

2 Material und Methoden

2.1 Kontraktionsmessungen

2.1.1 Präparation

Die Kontraktionsmessungen wurden an Geweben aus Rinderaugen, die wir von einem nahe gelegenen Schlachthof bezogen, durchgeführt. Veterinärmedizinische Untersuchungen bewiesen, dass die Tiere, deren Augen für die Experimente verwendet wurden, gesund waren.

Die in konstant eisgekühlten Behältern gelagerten bovinen Augen wurden nur wenige Stunden nach der Schlachtung in folgender Weise präpariert [19]: Das periorbitale Fettgewebe und die äußeren Augenmuskeln wurden unter Zuhilfenahme einer Schere vom jeweiligen Auge entfernt. Ein 10 mm hinter dem Limbus corneae gelegener Schnitt teilte das Rinderauge in zwei Hälften, die hintere Hälfte mit anhaftendem Glaskörper wurde verworfen. Vom vorderen Anteil wurden zunächst Glaskörperreste und Linse entfernt, anschließend die besagte Augenhälfte in gleich große Sektoren mittels Skalpell auf schnittfester Unterlage geviertelt. Die seitlich der schlitzförmigen Rinderpupille einander gegenüber gelegenen Sektoren wurden, die Kornea nach unten weisend, mit Nadeln auf einer Platte fixiert und unter mikroskopischer Sicht weiterpräpariert. Die Iris wurde mit einer feinen Pinzette bis an ihrem korneoskleralen Übergang angehoben. Das hierbei sichtbar gewordene Ligamentum pectinatum wurde danach vorsichtig durchtrennt. Feine Horizontalschnitte machten eine Abpräparation der Iris und das an sie anschließende Ziliarkörperepithel möglich, bis das TM, das eine grauweißliche, wollartige Struktur aufwies, freilag. Zwei vertikale Schnitte parallel zum Ansatz des Ligamentum pectinatum in die Mitte des TM geführt, ca. 0,5 und 1,5 mm vor dem CM-Ansatz gelegen, trennten dessen einstrahlende Fasern sauber vom TM ab. Des Weiteren wurde ein ca. 20 mm langer Streifen des TM ausgestanzt. Diesen unterteilten wir nach vorsichtiger Lösung von der Sklera in für unsere Experimente nutzbare Areale (8 mm x 2 mm) gleicher Größe, die bis zum Versuchsbeginn in Ringerlösung auf Eis gelagert wurden.

2.1.2 Messvorrichtung

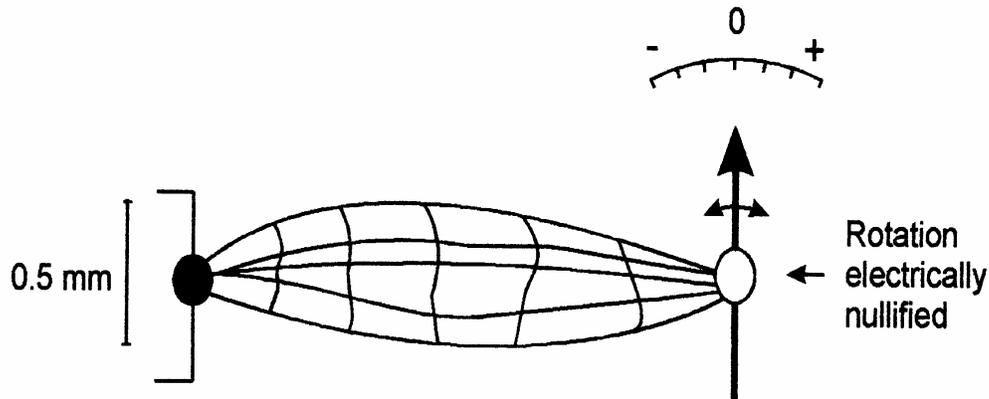
Die genutzte Messvorrichtung zur Aufzeichnung von Gewebekontraktionen bei Applikation verschiedener Pharmaka bestand aus einem Perfusionssystem und einem Kraft-Längen-Messer (Force-Length-Transducer) [19]. Diese konnten durch einen mit der Vorrichtung vernetzten Computer gesteuert werden. In 7 Messkammern, synchron durch den Computer koordiniert, jedoch autark arbeitend, befand sich je ein zu untersuchender TM-Gewebestreifen.

Der Kraft-Längen-Messer ermöglichte die Aufzeichnung isometrischer Kontraktionen von 0,5 bis 2000 μN . Mit Hilfe eines Gewebeklebers (Histoacryl, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) wurden zunächst die in gekühlter Ringerlösung gelagerten Gewebestreifen (TM) zwischen zwei Nadeln befestigt. Eine Nadel war fest fixiert, die andere mit einem langen Hebel einer feinen Drehspule verbunden. Der kürzere Hebel stellte die Lichtschranke zwischen einer Lichtquelle und einer Photodiode dar und verschattete diese je nach seiner Position in unterschiedlichem Maße. Die Messapparatur war in einem lichtdichten Kasten untergebracht, um Störeffekte einfallenden Umgebungslichtes zu unterbinden. Eine zusätzliche Subtraktion von Umgebungslicht konnte durch eine zweite Photodiode ermöglicht werden. Kontraktionen oder Relaxationen des jeweiligen Gewebestreifens führten zur Auslenkung des Hebels, welche von der Photodiode registriert wurden. Eine über die elektromagnetische Drehspule induzierte, gegenläufig gerichtete Kraft, welche regelkreisgesteuert oben genannter Auslenkung entgegenwirkte, ließ die Länge des Gewebestreifens konstant halten. Außerdem konnte die Länge des Gewebestreifens durch Veränderung der Nullposition am Regelsystem vorgewählt werden.

Über einen Analog-Digital-Wandler (BMC Systeme GmbH, Deutschland) wurden die zur Konstanthaltung benötigten in μN geeichten Stromstärkenänderungen 6 mal pro Minute (min) vom Computer (Schneider CPC 6128, Türkheim, Deutschland) aufgezeichnet, so dass die Kontraktionskraft der Gewebestreifen auf einem Monitor direkt abgelesen werden konnte. Das System registrierte Längenänderungen von weniger als 10 μm .

- Force-length transducer

- Isometric contraction



Isolated strip (2-4 mm) of
Trabecular meshwork (TM)

Abb. 11: Prinzip der Messung isometrischer Kontraktion. Bei der Messung kommt es nicht zu einem Nettoausschlag des Zeigers, vielmehr wird der Strom gemessen, der benötigt wird, den Zeiger auf „Null“ zu halten. So wurden geringste Kraftgrößen in Mikroneutron messbar (Quelle: Wiederholt et al., 1998, 9; II: p. 46-49)

Die zwischen zwei Nadeln eingespannten Gewebstreifen, waren jeweils in eine von 7 Perfusionskammern von je 2 ml Volumen eingetaucht. Eine turbulenzarme Durchströmung jeder Kammer mit 6 ml/min Perfusionslösung wurde mit Hilfe eines eigenen Schlauches aus jeweils der Kammer zugeordneten Behältern gewährleistet. Die Schläuche aller Kammern liefen über eine gemeinsame Rollerpumpe (Ismatec, Zürich, Schweiz), so dass die Perfusion der einzelnen Kammern zwar mit unterschiedlichen Lösungen, jedoch zeitsynchron gesteuert erfolgen konnte. Ummantelungen der Schläuche und Kammern, mit fließendem vorgewärmtem Wasser, sorgten durch Wärmeaustausch für ein gleichmäßiges Temperaturniveau von 36°C. Zwischen Rollerpumpe und Lösungsbehältern befanden sich

computergesteuerte elektromagnetische Ventile. Bei einem Perfusionstrom von 6 ml/min je Kammer war das Kammervolumen von 2 ml bei Umschalten auf eine andere Perfusionslösung nach 1 min zu ca. 95% ausgetauscht.

2.1.3 Versuchsablauf

Nach Vorspülung der Kammern mit 36°C warmer Ringerlösung sowie Fixierung der Gewebestreifen zwischen den Nadeln mit entsprechendem Gewebekleber, wurden die Streifen durch höhenverstellbare Versuchstische in die Perfusionskammer eingetaucht. Diese wurden für ca. 60 min mit Ringerlösung umspült. Der Nadelabstand war mit einer Justierschraube so einstellbar, dass eine Vorspannung des Gewebes von ca. 100 µN vorlag. Messungen wurden nur an Gewebestreifen durchgeführt, die über die erste Kontrollzeit von 60 min in Ringerlösung einen stabilen Basistonus aufwiesen. Anschließend wurde über 15 min Carbachol in einer Konzentration von (10^{-6} M) zugesetzt, dieses, eine „Vorkontraktion“ bewirkende Parasympathomimetikum, wurde 30 min mit Ringerlösung ausgewaschen. Nachfolgend perfundierte man die zu untersuchenden Gewebeproben für 20 min erneut mit Carbachol (10^{-6} M). Diese „Carbacholhauptkontraktion“ wurde als 100%-Kontraktion festgelegt. Nachdem Carbachol erneut für 30 min mit Ringerlösung ausgewaschen und so eine Baseline erreicht wurde, konnte die zu testende Substanz, beispielsweise PGF-2- α sowie die FP-Rezeptor-Antagonisten PGF-2- α -amin/amid für 20 min bzw. ET-1 für 40 min dazugegeben werden, wobei alle Kontraktionsänderungen des Gewebes zur Carbacholhauptkontraktion ins Verhältnis gesetzt wurden (vgl. Abb. 12).

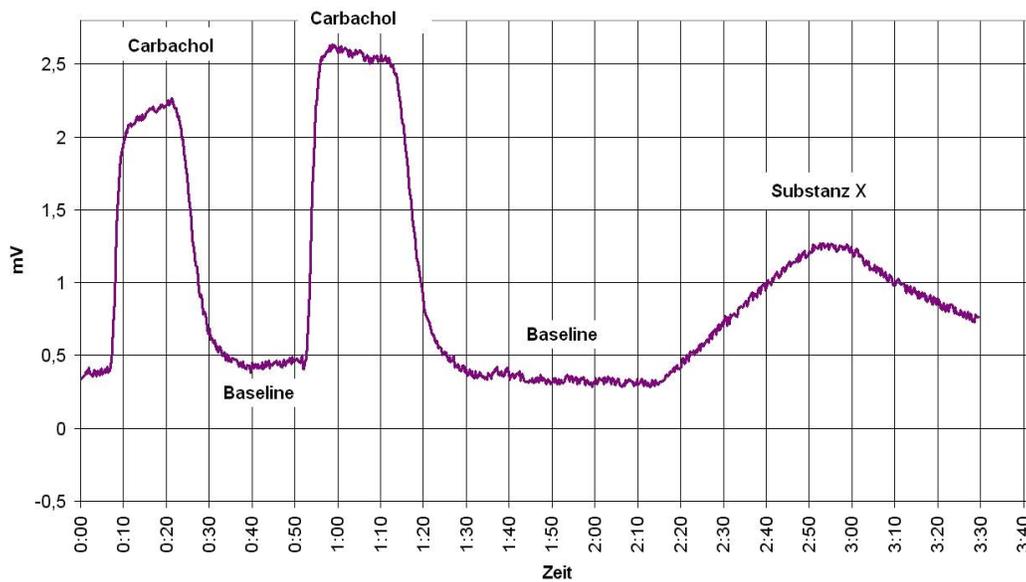


Abb. 12: Kontraktionskurve, Kontraktion der zu testenden Substanz wurde ins Verhältnis zur Maximalkontraktion von Carbachol (= 100%) gesetzt.

2.1.4 Verwendete Lösungen

Ringerlösung in mM: 151 Na⁺; 5 K⁺; 1,7 Ca²⁺; 0,9 Mg²⁺; 131 Cl⁻; 0,9 SO₄²⁻; 1 H₂PO₄⁻; 28 HCO₃⁻; 5 Glucose.

Zur Gewährleistung eines konstanten pH-Wertes von 7,4 wurde die Lösung mit 5% CO₂ und 95% O₂ begast. Alle verwendeten Substanzen wurden von der Firma Sigma (Deutschland) bezogen.

Folgende Pharmaka wurden den obigen Lösungen in verschiedenen Versuchen zugesetzt:

Carbachol (Sigma, Deutschland), PGF-2- α , PGF-2- α amin/amin (Cayman), ET-1 (Alexis, CA, USA).

2.2 Zellkulturen

Umfassende Experimente erfordern molekularbiologische und elektrophysiologische Methoden. Um diese möglich zu machen, war es notwendig, spezifische Zellkulturen zu etablieren. TM-Zellkulturen humanen wie auch bovinen Ursprungs wurden infolge der Entwicklung spezieller Zellkulturtechniken, die auch Analysen anderer Gewebe gestattet, für in vitro-Untersuchungen zugänglich.

Die Zellkulturen von bovinem Trabekelmaschenwerksgewebe (BTM) wurden wie beschrieben hergestellt [12]. Die Gewinnung von humanem Trabekelmaschenwerksgewebe (HTM) gelang aus Spenderaugen oder aus E nukleationsaugen (aus der Augenklinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin). Ein Studium der Spender-Krankenakten garantierte den Ausschluss einer Glaukomerkrankung. Die Isolation des TM aus humanem Gewebe basierte auf der Methode von Flügel et al. [13]. Mittels Äquatorialschnitt wurden die Augen geteilt, dabei der hintere Abschnitt verworfen. Die im untersuchungstechnisch verwendeten vorderen Anteil befindlichen Zonulafasern wurden mit einer feinen Schere zerschnitten und die Linse entfernt. Die Präparation des TM begann mit der Sondierung des Schlemmkanals unter Zuhilfenahme eines feinen Drahtes von 0,5 mm Durchmesser. Im Anschluss konnte das darüber gelegene TM vorsichtig herausgelöst werden. Das TM wurde unter Deckgläschen in Petrischälchen mit 35 mm Durchmesser gelegt. Als Kulturmedium wurde Dulbeco's Modification of Eagle's minimal essential Medium (DMEM) mit zusätzlich 20% Fetal Calf Serum (FCS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg /ml Streptomycin verwendet. Die Zellkulturbelüftung geschah mit einem Gemisch aus 95% Luft und 5% CO₂ unter konstanten Bedingungen bei 37 °C. Wöchentlich 2-mal fand ein Nährmediumaustausch statt. Die Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz nach der Trypsin-EGTA-Methode passagiert, und auf diese Weise aus ihrem Zellverband isoliert. Dann teilte man sie auf mehrere neue Petrischälchen auf und kultivierte sie von neuem im Brutschrank. Nach der 3.-7. Passage waren die Zellkulturen für die Versuchsverwendung vorbereitet. Vor der Weiterverarbeitung wurden Konfluenz und Einschichtigkeit der Kulturen geprüft. Die Zellen wurden an der Universität Erlangen von Prof. Elke Lütjen-

Drecolli mikroskopisch und immunhistochemisch untersucht und zeigten die für TM typischen Charakteristika [72].

2.3 Messung der freien Calciumkonzentration mit der Fura-Messmethode

2.3.1 Grundlagen der Methode

Für die Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration in intakten Zellen eignen sich bevorzugt fluoreszierende Farbstoffe wie FURA-2, die sich intrazellulär anreichern. FURA-2, Anfang der 80er Jahre aus BAPTA (1,2-bis-Aminophenoxyteraessigsäure) entwickelt, ist ein mit hoher Selektivität/Intensität für Calcium sensitiver Fluoreszenzfarbstoff. Daher werden nur geringe Farbstoffkonzentrationen in den Zellen benötigt und dadurch die Calcium-Pufferung gering gehalten [73, 74]. Voran genannte Eigenschaften und der geringe Farbstoffverlust durch Diffusion gestatten mehrstündige Calcium-Messungen.

Fura-2-AM (Fura-2-Acetoxy-Methylester) ist ein weiterentwickelter Fluoreszenzfarbstoff mit zwei wichtigen Eigenschaften. Er ist zum einen in seiner Esterform lipophil, demzufolge membrangängig, und wird durch intrazelluläre Abspaltung des Esterrestes Calcium-sensitiv sowie hydrophil, so dass eine Rückdiffusion erschwert wird und er sich intrazellulär anreichern kann. Zum anderen ist die Fluoreszenzintensität von der ihn umgebenden Calciumkonzentration abhängig. Die Fluoreszenzintensität steigt mit zunehmender Calciumkonzentration bei einer Wellenlänge von 340 nm an, reduziert sich jedoch bei einer Wellenlänge von 380 nm und umgekehrt (siehe Abb. 13). Dies ist darin begründet, dass Calcium-gebundenes Fura-2 bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 340 nm maximal fluoreszierendes Licht abgibt, wohingegen Calcium-freies Fura-2 bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 380 nm maximal fluoreszierendes Licht ausstrahlt. Zwischen diesen Maxima liegt bei 361 nm der isosbestische Punkt, bei dem infolge Anregung mit Licht dieser Wellenlänge sich die Fluoreszenzintensität nicht in Abhängigkeit von der intrazellulären Calciumkonzentration verändert.

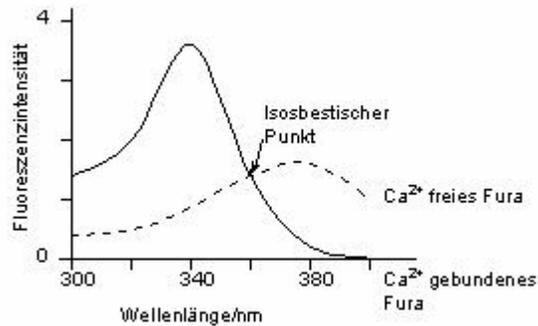


Abb. 13: Anregung des Fura-2 bei verschiedenen Wellenlängen

2.3.2 Versuchsaufbau

Der Messstand setzte sich aus folgenden Apparaten zusammen: die das fluoreszenzanregende Licht abgebende Xenonlampe (Osram XPO 75 W/2); zwei abwechselnd rotierende (Wellenlänge 340 bzw. 380 nm durchlassend) Filter, durch die das Licht passierte. Weitere Filter eliminierten restliches Infrarotlicht. Anschließend wurde das Licht dann durch ein Fluoreszenzobjektiv (Plan-Neofluar, 20x; 0.50, Zeiss) des Inversmikroskopes (Zeiss Axiovert 100) über eine Blende auf die Zellgruppe fokussiert. Die Messung des von den fluoreszierenden Zellen ausgesandten Lichtes konnte durch das Mikroskop mit 20facher Vergrößerung vom Photomultiplier (Seefeldler Messtechnik MEA1530SFV2DN) registriert werden. Das Messsignal wurde anschließend verstärkt (Dual Wavelength Photometer von Luigs & Neumann, Ratingen) und vom AD/DA Wandler (HEKA Patch Klamp EPC 9) digitalisiert dem Computer nutzbar gemacht. Die Daten konnten so mit einem PC in TIDA für Windows ausgewertet werden. Die Signale der Wellenlängen 340 und 380 nm wurden getrennt aufgezeichnet.

Die Flusskammer bestand aus einem runden, unten durch ein Deckgläschen verschlossen und mit Silikon abgedichteten Rahmen (2cm \varnothing). An der Flusskammer-Hinterseite befand sich der Zulauf, an der -Vorderseite der Ablauf. Eine Rollerpumpe mit einer Durchflussrate

von ca. 3 ml/min beförderte die Lösungen in die Kammer und sorgte dementsprechend für einen konstanten Flüssigkeitsspiegel von ca. 3 mm Höhe und gewährleistete einen kompletten Lösungsaustausch innerhalb von Sekunden. In die Mitte der Flusskammer wurde das Deckgläschen mit den zu untersuchenden Zellen eingebracht.

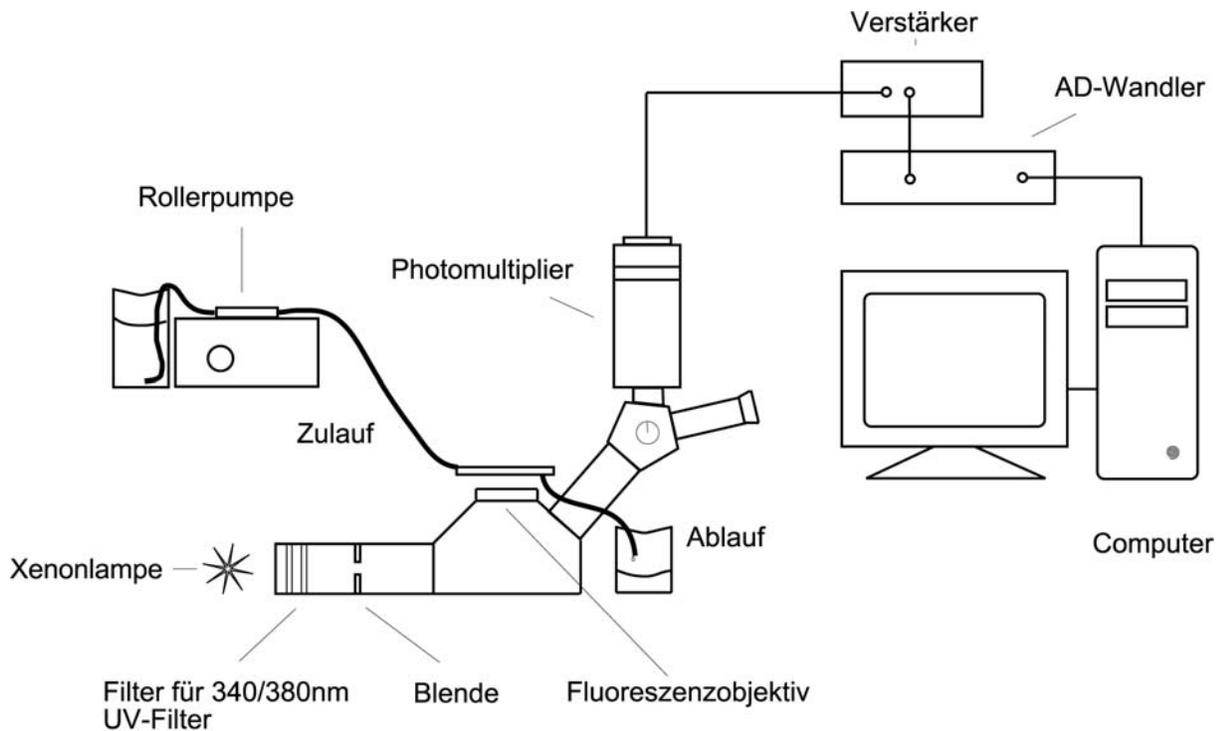


Abb. 14: Schematischer Aufbau des Fura-Messstandes

2.3.3 Versuchsdurchführung

Bei den Versuchen wurden Deckgläschen mit meist ca. 14 Tage alten konfluenten Zellkulturen verwendet. Nach Entnahme der Zellen aus dem Brutschrank erfolgte eine dreimalige Spülung mit Badlösung. Anschließend wurden sie mit Badlösung und 5 μM Fura-2-AM für 30 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen konnte der Messstand vorbereitet, sowie die Autofluoreszenz des Deckgläschens mit

unbeladenen Zellen abgeglichen werden. Anschließend wurden die Zellen in der schon abgedunkelten Flusskammer 20 min mit Badlösung gespült, um extrazelluläre Furareste zu beseitigen und die Aufnahme-Reaktion zu unterbinden. Danach startete der Versuch, bei dem die Fluoreszenzsignale kontinuierlich mit dem Computer aufgezeichnet wurden. Die zu untersuchenden Stoffe wurden zugeführt und am Ende des Versuches die Kalibrierung durchgeführt, um später die absolute Calciumkonzentration der Zellen ausrechnen zu können.

2.3.4 Kalibrierung

Für die Kalibrierung wurde in eine mit EGTA versetzte, Calcium-freie Lösung, Ionomycin (10^{-5} M) appliziert. Ionomycin zeichnet sich durch die Erhöhung der zellmembranären Calcium-Permeabilität aus, so dass Calcium entlang dem Gradienten leicht nach extrazellulär diffundiert. Unter diesen Bedingungen ist Fura-2 intrazellulär Calcium-frei und R_{\min} kann ermittelt werden. Im Anschluss wurde Calcium-haltige Badlösung mit (10^{-5} M) Ionomycin appliziert und R_{\max} konnte ermittelt werden.

2.3.5 Grundlagen der Berechnung der intrazellulären Calciumkonzentration

Die Berechnung der intrazellulären Calciumkonzentration sollte von Störfaktoren wie Farbstoffkonzentration in der Zelle, Ausbleichen durch das fluoreszenzanregende Licht sowie den Verlust an Farbstoff durch Exozytose und weiteren äußeren Faktoren weitgehend unabhängig sein. Dazu bildeten Grynkiewicz et al. [73] den Quotienten aus den sich entgegengesetzt verhaltenden Fluoreszenzintensitäten bei den Wellenlängen von 340 und 380 nm. So war es möglich, die Furakonzentration der Zellen mathematisch zu kürzen. Der Quotient 340/380 nm ist proportional zur Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration. Dadurch konnte die absolute intrazelluläre Calciumkonzentration unabhängig von den oben genannten Faktoren errechnet werden.

2.3.6 Errechnung von $[Ca^{2+}]_i$ durch Bildung des Quotienten

Für den Ca^{2+} -freien Farbstoff gilt bei definierter Wellenlänge:

$$F_i = S * C_f \quad \text{Gleichung 1}$$

F_i = Fluoreszenzintensität (V),

S = Proportionalitätsfaktor des Farbstoffes (Grundeigenschaft),

C_f = Konzentration des freien Farbstoffs (nmol/l)

Nach dem der Farbstoff Ca^{2+} bindet, ändert er seine Fluoreszenzeigenschaft und Fura liegt als Farbstoffgemisch in gebundener (C_b) als auch in freier Form (C_f) vor:

$$\text{Wellenlänge 1 bei 340 nm: } F_{i1} = S_{f1} * C_f + S_{b1} * C_b \quad \text{Gleichung 2}$$

$$\text{Wellenlänge 2 bei 380 nm: } F_{i2} = S_{f2} * C_f + S_{b2} * C_b$$

$S_{f1/2}$ = Proportionalitätsfaktor für freien Farbstoff

$S_{b1/2}$ = Proportionalitätsfaktor für gebundenen Farbstoff

C_b = Konzentration des gebundenen Farbstoffes (nmol/l)

Nach dem Massenwirkungsgesetz gilt bei einer Bindungsstöchiometrie von 1:1 für Fura mit Ca^{2+} :

$$K_d = [Ca^{2+}]_i * \frac{C_f}{C_b} \quad \text{Gleichung 3}$$

K_d = Dissoziationskonstante (nach Grynkiewicz et al.[52] : 224 nmol/l)

[Ca²⁺]_i = intrazelluläre Kalziumkonzentration (nmol/l)

Daraus folgt:

$$\mathbf{Cb} = [\text{Ca}^{2+}]_i * \frac{\text{Cf}}{\text{Kd}} \quad \text{Gleichung 4}$$

C_b wird nun in Gleichung 2 eingesetzt, diese enthält dadurch [Ca²⁺]_i:

$$\mathbf{Fi_1} = \text{Sf}_1 * \text{Cf} + \text{Sb}_1 * [\text{Ca}^{2+}]_i * \frac{\text{Cf}}{\text{Kd}} = \left(\text{Sf}_1 + [\text{Ca}^{2+}]_i * \frac{\text{Sb}_1}{\text{Kd}} \right) * \text{Cf}$$
$$\mathbf{Fi_2} = \text{Sf}_2 * \text{Cf} + \text{Sb}_2 * [\text{Ca}^{2+}]_i * \frac{\text{Cf}}{\text{Kd}} = \left(\text{Sf}_2 + [\text{Ca}^{2+}]_i * \frac{\text{Sb}_2}{\text{Kd}} \right) * \text{Cf} \quad \text{Gleichung 5}$$

Durch die Quotientenbildung aus Fi_1 und Fi_2 ($R_{340/380} = R$) wird es möglich, die Konzentration des freien Farbstoffes (Cf) wegzukürzen. Daraus ergibt sich:

$$\mathbf{R_{\frac{340}{380}}} = \frac{\text{Fi}_1}{\text{Fi}_2} = \frac{\left(\text{Sf}_1 + [\text{Ca}^{2+}]_i * \frac{\text{Sb}_1}{\text{Kd}} \right)}{\left(\text{Sf}_2 + [\text{Ca}^{2+}]_i * \frac{\text{Sb}_2}{\text{Kd}} \right)} \quad \text{Gleichung 6}$$

Durch Umformung ergibt sich für $[Ca^{2+}]_i$:

$$[Ca^{2+}]_i = Kd * \left(\frac{R - \left(\frac{Sf_1}{Sf_2} \right)}{\left(\frac{Sb_1}{Sb_2} \right) - R} \right) * \frac{Sf_2}{Sb_2} \quad \text{Gleichung 7}$$

Sf ist Proportionalitätsfaktor für den freien Farbstoff, d.h. Sf_1/Sf_2 ($= R_{min}$) entspricht dem Quotienten aus den Fluoreszenzintensitäten unter Ca^{2+} -freien Bedingungen (siehe Gleichung 2; Sb_1 und Sb_2 werden 0); Sb ist Proportionalitätsfaktor für den gebundenen Farbstoff, d.h. Sb_1/Sb_2 ($= R_{max}$) entspricht dem Quotienten aus den Fluoreszenzintensitäten unter Ca^{2+} -gesättigten Bedingungen (siehe Gleichung 2; Sf_1 und Sf_2 werden 0) R_{min} und R_{max} kann man experimentell durch später beschriebene Eichungen erhalten. Die Formel zur Berechnung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration lautet also:

$$[Ca^{2+}]_i = Kd * \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} * \frac{Sf_2}{Sb_2} \quad \text{Gleichung 8}$$

Sf_2 bzw. Sb_2 erhält man mit Hilfe einer Grenzwertbetrachtung durch Einsetzen in die erste Formel bei maximaler bzw. minimaler Kalziumkonzentration:

Bei der Anregungswellenlänge von 380 nm gilt unter Ca^{2+} -freien Bedingungen:

$$[Ca^{2+}]_i = Kd * \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} * \frac{Fi_{2Ca^{2+} - frei}}{Fi_{2Ca^{2+} - geb}} \quad \text{Gleichung 9}$$

R_{max} , R_{min} und R werden in den unten beschriebenen Eichversuchen ermittelt.

2.3.7 Statistik

Die Gesamtzahl der Experimente wurde mit n angegeben. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean) angegeben. Zum Vergleich wurde der ungepaarte t-Test nach Student durchgeführt. Signifikanz wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen. Es gilt (Abbildung der Balkendiagramme): $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***). Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration beziehungsweise Kontraktionsänderungen wurden als signifikant bewertet, wenn sie $p < 0,05$ waren.

2.3.8 Verwendete Lösungen und Chemikalien

Stammlösungen: HEPES-Ringer in M: 151 Na^+ ; 5 K^+ ; 1,7 Ca^{2+} ; 0,9 Mg^{2+} ; 156,7 Cl^- ; 0,9 SO_4^{2-} ; 1 H_2PO_4^- ; 10 HEPES $^-$; 5 Glucose

Fura 2-AM wurde in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst und lag als Stammlösung mit 5 mM vor. Für die Versuche wurde die Stammlösung mit Badlösung auf 5 μM weiter verdünnt.

Ionomycin wurde in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst und lag als Stammlösung mit 10 mM vor. Für die Versuche wurde die Stammlösung mit Badlösung auf 10 μM weiter verdünnt.