.*, 1982). Eine sich gegenseitig hemmende Wirkung von Veratridin und Cevadin weist auf eine Konkurrenz der beiden Substanzen hin (Honerjäger *et al.*, 1992).

Am Ductus deferens konnte bestätigt werden, dass Cevadin in seiner Wirkung dem Veratridin sehr ähnlich ist. Auch hier kam es wie unter Veratridin im Bereich zwischen 0,3 μM bis 1 μM zu einer Erhöhung der durch elektrische Stimulation induzierten Kontraktion. Die Wirkung ließ ab 1 μM zwar wieder nach, die elektrisch induzierte Kontraktion wurde allerdings nicht wie mit Veratridin gehemmt. Im Verlauf entsprach also die Cevadin-Wirkung der Wirkung von Veratridin. Sowohl die Steigerung der Kontraktionskraft im niedrigeren Konzentrationsbereich, als auch die ab 0,7 μM einsetzende Verminderung der Wirkung fielen aber insgesamt geringer aus. Ab einer Konzentration von 1,3 μM kam es allerdings unter Cevadin zusätzlich zu einer Steigerung der NA-induzierten Kontraktion, die unter Veratridin nicht beobachtet wurde. Cevadin könnte also auf glattmuskuläre Natrium-Kanäle eine andere Wirkung als Veratridin haben.

Aus den Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die Neurotransmitter-Freisetzung ähnlich wie unter Veratridin, gesteigert wird. Allerdings ist die Erhöhung der

Freisetzung nicht so stark ausgeprägt. Der Abfall der Kontraktionskraft bei höheren Konzentrationen könnte wie unter Veratridin auf eine Natrium-Überladung der glatten Muskulatur zurückzuführen sein. Kontraktionen konnten mit Cevadin allerdings nicht beobachtet werden.

4.2.1.2.3 Germin-3-Acetat

Auch Germin-3-Acetat wirkt am spannungsabhängigen Natrium-Kanal. An Nervenzellen verzögert es die Inaktivierung des Natrium-Kanals und verlängert so die Repolarisationsphase. Honerjäger (1973) beobachtete, wie mit Veratridin, eine Nachdepolarisation am Lobster-Axon. Germin-3-Acetat alleine konnte auch in millimolaren Konzentrationen an Nervenzellen keine spontane, anhaltende Depolarisation auslösen (Honerjäger, 1973). Am isolierten Meerschweinchen-Atrium führte Germin-3-Acetat (31 - 510 μM) zu einem durch Propranolol blockierbaren positiv chronotropen Effekt, was ein Hinweis auf eine Steigerung der Katecholamin-Freisetzung sein könnte. Allerdings kann Propranolol auch direkt auf spannungsabhängige Natrium-Kanäle am Herzen wirken (Honerjäger, 1982).

In Anlehnung an diese Untersuchung wurden am Ductus deferens Konzentrationen von 50 μM bis 700 μM verwendet.

Hier zeigte Germin-3-Acetat auf die glatte Muskulatur und die Neurone eine unterschiedliche Wirkung. Bei Noradrenalin-induzierter Kontraktion nahm die Kraft mit steigender Germin-3-Acetat-Konzentration kontinuierlich zu, während bei elektrischer Stimulation die Kontraktion zunächst abfiel und erst in höheren Konzentrationen anstieg. Auf die Neurotransmitter-Freisetzung ergibt sich dadurch ein hemmender Effekt, der jedoch ab einer Konzentration von 100 μM wieder nachlässt.

Somit konnte die aufgrund der Versuche am Meerschweinchen-Herzen vermutete fördernde Wirkung auf die Katecholamin-Freisetzung durch die hier durchgeführten Versuche am Ductus deferens nicht bestätigt werden.

4.2.1.2.4 Germitrin

Obwohl auch für Germitrin eine Verzögerung der Inaktivierung von spannungsabhängigen Natrium-Kanälen postuliert wurde (Dugas *et al.*, 1989, Honerjäger, 1982), wirkte es am Ductus deferens deutlich hemmend auf die elektrisch induzierte Kontraktion. Die NA-induzierte Kontraktion wurde durch Germitrin kaum beeinflusst. In Kontrollversuchen am Papillarmuskel der Ratte und des Meerschweinchens führte Germitrin dagegen zu einer deutlichen Steigerung der elektrisch induzierten Kontraktion. Somit konnte die bereits von Honerjäger beschriebene positiv inotrope Wirkung bestätigt werden (Honerjäger, 1982). Die Differenz-Kurve aus den Konzentrations-Wirkungskurven bei elektrischer Stimulation und Stimulation mit NA am Ductus deferens weist auf eine hemmende Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung hin.

Die Hemmung der elektrisch induzierten Kontraktion könnte allerdings, wie die hemmende Wirkung des Veratridins, mit einer Natrium-Überladung der glatten Muskel-Zelle erklärt werden. Somit könnte der Rückschluss auf die Wirkung von Germitrin auf die Neurotransmitter-Freisetzung durch Differenzbildung der Wirkungskurven bei elektrischer Stimulation und Stimulation mit NA in diesem Falle eventuell nicht sinnvoll sein. Der abfallende Verlauf der Differenzkurve könnte alleine auf die Verminderung der Kontraktion des glatten Muskels bei elektrischer Stimulation zurückzuführen sein.

Für eine geringe Wirkung von Germitrin auf die Neurotransmitter-Freisetzung sprechen auch die Versuche von Honerjäger. Germitrin zeigte zwar bei dessen Untersuchungen am Papillarmuskel die stärkste positiv inotrope Wirkung von den untersuchten Ceveratrum-Alkaloïden. Allerdings wurde von Honerjäger (1973) auch die Wirkung eines Germin-Monoacetats, eines Germin-Triacetats und eines Germin-Tetraacetats auf das Aktionspotential am Lobster-Axon untersucht. Mit steigender Anzahl der Estergruppen nahm die Wirkung der Germin-Ester ab. Das Di- und das Tetraacetat führten erst ab einer Konzentration von 1 mM zu einer Nachdepolarisation. Wenn sich Germitrin, dessen Wirkung am Lobster-Axon von Honerjäger nicht untersucht wurde, als Triester in diese Reihe einordnet, könnte es u.U. auf die Neurotransmitter-Freisetzung direkt nur eine geringe Wirkung haben.

4.2.1.3 Vergleich der Wirkungen der Ceveratrum-Alkaloïde am Ductus deferens

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von 4 Vertretern der Gruppe Ceveratrum-Alkaloïde (Veratridin, Cevadin, Germitrin und Germin-3-Acetat) und von Veratramin, einem Vertreter der Gruppe Jerveratrum-Alkaloïde, am Ductus deferens untersucht. Da die 4 Ceveratrum-Alkaloïde strukturell verwandt sind, soll deren Wirkung im Folgenden verglichen werden. Einen Überblick über die Wirkungen der einzelnen Substanzen bietet Tabelle 20.

Veratridin und Cevadin sind beide Veracevin-Ester und unterscheiden sich nur in ihrer Estergruppe am C3-Atom. Veratridin trägt hier eine Veratroyl-, Cevadin eine Angeloyl-Gruppe. Auch die Wirkungen beider Substanzen am Ductus deferens sind teilweise vergleichbar. Beide Substanzen wirkten ähnlich auf die elektrisch induzierte Kontraktion. Zunächst führten sie in etwa gleichem Ausmaß zu einer Steigerung der Kontraktionskraft und dann ab einer Konzentration von 1 μ M zu einer Verminderung. Auch die Neurotransmitter-Freisetzung am Ductus deferens wurde sowohl von Veratridin als auch von Cevadin zunächst erhöht und in höheren Konzentrationen vermindert. Die Erhöhung der Neurotransmitter-Freisetzung durch Cevadin war allerdings etwas geringer als die durch Veratridin. Cevadin steigerte zusätzlich ab einer Konzentration von 1 μ M die NA-induzierte Kontraktion.

Germitrin und Germin-3-Acetat besitzen eine Germin-Grundstruktur. Germitrin ist ein Triester am C3, C7 und C15-Atom, Germin-3-Acetat ist ein Monoester am C3-Atom.

Hier kann aufgrund des untersuchten Konzentrationsbereichs nur Germitrin mit der Wirkung von Veratridin und Cevadin verglichen werden. Ein Vergleich mit Germin-3-Acetat ist problematisch, da für diese Substanz wesentlich höhere Konzentrationen gewählt wurden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in der Literatur Daten vorhanden sind (Honerjäger, 1982), die darauf hinweisen, dass Germin-3-Acetat erst bei relativ hohen Konzentrationen zu einer Beeinflussung der Natrium-Kanäle führt. Germitrin hatte wie Veratridin im untersuchten Konzentrationsbereich keine wesentliche Wirkung auf die NA-induzierte Kontraktion, zeigte aber, anders als Veratridin, eine hemmende Wirkung auf die elektrisch induzierte Kontraktion über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich, so dass angenommen werden kann, dass durch Germitrin die Neurotransmitter-Freisetzung reduziert wird.

Substanz	Untersuchter Konzentrations-Bereich	Wirkung auf NA-induzierte Kontraktion	Wirkung auf elektrisch induzierte Kontraktion	Verlauf der Differenzkurve
Veratridin	0,3 – 2 μM	keine Wirkung	Steigerung (EC ₅₀ : 0,22 μM), ab 1,0 μM Hemmung	ansteigend, ab 1,0 μM abfallend
Cevadin	0,3 – 2 μM	ab 1 μM leichte Steigerung (EC ₅₀ : 1,4 μM), ab 1,7 μM Abnahme der Wirkung	Steigerung (EC ₅₀ : 0,19 μM), ab 1,0 μM Abnahme der Wirkung	ansteigend, ab 1,0 μM abfallend
Germitrin	0,01 - 4 μM	keine Wirkung	Hemmung (EC ₅₀ : 2,3 μM)	abfallend
Germin-3-Acetat	50 - 700 μM	Steigerung (EC ₅₀ : 466,4 μM)	Zuerst leichte Hemmung, dann Steigerung	abfallend

Tabelle 20

Zusammenfassung der Wirkung der untersuchten Ceveratrum-Alkaloide am Ductus deferens.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen kann geschlossen werden, dass die Grundstruktur wahrscheinlich die Art der Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung bestimmt (Veracevin-Ester: Steigerung, Germin-Ester: Hemmung). Um auch eine detaillierte Aussage über den Einfluss der Ester-Gruppen treffen zu können, müssten allerdings noch weitere Veratrum-Alkaloide untersucht werden. Außerdem kann Germitrin und Germin-3-Acetat nicht direkt verglichen werden, da aufgrund von Literaturdaten unterschiedliche Konzentrationsbereiche für die Untersuchung gewählt wurden. In der Literatur gibt es zur Struktur-Wirkungsbeziehung folgende Daten: Honerjäger (1973) führte Untersuchungen mit

verschiedenen Veratrum-Alkaloiden hinsichtlich ihrer Wirkung am isolierten Lobster-Axon durch. Alle untersuchten Alkaloide verlängerten die Repolarisationsdauer des Aktionspotentials. Innerhalb der Veracevin-Ester bestimmte die Ester-Gruppe am C3-Atom das Maß der Verlängerung der Repolarisationsphase (Angeloyl: Plateau-Nachdepolarisation, Veratoyl: negatives Nachpotential) und in umgekehrter Reihenfolge die Schwellenkonzentration, bei der es zu einer Nachdepolarisation kam (Veratoyl > Angeloyl). Allerdings zeigten bei dieser Untersuchung auch Germin-Ester eine verlängernde Wirkung auf die Repolarisationsdauer.

Auch der positiv inotrope Effekt am Papillar-Muskel des Meerschweinchens scheint von der Veresterung abzuhängen und mit steigender Anzahl an Ester-Gruppen zuzunehmen. Die Wirkreihenfolge war Germitrin > Veratridin > Cevadin > Germin-3-Acetat (Honerjäger, 1982).

4.2.1.4 Gesamtextrakt

Der Gesamtextrakt wurde in Form der Urtinktur untersucht. Die untersuchten Konzentrationen an Veratrum-Alkaloiden, berechnet als Protoveratrin A, lagen dabei im Bereich von 15,5 bis 666,1 µg/ml. Grundlage dieser Berechnung war der mittlere Alkaloid-Gehalt von 1,75% Veratrum-Alkaloide, berechnet als Protoveratrin A (laut Analysenzertifikat der Firma Spagyra, vgl. Tabelle 9).

Im niedrigeren Konzentrationsbereich (bis 66,6 µg/ml) wurde die NA-induzierte Kontraktion deutlich gesteigert, während die elektrisch induzierte Kontraktion in diesem Konzentrationsbereich nicht beeinflusst wurde. Für die Neurotransmitter-Freisetzung ergibt sich dadurch eine Hemmung. Bei höheren Konzentrationen nahm die steigernde Wirkung auf die glatte Muskulatur wieder ab.

Einen ähnlichen Wirkungsverlauf (zunächst steigernd, in höheren Konzentrationen wieder abnehmend) auf die glatte Muskulatur zeigte das Jerveratrum-Alkaloid Veratramin. Die steigernde Wirkung war allerdings geringer ausgeprägt. Auch Cevadin zeigte ab einer Konzentration von 1 µM einen ähnlichen Wirkungsverlauf, allerdings mit noch geringerer Wirkstärke. Die hemmende Wirkung des Gesamtextraktes auf die Neurotransmitter-Freisetzung nahm mit steigender Konzentration wieder deutlich ab. Hier zeigt sich eine Parallele zum Wirkungsverlauf von Veratramin (ab 10 µM) und Cevadin (ab 1 µM).

Insgesamt konnte eine ähnlich starke Wirkung wie die des Gesamtextraktes auf die glatte Muskulatur und die Freisetzung (bei 66,6 µg/ml eine maximale Steigerung der Kontraktionskraft der glatten Muskulatur um 115% und eine vollständige Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung, vgl. Abb. 49 C) im untersuchten Konzentrationsbereich bei keinem der Einzelsubstanzen beobachtet werden. Am ehesten wird der Wirkungsverlauf des Gesamtextraktes von der Einzelsubstanz Cevadin ab einer Konzentration von 1 µM repräsentiert. Allerdings konnte hier bei einer Konzentration von 1,7 µM nur eine maximale Steigerung der Kontraktionskraft

der glatten Muskulatur um 52% und eine maximale Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung um 46% beobachtet werden.

4.2.2 (-)-Menthol

Für (-)-Menthol sind im wesentlichen zwei Wirkmechanismen bekannt, wodurch die Katecholamin-Freisetzung beeinflusst werden könnte. Zum einen hemmt (-)-Menthol den Calcium-Einstrom in die Zelle durch Calcium-Kanäle. Dies wurde für HVA- und LVA-Calcium-Kanäle an Neuronen nachgewiesen (Swandulla *et al.*, 1987; Swandulla *et al.*, 1986). Eine hemmende Wirkung wurde auch an myokardialen und glattmuskulären Calcium-Kanälen gezeigt (Gödecke, 1997). Entsprechend wurde auch eine günstige Wirkung bei Kolon irritabile gefunden (Dew *et al.*, 1984; Pittler *et al.*, 1998; Rees *et al.*, 1979), die vermutlich sowohl auf eine spasmolytische Wirkung an der glatten Muskulatur als auch auf eine Verminderung der Neurotransmitter-Freisetzung am enteralen Nervensystem erklärt werden kann.

Zum anderen wurde für (-)-Menthol eine Wirkung an verschiedenen TRP-Kanälen (TRPM8, TRPV3 und TRPA1) gefunden. Menthol kann dadurch sensorische Nervenbahnen aktivieren.

Die direkte Wirkung von (-)-Menthol auf die Katecholamin-Freisetzung wurde allerdings bisher nur wenig untersucht. In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass (-)-Menthol abhängig vom untersuchten Präparat und von der Art der Stimulation sowohl einen positiven, als auch einen negativen Einfluss auf die Katecholamin-Freisetzung haben kann. Am Ductus deferens wurde die Wirkung von (-)-Menthol auf die elektrisch induzierte Kontraktion und auf die NA-, Kalium- und Tyramin-induzierte Kontraktion untersucht. Die Konzentrations-Wirkungskurve bei Stimulation mit Tyramin unterscheidet sich nicht von der Konzentrations-Wirkungskurve bei Stimulation mit NA. Daraus lässt sich schließen, dass (-)-Menthol die Calcium-Kanal-unabhängige Freisetzung durch Tyramin eher nicht beeinflusst. Auf Neurone und glatte Muskulatur zeigte (-)-Menthol generell eine hemmende Wirkung. Sowohl die elektrisch induzierte Kontraktion als auch die NA-induzierte Kontraktion wurden vermindert. Die Differenzkurve aus diesen beiden Konzentrations-Wirkungskurven zeigt, dass bis zu einer Konzentration von 100 μM v.a. die Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung durch (-)-Menthol im Vordergrund steht. Mit steigender Konzentration nimmt diese Wirkung ab und es konnte eine zunehmende direkte Hemmung der glatten Muskulatur beobachtet werden.

Während am Ductus deferens die Kalium-induzierte Kontraktion gehemmt wurde, ergab sich bei den voltammetrischen Messungen der Katecholamin-Freisetzung am Nebennierenmark eine Steigerung der Kalium-induzierten Freisetzung bei 100 μM (-)-Menthol. Bei einer Konzentration von 500 μM konnte dieser Effekt allerdings nicht mehr beobachtet werden. Die Erhöhung der Kalium-induzierten Freisetzung konnte auch mittels Amperometrie an PC-12-Zellen bestätigt werden. Hier führten 70 μM

(-)-Menthol zu einer Erhöhung der Freisetzungsfrequenz, wobei die Katecholamin-Menge pro Freisetzung unbeeinflusst blieb.

Im Gegensatz dazu wurde die Carbachol- und DMPP-induzierte Freisetzung am Nebennierenmark durch (-)-Menthol deutlich gehemmt.

Zusätzlich zu (-)-Menthol wurde auch die Wirkung von Icilin am Ductus deferens und am Nebennierenmark untersucht. Icilin ist wie (-)-Menthol ein Agonist am TRPM8 und am TRPA1-Kanal. Es gibt allerdings keine Daten, die auf eine zusätzliche Wirkung von Icilin am TRPV3-Kanal oder an spannungsabhängigen Calcium-Kanälen hindeuten. Somit können aufgrund eines Vergleichs der Wirkung von Icilin mit der Wirkung von (-)-Menthol Rückschlüsse auf dessen Wirkung an TRP-Kanälen gezogen werden. Icilin zeigte wie (-)-Menthol eine hemmende Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung am Ductus deferens und eine steigernde Wirkung auf die Kalium-induzierte Freisetzung am Nebennierenmark. Die anderen Effekte des (-)-Menthols (Hemmung der Kontraktionskraft der glatten Muskulatur unter NA und Hemmung der Carbachol- und DMPP-induzierten Freisetzung am Nebennierenmark) wurden mit Icilin aber nicht beobachtet. Somit scheint die hemmende Wirkung des (-)-Menthols auf die Kontraktion der glatten Muskulatur und auf die Carbachol-induzierte Freisetzung am Nebennierenmark eher durch dessen Calcium-Kanal-hemmende Eigenschaft zustande zu kommen.

Unter dem Einfluss des P2X-Rezeptor-Antagonisten NF279 kam es zu einer leichten Verstärkung der hemmenden Wirkung von (-)-Menthol auf die elektrisch induzierte Kontraktion am Ductus deferens. Durch NF279 wird die postsynaptische Aktivierung von P2X-Rezeptoren unterdrückt, während die Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren erhalten bleibt. Die Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass die Wirkung von (-)-Menthol bei einer α_1 -Adrenozeptor-vermittelten Kontraktion stärker zum Tragen kommt.

Aufgrund der ähnlichen Wirkung von (-)-Menthol und Icilin könnten sowohl an der Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung am Ductus deferens als auch an der Erhöhung der Kalium-induzierten Katecholamin-Freisetzung am Nebennierenmark TRP-Kanäle beteiligt sein. Eine Wirkung über den TRPM8-Kanal erscheint allerdings unwahrscheinlich, da Westernblot-Versuche zeigten, dass dieser zwar im Ductus deferens, nicht aber in der Nebenniere der Ratte exprimiert wird (Abb. 86). Außerdem führte Capsazepin, ein Antagonist am TRPM8-Kanal, nicht zu einer eindeutigen Hemmung der (-)-Menthol-Wirkung am Nebennierenmark (Abb. 82). Dagegen könnte der TRPA1-Kanal, der sowohl von (-)-Menthol als auch von Icilin aktiviert werden kann, an den unterschiedlichen Wirkungen beider Substanzen am Ductus deferens und am Nebennierenmark beteiligt sein. Der TRPA1-Kanal wird z.B. in sensorischen Neuronen exprimiert, die keinen TRPM8-Kanal aufweisen (Karashima *et al.*, 2007; Nassenstein *et al.*, 2008). Auch wurde der TRPA1-Kanal in menschlichem Blasen- und Prostata-Gewebe nachgewiesen. Dabei fiel auf, dass

auch hier TRPA1 und TRPM8 unterschiedlich exprimiert werden. So ist der TRPA1-Kanal z.B. in Blasen-Epithelzellen gefunden worden, der TRPM8-Kanal dagegen nicht (Du *et al.*, 2008). Am TRPA1-Kanal wurde für Menthol eine bimodale Aktivität gefunden. In Konzentrationen bis maximal 300 μM aktivierte Menthol den TRPA1-Kanal, während es bei einer Konzentration von 1 mM zu einem vollständigen Block kam (Karashima *et al.*, 2007). Dies könnte die konzentrationsabhängige Erhöhung der Kalium-induzierten Freisetzung am Nebennierenmark und die hemmende Wirkung am Ductus deferens erklären. Auch scheint für die Aktivierung des TRPA1-Kanals Calcium ein wichtiger Cofaktor zu sein (Dörner *et al.*, 2007). Außerdem ist Calcium selbst in der Lage den TRPA1-Kanal direkt zu aktivieren. Dabei scheint v.a. die intrazelluläre Calcium-Konzentration entscheidend zu sein (Dörner *et al.*, 2007; Zurborg *et al.*, 2007). Icilin zeigte z.B. erst in Kombination mit einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration durch Calcium-Einstrom oder Freisetzung aus intrazellulären Speichern seine vollständige Wirkung (Chuang *et al.*, 2004). So könnte auch die Modulation der TRPA1-Aktivität durch Calcium zur unterschiedlichen Wirkung sowohl von (-)-Menthol als auch von Icilin auf die Freisetzung beitragen. Am Nebennierenmark und an PC12-Zellen wurden hohe Kalium-Konzentrationen zur Stimulation verwendet (116 mM und 70 mM). Möglicherweise kam es hier zu einem starken Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration, die am Ductus deferens bei elektrischer Stimulation so nicht zustande kam.

Die Erhöhung der Kalium-induzierten Freisetzung durch (-)-Menthol konnte mittels der HPLC-gestützten Untersuchungen nicht nachgewiesen werden. Allerdings ist hier zu bedenken, dass die Stimulation durch Wechsel der Perfusions-Lösung induziert wurde, wodurch es zu einem langsamen Anstieg der Kalium-Konzentration in der Perfusions-Lösung kam. Sowohl an den Nebennieren-Schnitten, als auch an PC12-Zellen wurde dagegen mittels Superfusion stimuliert, wodurch es zu einem sehr raschen Anstieg der Kalium-Konzentration kam. Die Art der Stimulation bei den HPLC-gestützten Untersuchungen ist somit nicht direkt mit der Stimulation bei der Voltammetrie oder Amperometrie vergleichbar.

4.2.3 Erhöhung der extrazellulären Protonen-Konzentration

Auch die Auswirkung einer Absenkung des extrazellulären pH-Wertes von pH 7,4 auf pH 6,4 wurde am Ductus deferens und am Nebennierenmark mittels Voltammetrie untersucht. Die Erhöhung der Protonen-Konzentration führte dabei zu unterschiedlichen Ergebnissen: Am Ductus deferens führte eine Absenkung des pH-Wertes zwar zu einer Reduktion der Muskelkontraktion, die Neurotransmitter-Freisetzung schien allerdings nicht beeinflusst zu werden. Am Nebennierenmark dagegen kam es durch die Absenkung des pH-Wertes auf 6,4 zu einer rasch einsetzenden und langanhaltenden Freisetzung von Katecholaminen.

Protonen haben generell eine hemmende Wirkung auf Calcium-Kanäle (Krafte *et al.*, 1988; Tombaugh *et al.*, 1996; Tytgat *et al.*, 1990). Diese Wirkung könnte die

Verminderung der Kontraktionskraft der glatten Muskulatur am Ductus deferens erklären. Auch zahlreiche neuronale Calcium-Kanäle werden durch eine Erhöhung der extrazellulären Protonen-Konzentration (bis pH 6,25) beeinflusst (Döring *et al.*, 2007). Allerdings scheint es dadurch nicht zu einer Hemmung der Freisetzung am Ductus deferens oder an der Nebenniere zu kommen. Am Nebennierenmark wurde die Freisetzung von Katecholaminen durch eine Absenkung des pH-Wertes sogar direkt induziert. Der Freisetzungsverlauf unterschied sich aber deutlich von den Verläufen bei Stimulation mit Kalium, Carbachol oder DMPP, was auf einen anderen Mechanismus hinweist. Eine pH-abhängige Freisetzung wurde auch von Fujiwara *et al.* (1994) in einem pH-Bereich von 7,0 bis 6,4 beobachtet. Diese Freisetzung wurde nicht durch eine Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes induziert, war aber eng mit einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration gekoppelt. In dieser Untersuchung wurde außerdem gezeigt, dass die Freisetzung nicht durch Nifedipin beeinflusst wird und somit spannungsabhängige, Dihydropyridin-sensitive Calcium-Kanäle vermutlich nicht beteiligt sind. Dennoch war die Protonen-induzierte Katecholamin-Freisetzung vom extrazellulären Calcium abhängig, da in Calcium-freier Lösung keine Freisetzung auftrat. Dies spricht für die Aktivierung anderer pH-sensitiver Ionenkanäle. Auch könnte die Mobilisierung von Calcium aus intrazellulären Speichern eine Rolle spielen. Fujiwara *et al.* (1994) fanden, dass ein initial auftretender Peak der Katecholamin-Freisetzung von intrazellulären Calcium-Speichern abhängig zu sein scheint, die darauf folgende, langandauernde Freisetzung dagegen nicht. Der Verlauf der hier beobachteten Protonen-induzierten Freisetzung unterschied sich jedoch von der von Fujiwara gefundenen Freisetzung. Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen kam es in den meisten Fällen nicht zu einem peak-artigen Anstieg und anschließendem Abfall des Oxidationsstroms, sondern zu einer rasch ansteigenden und lang andauernden Freisetzung.

Zusätzlich wurde hier die Wirkung von Tubocurarin auf die Protonen-induzierte Katecholamin-Freisetzung untersucht. Es kam durch Tubocurarin zwar zu einer leichten Verminderung der Freisetzung gegenüber den Kontrollversuchen, die sich jedoch als nicht signifikant erwies. Somit scheinen N-Cholinozeptoren hier eher nicht beteiligt zu sein.

Bei zweimaliger Stimulation durch Absenkung des pH-Wertes kam es im Gegensatz zu den Versuchen mit Kalium-, Carbachol- oder DMPP-Lösung zu einer Steigerung der Freisetzung bei der 2. Stimulation. Bei der pH-abhängigen Stimulation war das Präparat jeweils nur maximal 120 s lang einem pH-Wert von 6,4 ausgesetzt, während die Stimulation mit Kalium-, Carbachol- oder DMPP-Lösung 180 s dauerte. Möglicherweise wurde der Vesikel-Pool durch die kürzere Stimulationsdauer beim ersten Durchgang der pH-Versuche weniger stark entleert, so dass bei der 2. Stimulation noch mehr Neurotransmitter für die Freisetzung zur Verfügung standen.

4.2.4 Magnesium

4.2.4.1 Wirkung von Magnesium

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, stellt Magnesium den natürlichen Antagonisten des Calciums dar und hat durch Bindung an verschiedenen Calcium-Bindungsstellen eine hemmende Wirkung mit unterschiedlicher Wirkstärke. Bei den hier durchgeführten Versuchen zeichnete sich Magnesium generell durch eine hemmende Wirkung, sowohl auf die Neurotransmitter-Freisetzung, als auch auf die Kontraktion der glatten Muskulatur aus. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Magnesium-Konzentration in direktem Zusammenhang mit der Verminderung der Freisetzung von Adrenalin und Noradrenalin steht.

Am Ductus deferens war zu beobachten, dass Magnesium v.a. im Bereich zwischen 0,6 und 1,2 mM einen stärkeren Einfluss auf die Neurotransmitter-Freisetzung als auf die Muskulatur direkt hatte. Sowohl am glatten Muskel, als auch an neuronalen Zellen wirkt Magnesium vermutlich durch eine Hemmung von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen und durch die Beeinflussung des Mikropotentials an der Zelloberfläche. Die Tatsache, dass Magnesium die Neurotransmitter-Freisetzung stärker hemmt als die Muskelkontraktion, könnte ein Hinweis darauf sein, dass neuronale Calcium-Kanäle durch Magnesium stärker beeinflusst werden als glattemuskuläre. Außerdem wird die Neurotransmitter-Freisetzung vermutlich zusätzlich durch die membranstabilisierenden Eigenschaften von Magnesium als zweiwertiges Ion vermindert. Eine intrazelluläre Wirkung von Magnesium ist unwahrscheinlich, da es bei einer Erhöhung der extrazellulären Magnesium-Konzentration nur zu einem sehr geringen Anstieg der intrazellulären Magnesium-Konzentration kommt (Hess *et al.*, 1982).

Unter dem Einfluss des P2X-Rezeptor-Blockers NF279 zeigte Magnesium eine um etwa 10% stärkere hemmende Wirkung auf die elektrisch induzierte Kontraktion. Dies könnte darauf hinweisen, dass Magnesium die Katecholamin-Freisetzung etwas stärker beeinflusst als die Freisetzung von ATP. Allerdings ist zu bedenken, dass sich NF279 als sehr langsam wirkend erwies. Dadurch war es schwierig, den steady-state-Zustand abzuwarten. Möglicherweise ist die etwas stärkere Wirkung von Magnesium unter NF279-Einfluss dadurch zu erklären, dass die Magnesium-Wirkung noch von einer leichten NF279-Wirkung überlagert war.

Die durch Tyramin induzierte Freisetzung wurde durch Magnesium nicht beeinflusst. Unter Tyramin-Einfluss werden Katecholamine aus ihren intrazellulären Speichern verdrängt und durch die Umkehr des Na⁺/Monoamin-Cotransporters, der sich in der Plasmamembran der Nervenzellen befindet, freigesetzt. Somit findet die Freisetzung unabhängig von Calcium und Exocytose-Vorgängen statt. Magnesium kann hier weder über eine Hemmung von Calcium-Kanälen, noch durch membranstabilisierende Eigenschaften wirken.

Betrachtet man die direkte Wirkung von Magnesium auf die glatte Muskulatur, dann zeigt sich, dass die Kalium-induzierte Kontraktion etwas stärker gehemmt wird als die NA-induzierte Kontraktion. Bei Stimulation mit Kalium kommt es zur Depolarisation, wodurch spannungsabhängige Calcium-Kanäle direkt aktiviert werden. Bei der Stimulation mit NA kommt es dagegen zunächst zur Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und anschließend am Ductus deferens v.a. DAG-vermittelt zur Aktivierung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle (Burt *et al.*, 1996) aber auch zur Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern. Die antagonistische Wirkung von Magnesium an spannungsabhängigen Calcium-Kanälen könnte dadurch bei der Stimulation mit Kalium stärker zum Tragen kommen.

Im Hinblick auf die therapeutische Relevanz der am Ductus deferens gefundenen Ergebnisse, ist besonders der Bereich von 0,6 mM bis 1,0 mM Magnesium von Interesse, da dies ein Bereich ist, der Magnesium-Mangel (unter 0,75 mM) und Normalbereich (0,75 mM – 1 mM) umfasst. Am Ductus deferens ergab sich eine besonders steile Konzentrations-Wirkungs-Beziehung im Bereich zwischen 0,6 mM und 1,2 mM Magnesium. Da v.a. bei Serum-Magnesium-Spiegeln unter 0,75 mM, d.h. bei Magnesiummangel, eine orale Magnesium-Therapie zu einer Steigerung des Serum-Magnesium-Spiegels auf bis zu 1,0 mM führen kann, könnte dadurch ein deutlicher therapeutischer Nutzen erzielt werden, wie z.B. eine Verringerung des Sympathikus-Tonus.

So kann sich Magnesium durch dessen dualen Effekt auf die Freisetzung und auf den Muskeltonus auch positiv bei Hypertonie auswirken. Magnesium hemmt nicht nur die Katecholamin-Freisetzung sondern zeigt zusätzlich eine postsynaptische Wirkung und könnte z.B. die Dilatation von glatter Gefäßmuskulatur begünstigen. Dieser Effekt auf die Gefäße wirkt sich zusätzlich entlastend auf das Herz aus, wobei die direkte Herzwirkung (Minderung der Frequenz und der Kontraktionskraft) den Sauerstoffbedarf des Herzens vermindert. Magnesium kann, ähnlich wie β -Adrenozeptor-Blocker indirekt durch eine Verminderung des Sympathikus-Tonus wirken und zusätzlich direkt die Schrittmacherzellen des Sinusknotens und die Arbeitsmuskulatur des Herzens beeinflussen.

Sowohl bei Patienten mit Hypertonie als auch mit Herzinsuffizienz wurde ein verminderter Serum-Magnesium-Spiegel gefunden. Dieser Mangel an Magnesium kann zum Teil auf die Gabe von Diuretika zurückgeführt werden. Ein geringer Serum-Magnesium-Spiegel kann die Katecholamin-Freisetzung verstärken und führt zu einer weiteren Vasokonstriktion. Eine Behandlung mit Magnesium kann diesen Kreislauf durchbrechen (Völger *et al.*, 1991) und z.B. Herzrhythmusstörungen vorbeugen.

Es gibt zwar zahlreiche Studien, die sich mit der Wirkung von Magnesium beschäftigen, allerdings gibt es kaum Untersuchungen, die die direkte Wirkung von Magnesium auf die Katecholamin-Freisetzung betrachten (Douglas *et al.*, 1963). Dass Magnesium die Katecholamin-Freisetzung direkt vermindert, konnte durch die Versuche am Nebennierenmark gezeigt werden. Bei den voltammetrischen

Messungen an Nebennierenschnitten der Ratte führte eine Erhöhung von 0 mM auf 1,2 mM Magnesium zu einer deutlichen Hemmung der Kalium-, Carbachol- und DMPP-induzierten Freisetzung. Es kam hier zu einer Verminderung der AUC um 58% bei Stimulation mit Kalium, um 41% bei Stimulation mit Carbachol und um 27% bei Stimulation mit DMPP. Eine weitere Erhöhung der Magnesium-Konzentration auf 9,6 mM führte zwar zu einer weiteren Verminderung der Carbachol-induzierten Freisetzung, die Kalium- und DMPP-induzierte Freisetzung wurde dagegen nicht weiter beeinflusst (Verringerung der AUC um 51% bei Stimulation mit Kalium, um 64% bei Stimulation mit Carbachol und um 29% bei Stimulation mit DMPP, bezogen auf die Werte bei 0 mM Magnesium).

Die Ergebnisse der voltammetrischen Untersuchungen bestätigten sich bei den HPLC-gestützten Untersuchungen an Nebennierenschnitten und bei den amperometrischen Messungen an PC-12-Zellen.

Bei den HPLC-Messungen verminderte eine Erhöhung der Magnesium-Konzentration von 0 mM auf 9,6 mM den Adrenalin-Wert um 32% und den NA-Wert um 17% bei Stimulation mit Kalium. Eine wesentlich stärkere Wirkung ergibt sich, wenn man die Kontrollversuche berücksichtigt, bei denen es zu einer erheblichen Steigerung der Freisetzung bei wiederholter Stimulation kam (Adrenalin: + 57%, NA: +90%). So ergibt sich eine Verminderung der Adrenalin-Freisetzung um 89% und einer vollständigen Hemmung der Noradrenalin-Freisetzung (errechnete Hemmung um 107% gegenüber den Werten in den Kontrollversuchen). Aus den HPLC-Bestimmungen ergaben sich keine deutlichen Unterschiede in der Beeinflussung der Freisetzung von Adrenalin und Noradrenalin durch Magnesium. Bei der zweiten Stimulation in Anwesenheit von 9,6 mM Magnesium war zwar der NA-Anteil etwas erhöht. Es kam aber auch bei den Kontrollversuchen tendenziell zu einem leichten Anstieg des NA-Anteils bei der zweiten Stimulation. Deshalb lässt sich aus diesem Ergebnis nicht unbedingt auf eine unterschiedliche Beeinflussung der Noradrenalin- und Adrenalin-Freisetzung durch Magnesium schließen.

Amperometrische Messungen an PC12-Zellen zeigten, dass bei einer Erhöhung der Konzentration von 0 mM auf 9,6 mM Magnesium sowohl die Frequenz dieser Freisetzung, als auch der Katecholamin-Gehalt pro Freisetzung reduziert wurde. Eine Verminderung der Freisetzung-Frequenz kann durch die hemmende Wirkung von Magnesium auf den Calcium-Einstrom in die Zelle erklärt werden. Dadurch wird der Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration, der die Exocytose der Vesikel bewirkt, reduziert. Eine Verminderung der Katecholamin-Konzentration in den einzelnen Vesikeln durch den direkten Einfluss von Magnesium erscheint eher unwahrscheinlich, da die intrazelluläre Magnesium-Konzentration durch eine Erhöhung der extrazellulären Magnesium-Konzentration kaum beeinflusst wird (Hess *et al.*, 1982). Eine Erklärung könnte der Mechanismus der „Compound Fusion“ sein. Bei einer starken Verringerung des Calcium-Einstroms durch die Magnesium-Wirkung könnte dieser Vorgang reduziert und so die Konzentration an freigesetzten Katecholaminen pro Vesikel vermindert werden.

Eine direkte Verminderung der Katecholamin-Freisetzung sowohl im Nebennierenmark als auch an sympathischen Nervenbahnen durch Magnesium kann sich positiv bei Stress auswirken. Stress kann durch verschiedene Faktoren, wie hohe psychische und physische Belastung oder auch Operationen und Erkrankungen entstehen und geht u.a. mit einer erhöhten Ausschüttung von Katecholaminen einher. Durch eine Verminderung der Katecholamin-Freisetzung kann Magnesium zur Erhöhung der Stressresistenz beitragen und verschiedene stressbedingte Symptome, wie funktionale Herzbeschwerden, Schlafstörungen oder Muskelverspannungen vermindern. Bei Patienten, die Stress ausgesetzt sind (z.B. in Form einer Operation), ist darauf zu achten, dass der Serum-Magnesium-Spiegel im oberen Normalbereich liegt. Bei Vorliegen eines Mangels sollte Magnesium substituiert werden.

4.2.4.2 Wirkung von Magnesium auf die Protonen-induzierte Freisetzung

Auch auf die durch Verminderung des extrazellulären pH-Wertes auf 6,4 induzierte Freisetzung am Nebennierenmark wirkt Magnesium hemmend, allerdings deutlich schwächer als bei den Kalium-, Carbachol- und DMPP-induzierten Freisetzungen. Bei den Kontrollversuchen ohne Magnesium kam es bei der 2. Stimulation zu einer Steigerung der Freisetzung um 45%. Mit 1,2 mM Magnesium kam es nur noch zu einer Steigerung um ca. 10%. Der Unterschied zum Kontrollwert war allerdings, ähnlich der Ergebnisse mit Tubocurarin, nicht signifikant. Erst mit 9,6 mM Magnesium kam es zu einer Hemmung der Freisetzung um 15%, d.h. im Verhältnis zu den Kontroll-Versuchen um 60%. Diese Ergebnisse sprechen für einen anderen Freisetzungs-Mechanismus, als bei der mit Kalium, Carbachol oder DMPP induzierten Freisetzung, die bereits durch 1,2 mM Magnesium erheblich vermindert wurde.

4.2.4.3 Kombinierte Wirkung von Magnesium mit (-)-Menthol bzw. Veratridin

Zusätzlich zur alleinigen Wirkung von Magnesium wurde auch eine Kombination mit (-)-Menthol am Ductus deferens und mit Veratridin sowohl am Ductus deferens als auch am Nebennierenmark untersucht.

(-)-Menthol und Magnesium bewirken als Einzelsubstanzen eine Verminderung der elektrisch induzierten Kontraktionskraft am Ductus deferens. Dies ist vermutlich durch den hemmenden Einfluss beider Substanzen auf neuronale und glattmuskuläre Calcium-Kanäle zurückzuführen. In Kombination war die hemmende Wirkung beider Substanzen auf die elektrisch induzierte Kontraktion etwas stärker, als durch eine Addition der Einzelwirkungen zu erwarten gewesen wäre. Geht man davon aus, dass Magnesium hauptsächlich durch eine Interaktion an der Pore des Calcium-Kanals den Einstrom von Calcium in die Zelle vermindert (Lansman *et al.*,

1986), während (-)-Menthol v.a. die Inaktivierung von Calcium-Kanälen beschleunigt, aber auch eine hemmende Wirkung auf Kalium-Kanäle besitzt (Gödecke, 1997), könnte eine überadditive Wirkung folgendermaßen erklärt werden: (-)-Menthol beschleunigt die Inaktivierung von Calcium-Kanälen, wodurch weniger Calcium in die Zelle strömt. Gleichzeitig wird aber durch die Kalium-Kanal-hemmende Wirkung das Aktionspotential verlängert. Da der Effekt auf Calcium-Kanäle überwiegt, kommt es unter (-)-Menthol zur Verminderung der Freisetzung und Kontraktion. Da Magnesium vorwiegend den Einstrom von Calcium durch den geöffneten Calcium-Kanal reduziert, sind bei Kombination beider Substanzen Calcium-Kanäle über einen längeren Zeitraum der Magnesium-Wirkung ausgesetzt. Da allerdings sowohl der Magnesium- als auch der Menthol-Wirkung eine komplexe Beeinflussung verschiedener Ionenkanäle zugrunde liegt, sind weitere Untersuchungen nötig, um eine differenzierte Aussage über einen möglichen überadditiven Effekt bei der Kombination beider Substanzen treffen zu können.

Veratridin führte sowohl am Ductus deferens, als auch am Nebennierenmark zu einer Steigerung der Neurotransmitter-Freisetzung. Dieser Effekt kommt vermutlich primär durch eine Verlängerung des Natrium-Einstroms zustande. Dadurch wird weniger Calcium über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher aus der Zelle transportiert. Außerdem führt einer Verlängerung der Depolarisation zu einem erhöhten Calcium-Einstrom in die Zelle. In den hier durchgeführten Versuchen wurde gezeigt, dass Magnesium als Calcium-Antagonist die Veratridin-induzierte Erhöhung der Freisetzung deutlich reduziert.

Am Ductus deferens konnte bereits eine Erhöhung der Magnesium-Konzentration von 0 mM auf 1,2 mM den Veratridin-induzierten Anstieg der Kontraktionskraft bei elektrischer Stimulation vollständig unterdrücken (Abb. 57 B). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass spannungsabhängige Calcium-Kanäle stark an der Veratridin-Wirkung beteiligt sind. Die Veratridin-induzierte Verminderung der Kontraktionskraft und die Kontraktoren sind vermutlich durch eine Calcium-Überladung der glatten Muskelzelle bedingt. Wie die Versuche mit Magnesium am Ductus deferens in Abwesenheit von Veratridin zeigen, kommt es bei einer Erhöhung der Konzentration von 0 auf 1,2 mM Magnesium zu einer eher geringen Verminderung der NA-induzierten Kontraktion. Magnesium scheint also eher schwach auf die glatte Muskulatur direkt zu wirken. Trotzdem könnte es unter dem Einfluss von Magnesium zu einer Minderung der Calcium-Überladung der Zelle bei hohen Veratridin-Konzentrationen kommen. Dies würde sich zwar noch nicht wesentlich auf die Kontraktionskraft auswirken, würde aber die Entwicklung von Kontraktoren verhindern, da die intrazelluläre Calcium-Konzentration unter der Kontraktorschwelle gehalten werden könnte.

Dass Magnesium die Veratridin-induzierte Steigerung der Freisetzung deutlich reduziert, konnte durch voltammetrische Messungen an Nebennieren-Schnitten bestätigt werden. Hier unterdrückten 9,6 mM Magnesium die mit 0,5 μM Veratridin

und 0 mM Magnesium beobachtete Steigerung der Kalium-induzierten Freisetzung vollständig.

Außerdem wurde am Ductus deferens die Magnesium-Wirkung unter dem Einfluss von 0,5 μ M Veratridin untersucht. Die elektrisch induzierten Kontraktionen wurden durch Magnesium stark gehemmt. Bei Erhöhung der Magnesium-Konzentration von 0 auf 0,6 mM kam es zu einer Reduktion um 43% und auf 1,2 mM um 75%. Ab 2,4 mM wurde die elektrisch induzierte Kontraktion vollständig unterdrückt (vgl. Abb. 57 A). Diese starke Hemmung kam nicht unerwartet, da ja bereits gezeigt wurde, dass Magnesium alleine eine ausgeprägte hemmende Wirkung auf die elektrisch induzierte Kontraktion besitzt und dass eine Erhöhung der Magnesium-Konzentration von 0 auf 1,2 mM die Veratridin-induzierte Steigerung Freisetzung von Neurotransmittern vollständig hemmen kann (vgl. Abb. 57 B). Aus diesen Ergebnissen könnte man auf eine besonders starke hemmende Wirkung von Magnesium auf die Freisetzung von Neurotransmittern unter dem Einfluss von Veratridin schließen. Tatsächlich wurde in Anwesenheit von Veratridin aber auch die NA-induzierte Kontraktion wesentlich stärker als ohne Veratridin reduziert. Bildet man die Differenzkurve aus der Kurve für die Kontraktionen bei elektrischer Stimulation und der Kurve bei Stimulation mit Noradrenalin, so zeigt sich, dass die aus beiden Wirkungskurven abgeleitete Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung am Ductus deferens durch Magnesium unter Veratridin-Einwirkung weniger stark ausfällt als ohne Veratridin. Die Differenzbildung ist bei höheren Magnesium-Konzentrationen (ab 2,4 mM) allerdings nicht mehr sinnvoll, da ab dieser Konzentration die elektrisch induzierte Kontraktion bereits vollständig unterdrückt wird und entsprechend nicht weiter abnehmen kann. Dadurch wird in diesem Konzentrationsbereich eine verminderte Freisetzung vorgespiegelt. Entsprechend der starken Hemmung sowohl der elektrisch induzierten als auch der durch NA ausgelösten Kontraktion scheint bei niedrigen Magnesium-Konzentrationen die Magnesium-bedingte Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung unter Veratridin tatsächlich geringer ausgeprägt zu sein als in Abwesenheit des Alkaloids (vgl. Abb. 57 A und Abb. 55 C). Ob dies tatsächlich der Fall ist oder ob, wie vermutet, eine geringere Hemmung der Freisetzung bei Anwesenheit von Veratridin vorhanden ist, sollte in weiteren Versuchen, bei denen die Freisetzung mit direkteren Methoden erfasst werden, geklärt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Magnesium unter dem Einfluss von Veratridin bereits im niedrigen Konzentrationsbereich eine sehr starke Hemmung der elektrisch induzierten Kontraktion des Nerv-Muskel-Präparates bewirken kann. Eine genauere Analyse des Mechanismus ist aber mit Hilfe der indirekten Methode nicht möglich.

4.2.4.4 Zusammenfassung der Wirkung von Magnesium am Sympathikus

Kommt es zur Aktivierung des Sympathikus, wie zum Beispiel bei erhöhten körperlichen Anforderungen, in Stresssituationen oder bei bestimmten Erkrankungen, führt dies in den Ganglien des Grenzstrangs präganglionär zur Ausschüttung von Acetylcholin, was zur Aktivierung postsynaptischer Neuronen und zur Ausschüttung von Noradrenalin an den Zielorganen führt. Damit kann die Aktivität bestimmter Organe gezielt gesteigert werden, z.B. kann zur Anpassung an erhöhte Anforderungen am Herzen die Kontraktionsfrequenz erhöht und die Kontraktion verstärkt werden.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Aktivierung des Nervus splanchnicus und der ebenfalls über Acetylcholin-Ausschüttung induzierten Freisetzung von Adrenalin und Noradrenalin aus chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks. Diese Substanzen gelangen dann in die Blutbahn und wirken als Hormone auf verschiedene Organe im Körper.

Die über diesen Weg ablaufende Sympathikus-Aktivierung führt zu einer generellen Funktionsänderung der betroffenen Organe und zur Umschaltung auf eine ergotrope Funktionsweise. So kommt es z.B. neben der Aktivierung des Herzens auch zu einer Blutdrucksteigerung und zu einer Erhöhung des Blutzucker-Spiegels.

Während eine vorübergehende, graduierte Aktivierung des Sympathikus sehr sinnvoll ist, kann eine übersteigerte Freisetzung während eines längeren Zeitraums zu Erkrankungen wie z.B. Herzrhythmusstörungen, Hypertonie, Diabetes etc. führen. Um dies zu verhindern, kann es sinnvoll sein, den Sympathikus zu dämpfen, wie dies z.B. mit Hilfe von β -Adrenozeptoren-Blockern erfolgt.

Bezüglich Magnesium ist es wichtig, dass der Serumspiegel dieses Mineralstoffs im Normbereich liegt und hier sogar möglichst im oberen Bereich (0,8-1,0 mM), um eine überschießende Katecholamin-Freisetzung zu vermeiden.

Überraschendes Ergebnis der vorliegenden Untersuchung ist, dass für die elektrisch induzierte Kontraktion des Ductus deferens eine steile Konzentrations-Wirkungs-Beziehung bezüglich Magnesium besteht, so dass bereits kleine Änderungen der Magnesium-Konzentration (z.B. Erhöhung von 0,6 auf 1,2 mM) zu einer deutlichen Hemmung der Kontraktion des Nerv-Muskel-Präparates führen. Hier spielt neben der direkten Beeinflussung der glatten Muskulatur v.a. die Hemmung der Freisetzung von Neurotransmittern eine entscheidende Rolle. Magnesium greift aber nicht nur an den postsynaptischen Fasern des Sympathikus ein, sondern hemmt auch die Freisetzung aus den Nebennierenmark. Diese Wirkung ist aber offenbar weniger stark ausgeprägt. Interessant an Magnesium ist, dass es auf verschiedenen Ebenen wirkt, das heißt nicht nur durch die Hemmung der Freisetzung aus dem postsynaptischen Neuronen des Sympathikus, sondern auch ganglionär durch die Hemmung der Freisetzung von Acetylcholin. Einen Überblick über die Wirkung von Magnesium auf den Sympathikus-Tonus bietet die Abb. 97.

Überträgt man die Ergebnisse, die im Rahmen der vorliegenden Untersuchung am Ductus deferens und am Nebennierenmark gewonnen wurden, z.B. auf das Herz-

Kreislaufsystem, wird klar, dass bei Magnesium-Mangel durch den überschießenden Anteil des Sympathikus, aber auch durch die Verminderung einer Calcium-antagonistischen Wirkung am Herzen und an den Gefäßen, die Gefahr besteht, dass sowohl die Herztätigkeit übermäßig angeregt als auch der Tonus der peripheren Gefäße zu sehr gesteigert wird. Auf Dauer können dadurch bei Magnesium-Mangel Herzrhythmusstörungen, Angina pectoris und Hypertonie begünstigt werden. Daher ist es sehr wichtig, dass der Magnesium-Serum-Spiegel vor allem bei gefährdeten Patienten regelmäßig kontrolliert wird. Bei Hypomagnesiämie ist es wichtig, dass die Magnesium-Zufuhr über die Nahrung oder mittels geeigneter Präparate gesteigert und dadurch der Magnesium-Serumspiegel möglichst in den oberen Normbereich angehoben wird.

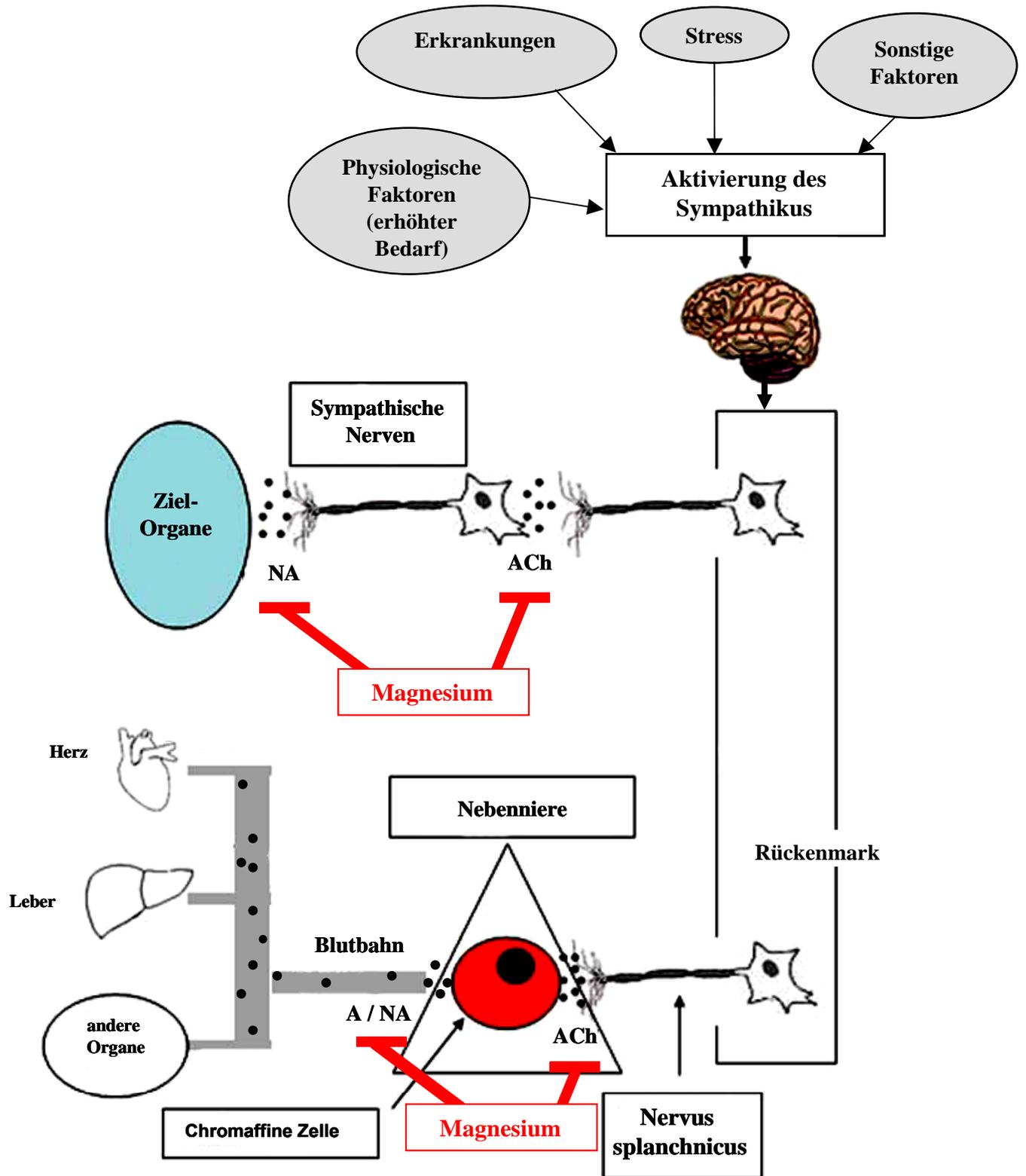


Abb. 97

Übersicht über die Wirkung von Magnesium auf die Freisetzung von Neurotransmittern und Nebennieren-Hormonen bei Aktivierung des Sympathikus (modifiziert nach de Diego et al., 2007).

4.3 Zusammenfassung

1. Der Sympathikus ist Teil des autonomen Nervensystems und damit ein zentrales Organ zur Steuerung aller Funktionen unseres Körpers. Dies geschieht sowohl durch die Neurotransmitter-Freisetzung aus Neuronen des Sympathikus an den Erfolgsorganen, als auch über das endokrine System durch Freisetzung von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark. Die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin stellen in ihrer Funktion als Neurotransmitter und Hormone wichtige Botenstoffe des Sympathikus dar und regulieren so z.B. das Herz-Kreislauf-System, die Atmungsfunktion und den Stoffwechsel. Eine Beeinflussung der Katecholamin-Freisetzung kann sich somit bei zahlreichen Krankheitsbildern positiv auswirken. Aus diesem Grund war es Ziel dieser Arbeit, die Wirkung verschiedener Substanzen auf die Katecholamin-Freisetzung zu untersuchen. Aufgrund ihrer bekannten Wirkung an spannungsabhängigen Calcium-Kanälen, an spannungsabhängigen Natrium-Kanälen oder an anderen, unspezifischen Ionenkanälen erschienen folgende Substanzen und Ionen für eine nähere Untersuchung geeignet:
 - die Ceveratrum-Alkaloide Veratridin, Cevadin, Germitrin und Germin-3-Acetat
 - das Jerveratrum-Alkaloid Veratramin
 - (-)-Menthol
 - die Änderung der extrazellulären H^+ - Ionen – Konzentration
 - Magnesium

Durch die Kombination einer indirekten Messmethode mit verschiedenen direkten Messmethoden konnten die ausgewählten Substanzen hinsichtlich Ihrer Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung und die glatte Muskulatur, sowie auf das endokrine System beurteilt werden.

2. Der Ductus deferens der Ratte erwies sich als ein geeignetes Modell, um die Wirkung der untersuchten Substanzen auf die Katecholamin-Freisetzung aus sympathischen Neuronen abzuschätzen und mit deren direkter Wirkung an der glatten Muskulatur zu vergleichen. In Vorversuchen am Ductus deferens konnte gezeigt werden, dass durch gezielte Stimulation entweder die Freisetzung von Neurotransmittern oder direkt die Kontraktion der glatten Muskulatur induziert werden kann. Bei elektrisch induzierter Kontraktion kam es ausschließlich durch Neurotransmitter-Freisetzung zur Kontraktion während bei Stimulation mit Noradrenalin die glatte Muskulatur direkt aktiviert wurde. Der Vorteil dieses Modells besteht darin, dass bei elektrischer Reizung die Kontraktion weitgehend physiologisch durch Freisetzung von Neurotransmittern induziert wird und der Einfluss von Substanzen auf die

Einheit von sympathischen Nerven und glatter Muskulatur untersucht werden kann. Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass nur indirekt auf die Neurotransmitter-Freisetzung geschlossen werden kann. Außerdem werden bei der elektrischen Stimulation neben Katecholaminen auch ATP und andere Transmitter freigesetzt, sodass eine Differenzierung zwischen den einzelnen Neurotransmittern nur durch Einsatz spezifischer Blocker möglich ist.

3. Die Wirkung der ausgewählten Substanzen auf die Freisetzung von Katecholaminen in ihrer Funktion als Hormone wurde an Nebennieren-Schnitten der Ratte und an kultivierten PC12-Zellen untersucht. Die Etablierung voltammetrischer Messungen an Nebennieren-Schnitten der Ratte bot die Möglichkeit die Freisetzung von Katecholaminen aus chromaffinen Zellen direkt zu verfolgen. Die Freisetzung wurde dabei durch Depolarisation mittels Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration und durch Aktivierung von N-Cholinozeptoren mit Carbachol oder DMPP ausgelöst. Oxotremorin, ein Agonist am M-Cholinozeptor bewirkte keine messbare Freisetzung, was zeigt, dass unter den hier gewählten Versuchsbedingungen die Aktivierung von M-Cholinozeptoren nicht zu einer direkten Katecholamin-Freisetzung führt. Amperometrische Messungen an kultivierten PC12-Zellen boten zusätzlich die Möglichkeit die Wirkung auf Einzelfreisetzungen zu untersuchen. Außerdem wurde die Konzentration der aus den Nebennieren-Schnitten freigesetzten Katecholamine mittels HPLC bestimmt. Dadurch konnte der Einfluss von Substanzen auf die Adrenalin- und Noradrenalin-Freisetzung getrennt untersucht werden. Diese Methode erwies sich als weniger genau und sensitiv. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass bei diesem System die Freisetzung nicht wie bei der Voltammetrie oder Amperometrie direkt verfolgt werden konnte, sondern die Katecholamin-Konzentration erst später im Perfusat bestimmt wurde.
4. Die Alkaloide des Weißen Germers (*Veratrum album*) sind Substanzen mit hoher Toxizität. Sie lassen sich strukturell in 2 Gruppen einteilen, die Ceveratrum-Alkaloide und die Jerveratrum-Alkaloide. Auch hinsichtlich Ihrer Wirkung zeigen beide Substanz-Gruppen deutliche Unterschiede. Während Ceveratrum-Alkaloide für ihre Natrium-Kanal-aktivierenden Eigenschaften bekannt sind, scheinen Jerveratrum-Alkaloide eher eine Calcium-Kanal-blockierende Wirkung zu haben. Interessant war, dass sich in den hier durchgeführten Versuchen auch innerhalb der Substanz-Gruppen für die verschiedenen Alkaloide in Abhängigkeit von der Art der Stimulation und vom untersuchten Konzentrationsbereich gegensätzliche Wirkungen ergaben.
5. Um einen Überblick über die Beeinflussung der Neurotransmitter-Freisetzung durch die Ceveratrum-Alkaloide **Veratridin**, **Cevadin**, **Germin-3-Acetat** und **Germitrin** zu erhalten, wurden diese zunächst am Ductus deferens

untersucht. Für **Veratridin** ist bereits bekannt, dass es in hohen Konzentrationen auch ohne zusätzliche Stimulation eine Freisetzung von Katecholaminen induzieren kann. In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass sowohl Veratridin, als auch Cevadin und Germitrin bereits in sehr geringen Konzentrationen (ab $0,3 \mu\text{M}$) die Neurotransmitter-Freisetzung beeinflussen können. **Germin-3-Acetat** stellte hinsichtlich des untersuchten Konzentrationsbereichs eine Sonderstellung dar. Da von früheren Versuchen am Papillarmuskel (Honerjäger, 1982) bekannt war, dass erst im mikromolaren Bereich mit Wirkungen auf den Natrium-Kanal zu rechnen ist, wurden höhere Konzentrationen (ab $50 \mu\text{M}$) gewählt.

6. Die beiden **Veracevin-Ester Veratridin** und **Cevadin** zeigten eine ähnliche Wirkung und führten bereits ab $0,3 \mu\text{M}$ zu einer Steigerung der elektrisch induzierten Kontraktion ($EC_{50, \text{Veratridin}} = 0,22 \mu\text{M}$; $EC_{50, \text{Cevadin}} = 0,19 \mu\text{M}$), in höheren Konzentrationen (ab $0,7$ bzw. $1 \mu\text{M}$) ließ dieser Effekt allerdings wieder nach. Mit Veratridin kam es, verbunden mit dem Auftreten von Kontrakturen, sogar zu einer Hemmung der Kontraktionskraft. Auf die glatte Muskulatur direkt wirkten beide Substanzen unterschiedlich. Während Veratridin die NA-induzierte Kontraktion am Ductus deferens nicht beeinflusste, führte Cevadin hier ab einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ zu einer leichten Steigerung der Kontraktionskraft ($EC_{50} = 1,4 \mu\text{M}$). Für die Neurotransmitter-Freisetzung ergab sich für beide Substanzen bis zu einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ ein deutlich steigernder Effekt. Dies lässt sich vermutlich bei beiden Substanzen durch deren verzögernde Wirkung auf die Inaktivierung von Natrium-Kanälen an den neuronalen Zellen erklären. Obwohl am glatten Muskel Natrium-Kanäle bei der direkten Auslösung der Kontraktion eine eher untergeordnete Rolle spielen, können sie indirekt die Wirkung auf das hauptsächlich durch spannungsabhängige Calcium-Kanäle getragene Aktionspotential beeinflussen. Auch die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse weisen auf einen direkten Einfluss von Veratridin und Cevadin auf die glatte Muskulatur hin. Durch eine Veratridin- bzw. Cevadin-bedingte Verzögerung der Inaktivierung von Natrium-Kanälen am glatten Muskel könnten diese an Bedeutung gewinnen. Die mit Veratridin beobachteten Kontrakturen bei elektrischer Stimulation sind wahrscheinlich hauptsächlich auf eine Natrium-bedingte Calcium-Überladung der Muskel-Zelle zurückzuführen. Die Tatsache, dass diese Kontrakturen bzw. die Calcium-Überladung bei Stimulation mit NA nicht auftritt, könnte allerdings ein Hinweis darauf sein, dass auch die Anwesenheit von anderen Neurotransmittern wie z.B. ATP, die bei elektrischer Stimulation zusammen mit Noradrenalin freigesetzt werden, eine wesentlich Rolle spielen. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass das Auftreten von Kontrakturen durch Vorbehandlung mit dem P2X-Rezeptor-Antagonisten NF279 verhindert wurde. Da Cevadin auch bei der NA-induzierten Kontraktion eine direkte, steigernde

Wirkung zeigte, aber keine Kontraktionen beobachtet wurden, hat es vermutlich einen etwas anderen Einfluss auf spannungsabhängige Natrium-Kanäle am glatten Muskel bzw. auf die Neurotransmitter-Freisetzung als Veratridin.

7. Auch für die **Germin-Ester Germitrin und Germin-3-Acetat**, denen eine andere Struktur wie den beiden Veracevin-Estern Veratridin und Cevadin zugrunde liegt, wurde in der Literatur bereits eine Natrium-Kanal aktivierende Wirkung gefunden. Überraschenderweise führte Germitrin allerdings am Ductus deferens zu einer Verminderung der elektrisch induzierten Kontraktion ($EC_{50} = 2,3 \mu\text{M}$). Bei Stimulation mit NA wurde dagegen keine Wirkung gefunden. Dadurch ergab sich durch Germitrin, anders als mit Veratridin und Cevadin, eine hemmende Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung. Aufgrund der überraschenden Ergebnisse wurden Kontroll-Versuche am Papillarmuskel der Ratte und des Meerschweinchens durchgeführt. Hier wirkte Germitrin, anders als am Ductus deferens, deutlich steigernd auf die Kontraktionskraft. Auch Germin-3-Acetat wirkte am Ductus deferens bei elektrischer Stimulation zunächst hemmend auf die Kontraktionskraft und erst in Konzentrationen über $300 \mu\text{M}$ steigernd. Bei NA-induzierter Kontraktion kam es dagegen mit steigender Konzentration von Germin-3-Acetat zu einer kontinuierlichen Zunahme der Kontraktionskraft ($EC_{50} = 466,4 \mu\text{M}$). Wie bei Germitrin ergab sich daraus ein hemmender Effekt auf die Neurotransmitter-Freisetzung, der jedoch ab einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ wieder nachließ.
8. Aufgrund der unterschiedlichen und stark konzentrationsabhängigen Wirkungen am Ductus deferens kann von einer komplexen Beeinflussung verschiedener Natrium-Kanäle und sekundärer Vorgänge wie z.B. Calcium-Bewegungen der Zelle durch die Ceveratrum-Alkaloide ausgegangen werden.
9. Aufgrund der am Ductus deferens gefundenen deutlich steigernden Wirkung auf die Freisetzung wurde **Veratridin** für weitere Untersuchungen an der Nebenniere der Ratte ausgewählt. Mittels voltammetrischer Messungen an Nebennieren-Schnitten konnte gezeigt werden, dass Veratridin bereits in geringen Konzentrationen auch am endokrinen System einen direkt steigernden Einfluss auf die Katecholamin-Freisetzung hat. $0,5 \mu\text{M}$ Veratridin führte zu einer Steigerung der durch Kalium induzierten Freisetzung um ca. 45%, die damit aber etwas schwächer ausfiel als am Ductus deferens. Dies könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass am Ductus deferens die Wiederaufnahme von Katecholaminen eine größere Rolle spielt als an chromaffinen Zellen. Zum anderen befinden sich die spannungsabhängigen Natrium-Kanäle der chromaffinen Zellen bei einem Ruhemembranpotential von etwa -50 mV , anders als an den sympathischen Nervenzellen des Ductus deferens, eher im geschlossen-inaktiven Zustand (Marcantoni *et al.*, 2007). Auch dadurch könnte die Veratridin-Wirkung vermindert sein. Die Carbachol-

und DMPP-induzierte Freisetzung, die v.a. durch eine Aktivierung von N-Cholinozeptoren vermittelt ist, wurde überraschenderweise durch Veratridin reduziert. In der Literatur gibt es Hinweise, dass es intrazelluläre Bindungsstellen für Natrium am N-Cholinozeptor gibt (Haddadian *et al.*, 2008). Somit wäre es denkbar, dass es durch den Veratridin-bedingten Anstieg der intrazellulären Natrium-Konzentration zu einer Bindung von Natrium am N-Cholinozeptor kommt. Dies könnte zu einer Verminderung der Leitfähigkeit oder Veränderung der Ionenselektivität führen, wodurch die Freisetzung von Katecholaminen reduziert werden könnte. Für eine genaue Aufklärung dieses Mechanismus sind jedoch weitere Versuche notwendig.

Mittels HPLC-gestützter Untersuchung der Katecholamine konnte die steigernde Wirkung des Veratridins auf die Kalium-induzierte Freisetzung am Nebennierenmark nicht bestätigt werden. Eine Erklärung dafür könnte zum einen die geringere Sensitivität der Methode sein. Zum anderen kam es aufgrund einer anderen Versuchsanordnung zu einem langsameren Austausch der Stimulations-Lösung. Durch den so entstandenen langsamen Anstieg der Kalium-Konzentration bei der Stimulation könnte es dazu kommen, dass Natrium-Kanäle schrittweise in einen geschlossen inaktiven Zustand übergehen und somit die Veratridin-Wirkung weitgehend unterdrückt wird.

10. Am Ductus deferens führte das **Jerveratrum-Alkaloid Veratramin** ab einer Konzentration von 10 μM bei elektrischer Stimulation und ab einer Konzentration von 30 μM bei NA-induzierter Kontraktion zu einer starken Hemmung der Kontraktionskraft. Daraus ergibt sich, dass Veratramin sowohl auf die Freisetzung, als auch auf die glatte Muskulatur einen hemmenden Einfluss hat, was auf eine generell hemmende Wirkung auf spannungsabhängige Calcium-Kanäle zurückzuführen sein könnte. Im Bereich von 1 μM bis 10 μM kam es mit Veratramin allerdings sowohl bei elektrisch induzierter als auch bei NA-induzierter Kontraktion in gleichem Maße zu einer leichten Steigerung der Kontraktionskraft. Hier könnte eine von Gödecke postulierte Kalium-Kanal-blockierende Wirkung eine Rolle spielen (Gödecke, 1997). Sowohl durch voltammetrische Messungen, als auch durch HPLC-gestützte Untersuchungen konnte die hemmende Wirkung des Veratramins auf die Katecholamin-Freisetzung am Nebennierenmark bestätigt werden. Mittels Voltammetrie konnte gezeigt werden, dass 10 μM Veratramin sowohl die Kalium- als auch die DMPP-induzierte Freisetzung reduzierte. Die Wirkung von 80 μM Veratramin war gegenüber der Wirkung von 10 μM vermindert. Dies deckt sich mit den Ergebnissen am Ductus deferens. Auch hier kam es mit höheren Konzentrationen wieder zu einer verminderten Wirkung auf die Freisetzung. Auch mittels HPLC-Untersuchungen wurde eine Verminderung

der Freisetzung durch Veratramin gefunden. Dabei ergab sich keine unterschiedliche Beeinflussung der Adrenalin- und NA-Freisetzung.

11. Vor allem die unterschiedliche Wirkung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Veratrum-Alkaloide machte es interessant, einen Überblick über die Wirkung des **Gesamt-Extraktes** zu gewinnen. Am Ductus deferens ergab sich durch den Extrakt eine deutliche Steigerung der NA-induzierten Kontraktion, während die elektrisch induzierte Freisetzung nicht beeinflusst wurde. Für die Neurotransmitter-Freisetzung ließ sich daraus eine hemmende Wirkung ableiten. Somit scheint der Gesamtextrakt die Kontraktionskraft durch eine direkte Wirkung an der glatten Muskulatur zu erhöhen, die Freisetzung von Neurotransmittern dagegen zu vermindern.

12. Aufgrund von Literatur-Daten kann davon ausgegangen werden, dass **(-)-Menthol** sowohl eine hemmende Wirkung auf glattemuskuläre und neuronale Calcium-Kanäle hat als auch eine aktivierende Wirkung auf TRP-Kanäle besitzt. Da es dadurch sowohl zu einer Hemmung als auch zu einer Steigerung der Freisetzung kommen könnte, wurde die Wirkung von (-)-Menthol näher untersucht. Am Ductus deferens wurde mit einer EC_{50} von $141,6 \mu\text{M}$ die elektrisch induzierte Kontraktion durch (-)-Menthol stärker als die NA-induzierte Kontraktion ($EC_{50} = 273,3 \mu\text{M}$) vermindert. Für die Neurotransmitter-Freisetzung ergab sich daraus eine schwach hemmende Wirkung mit einem Maximum bei einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$. Am Nebennierenmark wurde bei voltametrischen Messungen die DMPP-induzierte Freisetzung mit $100 \mu\text{M}$ und die Carbachol-induzierte Freisetzung mit $500 \mu\text{M}$ (-)-Menthol deutlich vermindert. Die Kalium-induzierte Freisetzung wurde dagegen mit $100 \mu\text{M}$ (-)-Menthol erhöht. Diese steigernde Wirkung wurde auch bei amperometrischen Messungen an PC12-Zellen gefunden. $70 \mu\text{M}$ (-)-Menthol führten hier bei Stimulation mit Kalium zu einer Erhöhung der Freisetzungsfrequenz, die Katecholamin-Menge pro Freisetzung blieb unbeeinflusst.

Um weitere Hinweise auf die (-)-Menthol-Wirkung zu erhalten, wurden Versuche mit **Icilin** durchgeführt: Der Vergleich mit Icilin, einem Agonisten am TRPM8 und TRPA1-Kanal sollte Anhaltspunkte für oder gegen eine Beteiligung von TRP-Kanälen an der (-)-Menthol-Wirkung liefern. Am Ductus deferens zeigte Icilin, ähnlich wie (-)-Menthol, eine hemmende Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung. Die NA-induzierte Kontraktion wurde im Gegensatz zu den Befunden mit Menthol nicht beeinflusst. Dies spricht dafür, dass diese direkte Wirkung von (-)-Menthol auf die glatte Muskulatur nicht durch die Beeinflussung von TRP-Kanälen, sondern wahrscheinlich durch die bekannte hemmende Wirkung auf glattemuskuläre Calcium-Kanäle bedingt ist. Die Kalium-induzierte Freisetzung am Nebennierenmark wurde nicht nur durch Menthol sondern auch durch Icilin erhöht, dagegen wurde die Carbachol-

induzierte Freisetzung durch Icilin nicht beeinflusst. Entsprechend sind TRP-Kanäle damit möglicherweise an der steigernden Wirkung von (-)-Menthol auf die Katecholamin-Freisetzung aus dem Nebennierenmark beteiligt, während die hemmende Wirkung auf einen anderen Mechanismus (z.B. Reduktion des Calcium-Einstroms durch Calcium-Kanäle) zurückzuführen ist. Eine Beteiligung des TRPM8-Kanals an der fördernden Wirkung scheint aber eher unwahrscheinlich, da mittels Westernblot gezeigt werden konnte, dass der TRPM8-Kanal zwar im Ductus deferens, aber nicht im Nebennierenmark exprimiert wird. Auch konnte Capsazepin, ein Antagonist am TRPM8-Kanal keine eindeutige Hemmung der (-)-Menthol-Wirkung auf die Kalium-induzierte Freisetzung am Nebennierenmark bewirken. Für die Beteiligung des TRPA1-Kanals spricht die von Karashima (2007) gefundene bimodale Wirkung von (-)-Menthol (Aktivierung bis 300 μM , ab 300 μM Hemmung des TRPA1-Kanals).

Betrachtet man die Ergebnisse am Ductus deferens und am Nebennierenmark, scheint eine kombinierte Wirkung von (-)-Menthol auf Calcium- und TRP-Kanäle wahrscheinlich, wobei insgesamt der hemmende Einfluss auf die Katecholamin-Freisetzung überwiegt.

13. Eine Absenkung des extrazellulären pH-Wertes von 7,5 auf 6,4 kann lokal bei pathophysiologischen Vorgängen, wie z.B. Entzündungen, eine Rolle spielen (Tombaugh *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass Protonen die glatte Muskulatur, die sympathischen Nervenzellen und das endokrine System offensichtlich unterschiedlich beeinflussen. Am Ductus deferens kam es bei Steigerung der Protonen-Konzentration (Absenken des pH auf 6,4) zu einer Verminderung der Kontraktionskraft, die auf eine direkte Wirkung an der glatten Muskulatur zurückzuführen ist. Die Freisetzung blieb am Ductus deferens dagegen von der Steigerung der Protonen-Konzentration unbeeinflusst. Am Nebennierenmark zeigten allerdings voltametrische Messungen, dass die Freisetzung von Katecholaminen durch Reduktion des extrazellulären pH-Wertes auf 6,4 direkt induziert werden kann. N-Cholinozeptoren scheinen an diesem Vorgang nicht beteiligt zu sein, da Tubocurarin kaum einen Einfluss auf die Protonen-induzierte Freisetzung hatte. Literaturdaten (Fujiwara *et al.*, 1994) weisen darauf hin, dass diese Freisetzung nicht durch eine Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes induziert wird und dass sie, obwohl extrazelluläres Calcium erforderlich ist, nicht von der Aktivierung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle abhängt. In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass Magnesium, das spannungsabhängige Calcium-Kanäle blockiert, die Protonen-induzierte Freisetzung deutlich weniger vermindert, als die Kalium oder Carbachol-induzierte Freisetzung. Dies und die Tatsache, dass sich der hier beobachtete Freisetzungsverlauf deutlich vom Verlauf der durch Carbachol oder Kalium

induzierten Freisetzung unterscheidet, weist auf die Beteiligung pH-sensitiver Ionenkanäle hin.

14. Magnesium gilt als „Anti-Stress“ Mineral und kann als Calcium-Antagonist zahlreiche Calcium-abhängige Mechanismen beeinflussen. So wurde z.B. bereits gezeigt, dass Magnesium die Acetylcholin-Freisetzung an der motorischen Endplatte vermindert. Allerdings gibt es kaum Untersuchungen, die sich mit der direkten Wirkung von Magnesium auf die Katecholamin-Freisetzung beschäftigen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Magnesium bereits im physiologischen Konzentrationsbereich (unter 1,2 mM) die Katecholamin-Freisetzung vermindert. Am Ductus deferens kam es durch Magnesium sowohl zu einer Hemmung der Freisetzung, als auch zu einer direkten Verminderung der Muskelkontraktion. Dabei war die Wirkung auf die Neurotransmitter-Freisetzung stärker ausgeprägt und es konnte bis zu einer Konzentration von 1,2 mM eine besonders steile Konzentrations-Wirkungs-Beziehung beobachtet werden.

Auch am Nebennierenmark konnte mittels Voltammetrie die Wirkung auf die Katecholamin-Freisetzung direkt nachgewiesen werden. Erhöhung von 0 auf 1,2 mM Magnesium führte hier zu einer deutlichen Hemmung der Kalium-, Carbachol- und DMPP-induzierten Freisetzung (Verminderung der AUC um 58% bei Stimulation mit Kalium, um 41% bei Stimulation mit Carbachol und um 27% bei Stimulation mit DMPP). Amperometrische Messungen an PC 12 Zellen zeigten, dass Magnesium bei Stimulation mit Kalium die Freisetzungsfrequenz deutlich reduzierte. Auch bei den HPLC-gestützten Untersuchungen zeigte sich eine Verminderung der Katecholamin-Konzentration im Perfusat unter Magnesium. Es konnte dabei kein eindeutiger Hinweis auf eine unterschiedliche Beeinflussung der Freisetzung von Adrenalin und Noradrenalin gefunden werden. Magnesium zeichnete sich somit nachweislich durch eine konstant hemmende Wirkung auf die Katecholamin-Freisetzung an sympathischen Nerven und chromaffinen Zellen aus.

15. Durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen am Ductus deferens und Nebennierenmark der Ratte, konnte die Wirkung von zahlreichen Substanzen auf die Neurotransmitter-Freisetzung ermittelt werden. Durch die Auswahl der Substanzen wurde die Beeinflussung spannungsabhängiger Natrium-Kanäle, spannungsabhängiger Calcium-Kanäle und anderer unspezifischer Ionen-Kanäle, wie TRP-Kanäle, berücksichtigt. Dabei konnte für alle untersuchten Substanzen eine direkte Wirkung auf die Katecholamin-Freisetzung nachgewiesen werden. Die Veratrum-Alkaloide, (-)-Menthol und eine Steigerung der extrazellulären Protonen-Konzentration zeigten differenzierte Wirkungen, abhängig von der Konzentration, von dem Modell, an dem die Untersuchungen durchgeführt

wurden und von der Art der Stimulation. Speziell für Magnesium ergaben sich deutliche, direkt hemmende Wirkungen auf die neuronale Freisetzung und auf das endokrine System sowie auf die glatte Muskulatur. Vor allem konnte gezeigt werden, dass dieser Magnesium-Effekt auch therapeutisch relevant ist, da er sich in einem Konzentrationsbereich abspielt, der bereits durch orale Magnesium-Verabreichung beeinflusst werden kann.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Biel danke ich für die unkomplizierte Übernahme der offiziellen Betreuung als mein Doktorvater und für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Prof. Dr. F. Hofmann danke ich für anregende Diskussionen während der Entstehung der Arbeit und für die freundliche Aufnahme am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. Vierling für die engagierte und besonders freundliche Betreuung dieser Arbeit bedanken. Herr Prof. Vierling hat mit hilfreichen Diskussionen, Ratschlägen und tatkräftiger Unterstützung die Entstehung dieser Arbeit ermöglicht und ist mir stets mit einem offenem Ohr und großer Geduld zur Seite gestanden.

Außerdem geht mein herzlicher Dank an:

Dr. Bruno Sontia für nützliche Ratschläge, für eine gute Zeit in Kalifornien und für interessante Erzählungen über Kamerun.

Nadine Kretschmer für gute Gespräche und die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung von Kontraktionskraft-Messungen und voltammetrischen Versuchen.

Petra Apostolopoulos für die technisch qualifizierte Hilfe bei Präparationen und Versuchen zur Kontraktionskraft-Messung und für ihre freundliche und unkomplizierte Art, die stets den Laboralltag auflockerte.

Susi Herzog für die Unterstützung bei Kontraktionskraft-Messungen, Zellzucht und im Laboralltag.

Dr. Christina Vierling für aufmunternde Gespräche, für Ihre Hilfsbereitschaft und die Einweisung in die Zellzucht.

Dr. Maria Huster und Beate Spießberger für die freundliche Einweisung in die Technik des Westernblottings und Herrn PD. Dr. Thomas Kleppisch für die Unterstützung bei der Benutzung des Mikrotoms.

Herrn Dr. Stampfl für die PC12-Zellen sowie für wichtige Ratschläge und Frau Ellendorf für die tatkräftige Unterstützung bei der Zellzucht.

Frau Dr. Heike Schneider vom Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie für die Durchführung der HPLC-Untersuchungen.

Herrn N. Ertl, P. Kerner und R. Kliegl für die schnelle Hilfe bei technischen Problemen und den Aufbau mehrerer Versuchsstände.

Herrn Ralf Arnrich für die technische Unterstützung bei der Auswertung der Flut an Messdaten, die bei den voltammetrischen Versuchen entstanden ist.

Frau Roller für die Erstellung von Abbildungen.

Meine Eltern, für's Zuhören, für Ihre Unterstützung und dafür, dass Sie mir bei all meinen Entscheidungen stets den Rücken gestärkt haben.

Meinem Freund Bernd für seine Geduld und großes Verständnis während meiner gesamten Ausbildung, für Rückhalt und für ein vertrautes Zuhause nach der Arbeit.

Lebenslauf

Susanne Jost

Geburtsdatum: 09. Dezember 1978

Geburtsort: München

Eltern: Ursula Jost, Industriekauffrau
Albert Jost, Techniker

Schulbildung: 1985 – 1989 Grundschule in München
1989 – 1998 Ernst-Mach-Gymnasium in Haar

Studium der Pharmazie: WS 1998 bis SS 2002
Ludwig-Maximilians-Universität München

März 2001: 1. Teil der Pharmazeutischen
Prüfung

Dezember 2002: 2. Teil der Pharmazeutischen
Prüfung

Pharmaziepraktikum: Februar 2003 – Juli 2003:
Fa Intervet Innovation GmbH, Schwabenheim

August 2003 – Januar 2004
Schützen Apotheke, München

März 2004: 3. Teil der Pharmazeutischen
Prüfung

Approbation als Apotheker: März 2004

Wissenschaftliche Tätigkeit: seit April 2004

Literaturverzeichnis

- ABE, J., HOSOKAWA, H., OKAZAWA, M., KANDACHI, M., SAWADA, Y., YAMANAKA, K., MATSUMURA, K. & KOBAYASHI, S. (2005). TRPM8 protein localization in trigeminal ganglion and taste papillae. *Brain Res Mol Brain Res*, **136**, 91-8.
- AICHELE, D. & GOLTE-BRECHTL, M. (1997). *Kosmos, Das neue Was blüht denn da?* Stuttgart: Franckh-Kosmos Verlag.
- ANTONI, D., ENGEL, M. & GUMPEL, N. (1989). Die Therapie von supraventrikulären und ventrikulären Herzrhythmusstörungen mit Magnesium. *Mag-Bull*, **11**, 125-129.
- AUGUSTINE, G.J. & NEHER, E. (1992). Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *J Physiol*, **450**, 247-71.
- BACHMAN, E.S., DHILLON, H., ZHANG, C.Y., CINTI, S., BIANCO, A.C., KOBILKA, B.K. & LOWELL, B.B. (2002). betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science*, **297**, 843-5.
- BARBARA, J.G., LEMOS, V.S. & TAKEDA, K. (1998a). Pre- and post-synaptic muscarinic receptors in thin slices of rat adrenal gland. *Eur J Neurosci*, **10**, 3535-45.
- BARBARA, J.G., PONCER, J.C., MCKINNEY, R.A. & TAKEDA, K. (1998b). An adrenal slice preparation for the study of chromaffin cells and their cholinergic innervation. *J Neurosci Methods*, **80**, 181-9.
- BEHRENDT, H.J., GERMANN, T., GILLEN, C., HATT, H. & JOSTOCK, R. (2004). Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *Br J Pharmacol*, **141**, 737-45.
- BELEVYCH, A.E., ZIMA, A.V., VLADIMIROVA, I.A., HIRATA, H., JURKIEWICZ, A., JURKIEWICZ, N.H. & SHUBA, M.F. (1999). TTX-sensitive Na⁺ and nifedipine-sensitive Ca²⁺ channels in rat vas deferens smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, **1419**, 343-52.
- BENNETT, M.R., CHEUNG, A. & BRAIN, K.L. (1998). Sympathetic neuromuscular transmission at a varicosity in a syncytium. *Microsc Res Tech*, **42**, 433-50.
- BEVAN, S., HOTH, S., HUGHES, G., JAMES, I.F., RANG, H.P., SHAH, K., WALPOLE, C.S. & YEATS, J.C. (1992). Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br J Pharmacol*, **107**, 544-52.
- BHAGWAT, S. & WILLIAMS, M. (1996). P2 purine and pyrimidine receptors: emerging superfamilies of G-protein-coupled and ligand-gated ion channel receptors. *Eur J Med Chem*, **32**, 183-193.
- BIDAUX, G., FLOURAKIS, M., THEBAULT, S., ZHOLOS, A., BECK, B., GKIKI, D., ROUDBARAKI, M., BONNAL, J.L., MAUROY, B., SHUBA, Y., SKRYMA, R. & PREVARSKAYA, N. (2007). Prostate cell differentiation status determines transient receptor potential melastatin member 8 channel subcellular localization and function. *J Clin Invest*, **117**, 1647-57.
- BIDAUX, G., ROUDBARAKI, M., MERLE, C., CREPIN, A., DELCOURT, P., SLOMIANNY, C., THEBAULT, S., BONNAL, J.L., BENAHMED, M., CABON, F., MAUROY, B. & PREVARSKAYA, N. (2005). Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement. *Endocr Relat Cancer*, **12**, 367-82.
- BITTNER, M.A. & HOLZ, R.W. (1988). Effects of tetanus toxin on catecholamine release from intact and digitonin-permeabilized chromaffin cells. *J Neurochem*, **51**, 451-6.
- BLATTNER, R., CLASSEN, H.G., DEHNERT, H. & DÖRING, H.J. (1978). *Experimente an isolierten glattmuskulären Organen*. March, Freiburg: Hugo Sachs Elektronik KG.
- BÖNISCH, H.G., K.H.; KELLER, B., BONISCH, H., GRAEFE, K.H. & KELLER, B. (1983). Tetrodotoxin-sensitive and -resistant effects of veratridine on the noradrenergic neurone of the rat vas deferens. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **324**, 264-70.
- BORGES, R. (1997). The rat adrenal gland in the study of the control of catecholamine secretion. *Semin Cell Dev Biol*, **8**, 113-20.
- BOSELLI, C., BIANCHI, L., BARBIERI, A. & GRANA, E. (1998). Effect of calcium antagonists on the response to noradrenaline in the whole and bisected rat vas deferens. *J Auton Pharmacol*, **18**, 297-306.
- BOSELLI, C., BIANCHI, L. & GRANA, E. (1997). Profiles of the response to noradrenaline in the whole and bisected rat vas deferens. *J Auton Pharmacol*, **17**, 97-107.
- BRENNER, R., KLINKE, R., PAPE, H.C. & SILBERNAGL, S. (2005). *Muskulatur. Physiologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- BURNSTOCK, G. (1995). Noradrenaline and ATP: cotransmitters and neuromodulators. *J Physiol Pharmacol*, **46**, 365-84.
- BURT, R.P., CHAPPLE, C.R. & MARSHALL, I. (1996). The role of diacylglycerol and activation of protein kinase C in alpha 1A-adrenoceptor-mediated contraction to noradrenaline of rat isolated epididymal vas deferens. *Br J Pharmacol*, **117**, 224-30.

- CASTEELS, R. & LOGIN, I.S. (1983). Reserpine has a direct action as a calcium antagonist on mammalian smooth muscle cells. *J Physiol*, **340**, 403-14.
- CHEN, Y.A. & SCHELLER, R.H. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 98-106.
- CHUANG, H.H., NEUHAUSSER, W.M. & JULIUS, D. (2004). The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. *Neuron*, **43**, 859-69.
- CLAPHAM, D.E. (2007). SnapShot: mammalian TRP channels. *Cell*, **129**, 220.
- CLASSEN, H. (1982). Stress reactions modified by magnesium status. *Mag-Bull*, **4**, 148-153.
- CONCEICAO, I.M., JURKIEWICZ, A., FONSECA, D.R., OPPERMAN, A.R., FREITAS, T.A., LEBRUN, I. & GARCEZ-DO-CARMO, L. (2005). Selective release of ATP from sympathetic nerves of rat vas deferens by the toxin TsTX-I from Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Br J Pharmacol*, **144**, 519-27.
- DAMER, S., NIEBEL, B., CZECH, S., NICKEL, P., ARDANUY, U., SCHMALZING, G., RETTINGER, J., MUTSCHLER, E. & LAMBRECHT, G. (1998). NF279: a novel potent and selective antagonist of P2X receptor-mediated responses. *Eur J Pharmacol*, **350**, R5-6.
- DE DIEGO, A.M., GANDIA, L. & GARCIA, A.G. (2007). A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta Physiol (Oxf)*, **192**, 287-301.
- DEW, M.J., EVANS, B.K. & RHODES, J. (1984). Peppermint oil for the irritable bowel syndrome: a multicentre trial. *Br J Clin Pract*, **38**, 394, 398.
- DICHTL, A. & VIERLING, W. (1991). Inhibition by magnesium of calcium inward current in heart ventricular muscle. *Eur J Pharmacol*, **204**, 243-8.
- DOCHERTY, R.J., YEATS, J.C. & PIPER, A.S. (1997). Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture. *Br J Pharmacol*, **121**, 1461-7.
- DORFMAN, L., HÜBNER, C.F., MACPHILLAMY, H.B., SCHLITTLER, E. & ST ANDRE, A.F. (1953). On the constitution of reserpine from *Rauwolfia serpentina* Benth. *Experientia*, **9**, 368-9.
- DÖRING, C.J. & MCRORY, J.E. (2007). Effects of extracellular pH on neuronal calcium channel activation. *Neuroscience*, **146**, 1032-43.
- DÖRNER, J.F., GISSELMANN, G., HATT, H. & WETZEL, C.H. (2007). Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions. *J Biol Chem*, **282**, 13180-9.
- DU, S., ARAKI, I., KOBAYASHI, H., ZAKOJI, H., SAWADA, N. & TAKEDA, M. (2008). Differential expression profile of cold (TRPA1) and cool (TRPM8) receptors in human urogenital organs. *Urology*, **72**, 450-5.
- DUGAS, M., HONERJÄGER, P. & MASSLICH, U. (1989). Tetrodotoxin block of single germitrine-activated sodium channels in cultured rat cardiac cells. *J Physiol*, **411**, 611-26.
- Douglas, W.W. & Rubin, R.P. (1963). The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling. *J Physiol*, **167**, 288-310.
- ESLER, M., JENNINGS, G., LAMBERT, G., MEREDITH, I., HORNE, M. & EISENHOFER, G. (1990). Overflow of catecholamine neurotransmitters to the circulation: source, fate, and functions. *Physiol Rev*, **70**, 963-85.
- FALLER, A. & M., S. (1995). *Der Körper des Menschen*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
- FAWCETT, W.J., HAXBY, E.J. & MALE, D.A. (1999). Magnesium: physiology and pharmacology. *Br J Anaesth*, **83**, 302-20.
- FLEIG, A. & PENNER, R. (2004). The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features. *Trends Pharmacol Sci*, **25**, 633-9.
- FROHNE, D. & JENSEN, U. (1998). *Systematik des Pflanzenreichs*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- FUJIWARA, N., WARASHINA, A. & SHIMOJI, K. (1994). Characterization of low pH-induced catecholamine secretion in the rat adrenal medulla. *J Neurochem*, **62**, 1809-15.
- FURNESS, J.B. & COSTA, M. (1975). The use of glyoxylic acid for the fluorescence histochemical demonstration of peripheral stores of noradrenaline and 5-hydroxytryptamine in whole mounts. *Histochemistry*, **41**, 335-52.
- FURUKAWA, T., YAMAKAWA, T., MIDERA, T., SAGAWA, T., MORI, Y. & NUKADA, T. (1999). Selectivities of dihydropyridine derivatives in blocking Ca²⁺ channel subtypes expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, **291**, 464-73.
- GARCIA, A.G., GARCIA-DE-DIEGO, A.M., GANDIA, L., BORGES, R. & GARCIA-SANCHO, J. (2006). Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev*, **86**, 1093-131.
- GÖDECKE, T. (1997). Untersuchung der Wirkung von (-)-Menthol auf den glattmuskulären und kardialen Calciumkanal nativer Herzmuskelzellen und transfizierter CHO-Zellen mit der

- "Patch-Clamp"-Technik. Vergleich mit Cumarinen und anderen Pflanzeninhaltsstoffen. In *Fakultät für Chemie und Pharmazie*. München: Ludwig-Maximilians-Universität.
- GRIFFIN, P., SCHUBERT-ZSILAVECZ, M. & STARK, H. (2004). Hemmstoffe von Beta-Adrenozeptoren. *Pharmazie in unserer Zeit*, **33**, 442-449.
- GUYENET, P.G. (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci*, **7**, 335-46.
- HADDADIAN, E.J., CHENG, M.H., COALSON, R.D., XU, Y. & TANG, P. (2008). In silico models for the human alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor. *J Phys Chem B*, **112**, 13981-90.
- HÄNSEL, R. (1991). *Phytoparmaka*. Berlin: Springer Verlag.
- HAWTHORN, M., FERRANTE, J., LUCHOWSKI, E., RUTLEDGE, A., WEI, X.Y. & TRIGGLE, D.J. (1988). The actions of peppermint oil and menthol on calcium channel dependent processes in intestinal, neuronal and cardiac preparations. *Aliment Pharmacol Ther*, **2**, 101-18.
- HESS, P., METZGER, P. & WEINGART, R. (1982). Free magnesium in sheep, ferret and frog striated muscle at rest measured with ion-selective micro-electrodes. *J Physiol*, **333**, 173-88.
- HILLER, K. & MELZIG, M. (2006). *Lexikon der Arzneipflanzen und Drogen*. Erfstadt: Area Verlag GmbH.
- HOLMAN, M.E., TONTA, M.A., PARKINGTON, H.C. & COLEMAN, H.A. (1995). Tetrodotoxin-sensitive action potentials in smooth muscle of mouse vas deferens. *J Auton Nerv Syst*, **52**, 237-40.
- HONERJÄGER, P. (1982). Cardioactive substances that prolong the open state of sodium channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **92**, 1-74.
- HONERJÄGER, P. (1973). Electrophysiological effects of various ceveratrum alkaloids on single nerve axons. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **280**, 391-416.
- HONERJÄGER, P., DUGAS, M. & ZONG, X.G. (1992). Mutually exclusive action of cationic veratridine and cevadine at an intracellular site of the cardiac sodium channel. *J Gen Physiol*, **99**, 699-720.
- HONERJÄGER, P., FRELIN, C. & LAZDUNSKI, M. (1982). Actions, interactions, and apparent affinities of various ceveratrum alkaloids at sodium channels of cultured neuroblastoma and cardiac cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **321**, 123-9.
- HUBBARD, J.I., JONES, S.F. & M., L.E. (1968). On the mechanism by which calcium and magnesium affect the release of transmitter by nerve impulses. *J Physiol*, **196**, 75-86.
- JACOB, R., CLASSEN, H-G. (1979). Der Einfluss von Magnesium-Aspartat-Hydrochlorid auf die durch Ephedrin verstärkte adrenerge Kardiopathie. *Mag-Bull*, **2**, 125 - 130.
- JARVIS, S.E. & ZAMPONI, G.W. (2005). Masters or slaves? Vesicle release machinery and the regulation of presynaptic calcium channels. *Cell Calcium*, **37**, 483-8.
- KARASHIMA, Y., DAMANN, N., PRENEN, J., TALAVERA, K., SEGAL, A., VOETS, T. & NILIUS, B. (2007). Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. *J Neurosci*, **27**, 9874-84.
- KIRPEKAR, S.M. & PRAT, J.C. (1979). Release of catecholamines from perfused cat adrenal gland by veratridine. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **76**, 2081-2083.
- KRAFTE, D.S. & KASS, R.S. (1988). Hydrogen ion modulation of Ca channel current in cardiac ventricular cells. Evidence for multiple mechanisms. *J Gen Physiol*, **91**, 641-57.
- KRAYER, O. (1950). Investigations into the effect of veratrumalkaloid on the circulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol*, **209**, 405-20.
- KREBS, H.A., HENSELEIT, K (1932). Untersuchung über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, **210**, 33-66
- KYHSE-ANDERSEN, J. (1984). Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, **10**, 203-9.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- LANSMAN, J.B., HESS, P. & TSIEN, R.W. (1986). Blockade of current through single calcium channels by Cd²⁺, Mg²⁺, and Ca²⁺. Voltage and concentration dependence of calcium entry into the pore. *J Gen Physiol*, **88**, 321-47.
- LE NOVERE, N., CORRINGER, P.J. & CHANGEUX, J.P. (2002). The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol*, **53**, 447-56.
- LESZCZYNSZYN, D.J., JANKOWSKI, J.A., VIVEROS, O.H., DILIBERTO, E.J., JR., NEAR, J.A. & WIGHTMAN, R.M. (1991). Secretion of catecholamines from individual adrenal medullary chromaffin cells. *J Neurochem*, **56**, 1855-63.
- LI, L. & CHIN, L.S. (2003). The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis. *Cell Mol Life Sci*, **60**, 942-60.
- LINDVALL, O. & BJORKLUND, A. (1974a). The glyoxylic acid fluorescence histochemical method: a detailed account of the methodology for the visualization of central catecholamine neurons. *Histochemistry*, **39**, 97-127.

- LINDVALL, O., BJORKLUND, A. & SVENSSON, L.A. (1974b). Fluorophore formation from catecholamines and related compounds in the glyoxylic acid fluorescence histochemical method. *Histochemistry*, **39**, 197-227.
- LIU, L. & SIMON, S.A. (1997). Capsazepine, a vanilloid receptor antagonist, inhibits nicotinic acetylcholine receptors in rat trigeminal ganglia. *Neurosci Lett*, **228**, 29-32.
- LOPEZ, M.G., VILLARROYA, M., LARA, B., MARTINEZ SIERRA, R., ALBILLOS, A., GARCIA, A.G. & GANDIA, L. (1994). Q- and L-type Ca^{2+} channels dominate the control of secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett*, **349**, 331-7.
- LUNDBERG, J.M. (1996). Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol Rev*, **48**, 113-78.
- MACPHERSON, L.J., HWANG, S.W., MIYAMOTO, T., DUBIN, A.E., PATAPOUTIAN, A. & STORY, G.M. (2006). More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Mol Cell Neurosci*, **32**, 335-43.
- MARCANTONI, A., BALDELLI, P., HERNANDEZ-GUIJO, J.M., COMUNANZA, V., CARABELLI, V. & CARBONE, E. (2007). L-type calcium channels in adrenal chromaffin cells: role in pace-making and secretion. *Cell Calcium*, **42**, 397-408.
- MARTINEZ-OLIVARES, R., VILLANUEVA, I., RACOTTA, R. & PINON, M. (2006). Depletion and recovery of catecholamines in several organs of rats treated with reserpine. *Auton Neurosci*, **128**, 64-9.
- MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER (2008). Mikroskopische Anatomie 2008, Kurspräparat
- MCCLESKEY, E.W., FOX, A.P., FELDMAN, D.H., CRUZ, L.J., OLIVERA, B.M., TSIEN, R.W. & YOSHIKAMI, D. (1987). Omega-conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 4327-31.
- MCKEMY, D.D., NEUHAUSSER, W.M. & JULIUS, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, **416**, 52-8.
- MORITOKI, H., IWAMOTO, T., KANAYA, J., ISHIDA, Y., ANDO, K. & KITAGAWA, K. (1987). Capsaicin enhances the non-adrenergic twitch response of rat vas deferens. *Br J Pharmacol*, **92**, 469-75.
- MULLER, R.U. & FINKELSTEIN, A. (1974). The electrostatic basis of Mg^{2+} inhibition of transmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**, 923-6.
- NASSENSTEIN, C., KWONG, K., TAYLOR-CLARK, T., KOLLARIK, M., MACGLASHAN, D.M., BRAUN, A. & UNDEM, B.J. (2008). Expression and function of the ion channel TRPA1 in vagal afferent nerves innervating mouse lungs. *J Physiol*, **586**, 1595-604.
- OLIVOS, L. & ARTALEJO, A.R. (2007). Muscarinic excitation-secretion coupling in chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)*, **192**, 213-20.
- PAHLOW, M. (1989). *Das große Buch der Heilpflanzen*. München: Gräfe und Unzer
- PALADE, P. (1987). Drug-induced Ca^{2+} release from isolated sarcoplasmic reticulum. II. Releases involving a Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release channel. *J Biol Chem*, **262**, 6142-8.
- PEIER, A.M., MOQRICH, A., HERGARDEN, A.C., REEVE, A.J., ANDERSSON, D.A., STORY, G.M., EARLEY, T.J., DRAGONI, I., MCINTYRE, P., BEVAN, S. & PATAPOUTIAN, A. (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, **108**, 705-15.
- PEIKERT, A., WILIMZIG, C. & KOHNE-VOLLAND, R. (1996). Prophylaxis of migraine with oral magnesium: results from a prospective, multi-center, placebo-controlled and double-blind randomized study. *Cephalalgia*, **16**, 257-63.
- PITTLER, M.H. & ERNST, E. (1998). Peppermint oil for irritable bowel syndrome: a critical review and metaanalysis. *Am J Gastroenterol*, **93**, 1131-5.
- REES, W.D., EVANS, B.K. & RHODES, J. (1979). Treating irritable bowel syndrome with peppermint oil. *Br Med J*, **2**, 835-6.
- REITER, M. & BRANDT, W. (1985). Relaxant effects on tracheal and ileal smooth muscles of the guinea pig. *Arzneimittelforschung*, **35**, 408-14.
- REITER, M. & HONERJÄGER, P. (1974). The cardiac action of ceveratrum alkaloids. *Arzneimittelforschung*, **24**, 290-4.
- SANTANA, F., MICHELENA, P., JAEN, R., GARCIA, A.G. & BORGES, R. (1999). Calcium channel subtypes and exocytosis in chromaffin cells: a different view from the intact rat adrenal. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **360**, 33-7.
- SHAFER, T.J. & ATCHISON, W.D. (1991). Transmitter, ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC12) cells: a model for neurotoxicological studies. *Neurotoxicology*, **12**, 473-92.
- SNEDDON, P. & WESTFALL, D.P. (1984). Pharmacological evidence that adenosine triphosphate and noradrenaline are co-transmitters in the guinea-pig vas deferens. *J Physiol*, **347**, 561-80.
- SONTIA, B. (2005). Einfluss von Pflanzen-Extrakten (*Vitex cincinnoskii* und *Daniella olivieri*) und physiologischen Ionen auf die glatte Gefäßmuskulatur und elektrophysiologische

- Eigenschaften des Herzmuskels. In *Medizinische Fakultät*. pp. 107-111. München: Ludwig-Maximilians-Universität.
- SONTIA, B. & TOUYZ, R.M. (2007). Role of magnesium in hypertension. *Arch Biochem Biophys*, **458**, 33-9.
- STARKE, K. (2006a). *Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems*. München, Jena: Urban & Fischer
- STARKE, K. (2006b). *Pharmakologie noradrenerger und adrenerger Systeme - Pharmakotherapie des Asthma bronchiale - Doping*. München, Jena: Urban & Fischer
- STEIN, R.J., SANTOS, S., NAGATOMI, J., HAYASHI, Y., MINNERY, B.S., XAVIER, M., PATEL, A.S., NELSON, J.B., FUTRELL, W.J., YOSHIMURA, N., CHANCELLOR, M.B. & DE MIGUEL, F. (2004). Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract. *J Urol*, **172**, 1175-8.
- STENDIG-LINDBERG, G., TEPPER, R. & LEICHTER, I. (1993). Trabecular bone density in a two year controlled trial of peroral magnesium in osteoporosis. *Magnes Res*, **6**, 155-63.
- STORCH, V., WELSCH, U. & W., K. (1999). *Kükenthal Zoologisches Praktikum*. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- SÜDHOF, T.C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*, **375**, 645-53.
- SURES, H.A. & INNES, I.R. (1979). Isolation of the sino-atrial node with veratramine. *J Pharmacol Exp Ther*, **210**, 116-9.
- SWANDULLA, D., CARBONE, E., SCHAFFER, K. & LUX, H.D. (1987). Effect of menthol on two types of Ca currents in cultured sensory neurons of vertebrates. *Pflugers Arch*, **409**, 52-9.
- SWANDULLA, D., SCHAFFER, K. & LUX, H.D. (1986). Calcium channel current inactivation is selectively modulated by menthol. *Neurosci Lett*, **68**, 23-8.
- SZULCZYK, B. & SZULCZYK, P. (2003). Postdecentralization plasticity of voltage-gated Na⁺ currents in rat glandular sympathetic neurons. *Neurosci Lett*, **343**, 105-8.
- TAUBERT, K. (1994). Magnesium in migraine. Results of a multicenter pilot study. *Fortschr Med*, **112**, 328-30.
- TAYLOR, B.A., DUTHIE, H.L. & LUSCOMBE, D.K. (1985). Calcium antagonist activity of menthol on gastrointestinal smooth muscle. *The British Journal of Clinical Pharmacology*, **20**, 293-294.
- THEWS, G., MUTSCHLER, E. & VAUPEL, P. (1999). *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- THRON, C.D. & MCCANN, F.V. (1999). Pharmacological tests of the mechanism of the periodic rhythm caused by veratramine in the sinoatrial node of the guinea pig. *Gen Pharmacol*, **32**, 81-9.
- THRON, C.D. & MCCANN, F.V. (1998). Studies on the bradycardia and periodic rhythm caused by veratramine in the sinoatrial node of the guinea pig. *J Electrocardiol*, **31**, 257-68.
- TOMBAUGH, G.C. & SOMJEN, G.G. (1996). Effects of extracellular pH on voltage-gated Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ currents in isolated rat CA1 neurons. *J Physiol*, **493 (Pt 3)**, 719-32.
- TRAVIS, E.R. & WIGHTMAN, R.M. (1998). Spatio-temporal resolution of exocytosis from individual cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **27**, 77-103.
- TSUZUKI, K., XING, H., LING, J. & GU, J.G. (2004). Menthol-induced Ca²⁺ release from presynaptic Ca²⁺ stores potentiates sensory synaptic transmission. *J Neurosci*, **24**, 762-71.
- TYTGAT, J., NILIUS, B. & CARMELIET, E. (1990). Modulation of the T-type cardiac Ca channel by changes in proton concentration. *J Gen Physiol*, **96**, 973-90.
- ULBRICHT, W. (1969). The effect of veratridine on excitable membranes of nerve and muscle. *Ergeb Physiol*, **61**, 18-71.
- ULBRICHT, W. (1998). Effects of veratridine on sodium currents and fluxes. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **133**, 1-54.
- VIERLING, W., SEIBEL, K. & REITER, M. (1987). Voltage-dependent calcium release in guinea-pig cardiac ventricular muscle as antagonized by magnesium and calcium. *Basic Res Cardiol*, **82**, 415-27.
- VÖLGER, K. & MUTSCHLER, E. (1991). Magnesium - ein überschätztes oder unterbewertetes Pharmakon? - Teil 1: Grundlagen für die Therapie. *DAZ*, **13**, 589-597.
- VON RÜDEN, L. & NEHER, E. (1993). A Ca-dependent early step in the release of catecholamines from adrenal chromaffin cells. *Science*, **262**, 1061-5.
- WAGNER, H. (1999). *Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- WAHL-SCHOTT C. & BIEL, M. (2009). HCN channels: Structure, cellular regulation and physiological function. *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 470-94.
- WEI, E.T. & SEID, D.A. (1983). AG-3-5: a chemical producing sensations of cold. *J Pharm Pharmacol*, **35**, 110-2.

- WESTERINK, R.H., DE GROOT, A. & VIJVERBERG, H.P. (2000). Heterogeneity of catecholamine-containing vesicles in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **270**, 625-30.
- WESTERINK, R.H.S. (2002). Modulation of vesicular release from rat PC12 cells. In *Institute for Risk Assessment Sciences*. pp. 5-17. Utrecht: Utrecht University.
- WIGHTMAN, R.M., JANKOWSKI, J.A., KENNEDY, R.T., KAWAGOE, K.T., SCHROEDER, T.J., LESZCZYNSZYN, D.J., NEAR, J.A., DILIBERTO, E.J., JR. & VIVEROS, O.H. (1991). Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10754-8.
- ZURBORG, S., YURGIONAS, B., JIRA, J.A., CASPANI, O. & HEPPENSTALL, P.A. (2007). Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. *Nat Neurosci*, **10**, 277-9.