

Aus dem Physiologischen Institut
der Ludwigs-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Vegetative Physiologie
Vorstand: Prof. Dr. U. Pohl

**Zelluläre Mechanismen der Dilatation
isolierter Widerstandsarterien durch NO-
Donatoren und den Endothelabhängigen
Hyperpolarisierenden Faktor**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Michael Neininger
aus Ludwigsburg

2004

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Pohl

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. W.-M. Franz
Prof. Dr. J. Remien

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Steffen-Sebastian Bolz

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 7. 10. 2004

Inhaltsverzeichnis

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
2. EINFÜHRUNG.....	8
2.1 Allgemeine Prinzipien der Kreislaufregulation	8
2.2 Regulation des Kontraktionszustandes von glatten Muskelzellen	10
2.2.1 Allgemeine Prinzipien.....	10
2.2.2 Beeinflussung des Kontraktionszustandes von glatten Muskelzellen durch ihr Membranpotential	11
2.3 NO.....	12
2.3.1 Durch cGMP vermittelte Effekte von NO	13
2.3.2 cGMP unabhängige Wirkmechanismen von NO	14
2.4 Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF).....	15
3. FRAGESTELLUNG	18
4. MATERIAL UND METHODEN	20
4.1 Gefäßpräparation	20
4.1.1 Entnahmetechnik.....	20
4.1.2 Organbad.....	22
4.1.3 Kanülierung.....	23
4.1.4 Entfernung des Endothels	26

4.2	Ca²⁺-Meßsystem	26
4.3	Durchmesserregistrierung.....	31
4.4	Versuchsprotokolle	31
4.4.1	Beladung der Gefäße mit Fura-2	31
4.4.2	Applikation und Auswaschen von Agenzien	32
4.4.3	Kriterien für Endothelfunktion und glattmuskuläre Reaktivität .	32
4.4.4	Versuchsablauf und Inkubationszeiten	33
4.5	Auswertungen und Darstellung der Ergebnisse.....	35
4.6	Nichtlineare Regressionsanalysen	37
4.7	Lösungen und Chemikalien	40
5.	ERGEBNISSE	43
5.1	Die Vorkontraktion der isolierten Widerstandsgefäße mit Noradrenalin	43
5.2	Die Dilatation noradrenalin-vorkontrahierter Widerstandsarterien durch verschiedene Konzentrationen des endothelunabhängigen NO-Donors S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin (SNAP).....	44
5.2.1	Effekte des „Sham-Treatments“ (Kontrollversuch)	44
5.2.2	Effekte niedriger Konzentrationen (0,1 µmol/l) des NO-Donors SNAP	46
5.2.3	Effekte mittlerer Konzentrationen (1 µmol/l und 10 µmol/l) von SNAP	51
5.2.4	Effekte hoher SNAP Konzentration (100 µmol/l)	55

5.3	Die Effekte von 1µmol/l Acetylcholin.....	60
5.4	Auswirkungen der Depolarisation mit 75mmol/l K⁺ auf die SNAP-induzierte Dilatation	62
5.5	Auswirkungen des K_{Ca}-Kanalblockers Charybdotoxin (CTX) auf die SNAP induzierte Dilatation.....	64
5.6	Effekte des Calciumkanalblockers Felodipin.....	66
5.7	Auswirkungen des K_{Ca}-Kanalblockers Charybdotoxin und des NO-Synthasehemmers L-Nitroarginin auf die acetylcholin-induzierte Dilatation	67
5.8	Auswirkungen des Guanylatcyclaseblockers ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-eins) auf die SNAP-induzierte Dilatation	69
5.9	Auswirkungen des NO-Synthase-Hemmers L-NA auf die ACh-induzierte Dilatation	70
5.10	Die Auswirkungen des Blocks der löslichen-Guanylatcyclase mit ODQ auf die ACh-induzierte Dilatation	71
6.	DISKUSSION	73
6.1	NO.....	73
6.2	EDHF.....	85
7.	ZUSAMMENFASSUNG.....	92

8. LITERATURVERZEICHNIS	96
9. ANHANG: PUBLIKATIONEN / KONGRESSBEITRÄGE	103
10. TABELLARISCHER LEBENSLAUF	104
11. DANKSAGUNG	108

1. Abkürzungsverzeichnis

η	Viskosität
λ	Wellenlänge
Δ Dia	Durchmesseränderung
Δ P	Druckdifferenz
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Konzentration von freiem Calcium
μ m	Mikrometer
ACh	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BK _{Ca} -Kanal	"big conductance" calciumabhängiger Kaliumkanal (deutsch: calciumabhängiger Kaliumkanal mit grosser Leitfähigkeit)
cGMP	Cycloguanosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
CTX	Charybdotoxin
CYP 2C8/9	Cytochrom P450 2C8/9
d	Durchmesser des Gefäßes
D _a	Aussendurchmesser des Gefäßes
D _i	Innendurchmesser des Gefäßes
DMSO	Dimethylsulfoxid
d _{NA}	Durchmesser des Gefäßes im „steady-state“ nach Vorkontraktion mit Noradrenalin
EDHF	Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor (deutsch: Endothelabhängiger Hyperpolarisierender Faktor)
EDRF	"Endothelium Derived Relaxing Factor" (deutsch: Endothelabhängiger dilatierender Faktor; als Stickstoffmonoxid identifiziert)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EET	Epoxyeicosatriensäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
F	Variationskoeffizient der nichtlinearen Regression
F _{350nm}	Fluoreszenzintensität von Fura-2 bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 350nm
F _{380nm}	Fluoreszenzintensität von Fura-2 bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 380nm
FAD	Flavinadenindinucleotid
FMN	Flavinadeninmononucleotid
Fura-2 AM	Furaacetoxymethylester

GTP	Guanosintriphosphat
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP ₃	Inositoltriphosphat
K _{Ca} -Kanal	Calcium-abhängiger Kaliumkanal
K _D	Dissoziationskonstante von Fura-2
kDa	Kilo Dalton
KG	Körpergewicht
K _{IR} -Kanal	"Inward rectifier" Kaliumkanal (deutsch: Einwärts gleichrichtender Kaliumkanal)
L	Länge
L-NA	L-Nitroarginin
L-NAME	N-Nitro-L-Arginin-methylester
L-Typ Ca ²⁺ -Kanal	spannungsabhängiger Calciumkanal
MLCK	Myosin Light Chain Kinase (deutsch: Myosinleichtkettenkinase)
MLCP	Myosin Light Chain Phosphatase (deutsch: Myosinleichtkettenphosphatase)
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
n	Anzahl der Versuche
NA	Noradrenalin
NADPH	Nikotinamid-Adenindinukleotid-Phosphat
nm	Nanometer
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Nitric Oxide (Stickstoffmonoxid)
NOS	NO-Synthase
ODQ	[1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-eins]
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
Q	Stromstärke
r	Radius
R	Widerstand
R ² _{Korr}	Korrigierter Korrelationskoeffizient der nichtlinearen Regression
RF	Ratio der Fluoreszenzintensität F ₃₅₀ /F ₃₈₀
RF _{NA}	Ca ²⁺ -Ratio im „steady-state“ nach Vokontraktion mit Noradrenalin
RyR	Ryanodine-sensitive Ca ²⁺ -release channels (deutsch: Durch Ryanodin aktivierbarer Ca ²⁺ -Kanal)
s	Wandstärke
SEM	Standard Error of the Mean (deutsch: Standardfehler des Mittelwertes)
sGC	soluble Guanylatcyclase (deutsch: lösliche Guanylatcyclase)

SNAP
SNP

S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin
Sodium-Nitroprussid-Hydrochlorid

2. Einführung

2.1 Allgemeine Prinzipien der Kreislaufregulation

Eine gleichzeitige, maximale Durchblutung aller Organe des erwachsenen Menschen würde ein Herzzeitvolumen von mehr als 70 Litern pro Minute erfordern, was die maximale Pumpleistung des Herzens von ca. 25 Litern pro Minute bei weitem übersteigen würde. Der Blutfluss muss daher bedarfsgerecht erfolgen und überdies so verteilt werden, dass die Bedürfnisse aller Organe erfüllt werden.

Unter der Annahme, dass ein Blutgefäß einem laminar durchströmten, starren Rohr entspricht, lässt sich die Stromstärke in einem Blutgefäß näherungsweise durch das Hagen-Poiseuillesche Gesetz beschreiben:

$$Q = \frac{\pi \Delta P r^4}{8 \eta l}$$

(mit Q =Stromstärke, ΔP =Druckdifferenz, r =Radius, η =Viskosität, l =Länge).

Danach hängt die Stromstärke vor allem vom Radius r des Blutgefäßes ab. Daher ist im Blutgefäßsystem der größte Teil des Strömungswiderstandes in den kleinen Arterien und Arteriolen lokalisiert. Es sind vor allem diese Gefäße, welche die bedarfsgerechte Verteilung des Blutflusses über ihren Durchmesser regulieren.

Diese Durchmesserregulation beruht unter anderem auf der „myogenen Reaktion“ (auch „Bayliss-Effekt“, Bayliss 1919): Vor allem arterielle Gefäße reagieren bei Erhöhung des transmuralen Druckes mit einer Kontraktion, die ohne Beteiligung der Gefäßnerven zustande kommt. Im Druckbereich zwischen etwa 60 und 160mmHg ermöglicht die myogene

Reaktion so eine „Autoregulation“ des Blutflusses, d. h. trotz Änderung des arteriellen Druckes ändert sich die Durchblutung (vor allem in Niere, Gehirn und intestinalem Gefäßsystem) nur wenig, da bei arterieller Druckzunahme eine Kontraktion ausgelöst wird, die den Strömungswiderstand der Gefäße erhöht und somit den Blutfluss weitgehend konstant hält.

Allerdings ist die myogene Reaktion ein potentiell sich selbst verstärkender Regelmechanismus. Sie führt nämlich zu einer Erhöhung des transmuralen Druckes, der wiederum über den gleichen Mechanismus zu einer weiteren Vasokonstriktion führen kann. Unter physiologischen Bedingungen wird dieser Effekt soweit antagonisiert, dass eine bedarfsgerechte Verteilung des Blutflusses entsteht. Abhängig von der Gefäßgröße geschieht dies hauptsächlich durch Metabolite oder Autakoide, wie z.B. NO (Stickstoffmonoxid), das u.a. in Abhängigkeit von der Wandschubspannung im Endothel gebildet wird. Die kleinen, terminalen Widerstandsgefäße werden vor allem durch lokalchemische Einflüsse und Metabolite, wie niedriger Gewebe- pO_2 , und erhöhter pCO_2 sowie erhöhte Konzentrationen von H^+ , K^+ , PO_4^{2-} -Ionen sowie Hyperosmolarität, entsprechend dem lokalen Bedarf dilatiert. Allerdings sind nur die terminalen Widerstandsgefäße diesem direkten, lokalchemischen Einfluß von Metaboliten durch Diffusion zugänglich. Um die vollen Durchblutungsreserven auszuschöpfen, ist aber auch eine Dilatation der vorgeschalteten, größeren Arterien notwendig. Dies geschieht durch die sog. „conducted dilation“ (weitergeleitete Vasodilatation), die über elektrotonisch weitergeleitete Änderungen des Membran-

potentials und über die flussabhängige Produktion von gefäßdilatierenden Faktoren vermittelt wird. Durch die Flusserhöhung bei Dilatation der distalen Widerstandsgefäße steigt die Wandschubspannung auch in den noch kontrahierten, proximalen Abschnitten des Gefäßbaums. Diese, durch das strömende Blut ausgeübte, mechanische Stimulation, führt in den die Gefäßwand auskleidenden Endothelzellen zur Produktion von hauptsächlich zwei Faktoren: Prostaglandin PGI_2 und / oder NO, welche die Blutgefäße dilatieren und somit den notwendigen, höheren Blutfluss ermöglichen.

2.2 Regulation des Kontraktionszustandes von glatten Muskelzellen

2.2.1 Allgemeine Prinzipien

Wie die Skelettmuskelzelle verkürzt sich auch die glatte Muskelzelle, indem die Aktin- und Myosinfilamente aneinander entlang gleiten. Durch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wird unter Vermittlung von Calmodulin das Enzym Myosinleichtkettenkinase (Myosin Light Chain Kinase, MLCK) aktiviert, welches dann durch Phosphorylierung einer der beiden, am Myosinkopf lokalisierten, leichten Ketten die Kontraktion auslöst. Sobald die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration sinkt, relaxiert der glatte Muskel wieder, da dann die Aktivität der MLCK vermindert wird, während gleichzeitig das Myosin durch die Myosinphosphatase dephosphoryliert wird. Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wird physiologisch zum Beispiel über die Bindung von Noradrenalin an α_1 -Rezeptoren der glatten Muskelzel-

len ausgelöst. Das durch den Second-messenger IP_3 (Inositolriphosphat) aus intrazellulären Speichern freigesetzte Ca^{2+} wird von der Ca^{2+} -ATPase bzw. dem Na^+/Ca^{2+} -Austauscher der Plasmamembran sowie von einer Ca^{2+} -ATPase des Sarcoplasmatischen Retikulums wieder aus dem Cytoplasma entfernt.

2.2.2 Beeinflussung des Kontraktionszustandes von glatten Muskelzellen durch ihr Membranpotential

Neben dem Calcium, das rezeptorvermittelt aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt wird, ist auch das aus dem Extrazellulärraum über spannungsabhängige Calciumkanäle (L-Typ Ca^{2+} -Kanäle) einströmende Calcium von großer Bedeutung für die Regulation des Kontraktionszustandes. Depolarisation der Zellmembran erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit von spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanälen und damit den Einstrom von Calcium in die Zelle und führt so zu einer Kontraktion. Umgekehrt erniedrigt Hyperpolarisation der Zellmembran diese Öffnungswahrscheinlichkeit und senkt somit den Einstrom von Calcium.

Generell führt die Öffnung von Kaliumkanälen über den Ausstrom von positiv geladenen Kaliumionen (K^+) zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran. Das Ruhemembranpotential der arteriellen, glatten Gefäßmuskelzellen wird hauptsächlich von der Öffnungswahrscheinlichkeit der „inward rectifier“ (K_{IR}) Kaliumkanäle bestimmt. Das bedeutet, dass der Durchmesser von arteriellen Blutgefäßen (und damit letztlich der Blutfluss) vom Membranpotential der glatten Muskelzellen in der Ge-

fäßwand mitbestimmt wird: Depolarisation führt zu einer Kontraktion des Gefäßes, Hyperpolarisation zu einer Dilatation.

2.3 NO

Für die Entdeckung und Identifizierung des sog. „Endothelium Derived Relaxing Factors“ als NO erhielten Robert Francis Furchgott, Louis J. Ignarro und Ferid Murad 1998 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin (Übersicht bei SoRelle 1998; s.a. Furchgott und Zawadzki 1980; Ignarro et al. 1987; Palmer et al. 1987).

NO wird durch das Enzym NO-Synthase aus L-Arginin unter Beteiligung der Cofaktoren Nikotinamid-Adenindinucleotid-Phosphat (NADPH), Flavinadeninmononucleotid (FMN), Flavinadenindinucleotid (FAD), Tetrahydrobiopterin und Sauerstoff gebildet.

Es werden drei Isoformen der NO-Synthase unterschieden: Die endotheliale (eNOS), die neuronale (nNOS) und die induzierbare NO-Synthase (iNOS). Die Aktivität der eNOS wird u.a. calciumabhängig über die Assoziation des Calcium/Calmodulin Komplexes mit einer spezifischen Calmodulin bindenden Domäne der NOS reguliert; aber auch eine Reihe anderer, z.T. komplexer Regulierungsvorgänge ist beschrieben worden (Übersicht bei Fleming und Busse 1999). Für die kontinuierliche Bildung von NO durch das Endothel ist die endotheliale Wandschubspannung, die vom strömenden Blut erzeugt wird, eine der wichtigsten Stimuli (Übersicht bei Fisher et al. 2001).

Es wurde eine Vielzahl von Wirkmechanismen von NO beschrieben. (Übersicht bei Fleming und Busse 1999). Prinzipiell werden die Effekte von NO am glatten Gefäßmuskel entweder durch die Bildung des

second messengers Cycloguanosinmonophosphat (cGMP) vermittelt (cGMP abhängige Effekte), oder sie kommen durch eine direkte Wirkung von NO in den glatten Gefäßmuskelzellen ohne die Bildung eines second messengers zustande (cGMP unabhängige Effekte).

2.3.1 Durch cGMP vermittelte Effekte von NO

Die Mehrzahl der beschriebenen Effekte von NO wird über die Aktivierung des Enzyms „lösliche Guanylatcyclase“ (sGC) und die Bildung des second messengers Cycloguanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) vermittelt. Im glatten Gefäßmuskel aktiviert cGMP hauptsächlich die cGMP-Kinase I, die glatte Gefäßmuskelzellen durch verschiedene Mechanismen dilatieren kann:

1. Durch die Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und Aktivierung einer sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase (Andriantsitohaina et al. 1995).
2. Durch die Aktivierung einer Ca^{2+} -ATPase und/oder $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase der Plasmamembran (Furukawa et al. 1991).
3. Durch die Aktivierung von „big conductance“ BK_{Ca} -Kanälen, die zur Hyperpolarisation der Plasmamembran und damit zur Verringerung des Ca^{2+} -Einstroms durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle führt (Archer et al. 1994; Carrier et al. 1997; Fukao et al. 1999).
4. Durch die Hemmung der agonisten-induzierten Bildung von IP_3 und durch die Phosphorylierung des IP_3 -Rezeptors (Ruth et al. 1993; Komalavilas und Lincoln 1994; Komalavilas und Lincoln 1996).
5. Durch Senkung der Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktiven Apparates. Dabei erhöht cGMP die Aktivität des Enzyms Myosinleichtket-

tenphosphatase (MLCP), das die Myosinleichtketten dephosphoryliert und damit den glatten Gefäßmuskel ohne Veränderung des intrazellulären Calciumspiegels relaxiert (Wu et al. 1996, Gong et al. 1997, Übersicht bei Carvajal et al. 2000 und Somlyo und Somlyo 2000).

Welche der beschriebenen Wirkmechanismen von NO unter physiologischen Bedingungen in den Widerstandsgefäßen des Kreislaufs (den kleinen Arterien und Arteriolen) tatsächlich relevant sind, ist noch nicht abschließend geklärt.

2.3.2 cGMP unabhängige Wirkmechanismen von NO

Bolotina et al. beschrieben die direkte Aktivierung von calciumabhängigen Kaliumkanälen (K_{Ca} -Kanälen) in glatten Gefäßmuskelzellen durch NO (Bolotina et al. 1994). Durch die resultierende Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen wird der Einstrom von Ca^{2+} durch spannungsabhängige (L-Typ) Ca^{2+} -Kanäle verringert und der glatte Gefäßmuskel relaxiert.

Ein weiterer cGMP unabhängiger Wirkmechanismus von NO ist die Erleichterung der sog. Auto-Ribosylierung. Gewöhnlich wird die Bindung von ADP-Ribose-Gruppen an Proteine durch Enzyme katalysiert, so z. B. bei der ADP-Ribosylierung von G-Proteinen durch das Choleratoxin. NO kann jedoch enzymunabhängig die Übertragung einer ADP-Ribose-Gruppe auf ein Empfängerprotein erleichtern und damit eine Auto-Ribosylierung ermöglichen. NO inaktiviert auf diese Weise z. B. das glycolytische Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und

inhibiert damit die Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) aus der Glykolyse (Dimmeler et al. 1992).

2.4 Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF)

Neben den endothelialen Autakoiden NO und Prostaglandin I₂ (PGI₂) wurde von mehreren Autoren die Existenz eines dritten Faktors beschrieben, der von Endothelzellen z.B. nach Stimulation mit muskarinergen Agonisten, wie z. B. Acetylcholin, freigesetzt wird (Bolton et al. 1984; Komori et al. 1988; Felétou und Vanhoutte 1988; Taylor et al. 1988; Chen et al. 1988; Huang et al. 1988). Dieser "endothelabhängige hyperpolarisierender Faktor" (englisch "Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor, EDHF") relaxiert arterielle, glatte Muskelzellen durch Hyperpolarisation. Seine Produktion kann durch Inhibitoren der NO Synthase (NOS) oder der Cyclooxygenase (COX) nicht gehemmt werden (Bény und Brunet 1988, Cowan und Cohen 1991, Mügge et al. 1991, Übersicht bei Feletou und Vanhoutte 1999). Der Beitrag von EDHF zur agonisteninduzierten Dilatation ist abhängig von der Größe der jeweils untersuchten Blutgefäße: Die EDHF-Antwort ist in den kleinen Arterien und Widerstandsarterien wesentlich ausgeprägter als in den großen Arterien (Hwa et al. 1994; Nagao et al. 1992).

Bisher konnte dem EDHF keine eindeutige chemische Natur zugewiesen werden. Es scheint vielmehr so zu sein, dass - abhängig von der untersuchten Spezies und dem untersuchten Gefäßgebiet - unterschiedliche Stoffe und/oder Mechanismen die Effekte des EDHF vermitteln. Edwards et al. postulierten, dass der EDHF in der *Arteria hepatica* der Ratte K⁺ sein könnte, welches durch charybdotoxin- und apa-

minhemmbare Kaliumkanäle in den myoendothelialen Raum zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen diffundiert (Edwards et al. 1998). Der resultierende Anstieg der K^+ -Ionen-Konzentration im myoendothelialen Raum soll dann zur Aktivierung von Ba^{2+} -hemmbaren Kaliumkanälen und der Na^+/K^+ -ATPase der glatten Muskelzellen führen. Die entstehende Hyperpolarisation würde die glatten Gefäßmuskelzellen relaxieren.

Bereits in frühen, pharmakologischen Studien ergaben sich Hinweise, dass EDHF eine Epoxyeicosatriensäure (EET) sein könnte. EETs sind kurzlebige Metaboliten der Arachidonsäure, die Cytochrom P450-abhängig gebildet werden. EETs erhöhen die Offenwahrscheinlichkeit von calciumabhängigen Kaliumkanälen (K_{Ca} -Kanälen) und hyperpolarisieren so glatte Muskelzellen (Campbell et al. 1996). Die bislang verfügbaren, pharmakologischen Cytochrom P450 Inhibitoren waren in den notwendigen, hohen Konzentrationen allerdings sehr unspezifisch, und in einigen Gefäßen hemmten chemisch unterschiedliche Inhibitoren von Cytochrom P450 die EDHF Antwort nicht oder verursachten nur unspezifische Effekte (Chataigneau et al. 1998; Fukao et al. 1997).

Jedoch konnten Bolz et al. und Fisslthaler et al. mit molekularbiologischen Studien zeigen, dass Cytochrom P450 2C8/9 (CYP 2C8/9) in Skelettmuskelgefäßen des Hamsters bzw. in Schweinekoronararterien eine „EDHF Synthase“ ist (Bolz et al. 2000; Fisslthaler et al. 1999). Die Effekte von EDHF wurden in beiden Modellen durch Cytochrom P450-2C8/9 Antisenseoligonucleotide gehemmt.

Auch die Frage, welche Rolle EDHF in unterschiedlichen Spezies und den verschiedenen Abschnitten des Gefäßbaumes spielt, ist noch nicht abschließend geklärt. Von mehreren Autoren wurde sowohl in tierexperimentellen Studien (Mügge et al. 1991; Nagao et al. 1992) als auch an menschlichen Blutgefäßen (Woolfson and Poston 1991; Urakami-Harasawa et al. 1997) gezeigt, dass der Beitrag von EDHF zur Gefäßdilatation von der Größe der untersuchten Blutgefäße abhängt.

Außerdem kann nicht nur EDHF, sondern auch NO in einigen Spezies, wie z.B. dem Meerschweinchen und dem Hasen, glatte Muskelzellen durch Hyperpolarisation dilatieren. Cohen et al. konnten zeigen, dass in der *Arteria carotis* des Kaninchens die Acetylcholin (ACh)-induzierte, nicht durch L-Nitroarginin (L-NA) und Indomethacin hemmbare Dilatation vollständig durch die Kombination von zwei NO-Synthase-Inhibitoren (L-NA und N-Nitro-L-Arginin-methylester [L-NAME]) hemmbar ist (Cohen et al. 1997). Aufgrund dieser Befunde wäre es denkbar, dass einige der Effekte, die bisher dem EDHF zugeschrieben wurden, tatsächlich durch NO vermittelt sein könnten.

3. Fragestellung

Eine Vielzahl von Effekten von NO wurde an unterschiedlichen, experimentellen Modellen beschrieben. Unklar ist bis jetzt jedoch, welche Wirkmechanismen von NO in den Widerstandsgefäßen des Kreislaufs (den kleinen Arterien und Arteriolen) tatsächlich relevant sind. In der vorliegenden Arbeit sollten daher die Mechanismen der Dilatation von isolierten Widerstandsarterien des Hamsters durch NO untersucht werden:

- Sind direkte Wirkungen von NO am glatten Gefäßmuskel ohne Bildung des „second messengers“ cGMP nachweisbar?
- Spielt die Aktivierung von K_{Ca} -Kanälen eine Rolle?
- Spielen calciumdesensitivierende Mechanismen bei der Dilatation der isolierten Widerstandsarterien durch NO eine Rolle?

Die Hypothese der Existenz eines oder evtl. auch mehrerer endothelabhängiger, hyperpolarisierender Faktoren ist mittlerweile durch eine Reihe von experimentellen Befunden belegt. Allerdings kann auch NO glatte Gefäßmuskelzellen durch Hyperpolarisation relaxieren. Viele Interpretationen der Wirkungsweise von EDHF basieren auf einer pharmakologischen Hemmung der Bildung von NO, die jedoch unvollständig sein könnte. Einige der beschriebenen Effekte von EDHF könnten daher doch durch NO bedingt sein. Außerdem ist noch nicht geklärt, welche Rolle EDHF in den Widerstandsgefäßen des Kreislaufs, den kleinen Arterien und Arteriolen, tatsächlich spielt. Daher sollte im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die EDHF-vermittelte Dilatation im Modell

der isolierten Widerstandsarterie des Hamsters untersucht und dann mit der NO-induzierten Dilatation verglichen werden. Dieser Vergleich sollte die Beantwortung folgender Fragen ermöglichen:

- Lassen sich NO- und EDHF-abhängige Dilatationen in Widerstandsgefäßen unterscheiden?
- Werden die NO-induzierte und die EDHF-induzierte Dilatation durch verschiedene, intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen vermittelt?
- Über welche zellulären Mechanismen wird die EDHF-abhängige Dilatation vermittelt? Spielt dabei in Widerstandsgefäßen die Aktivierung von calciumabhängigen Kaliumkanälen (K_{Ca} -Kanälen) eine Rolle?

4. Material und Methoden

4.1 Gefäßpräparation

4.1.1 Entnahmetechnik

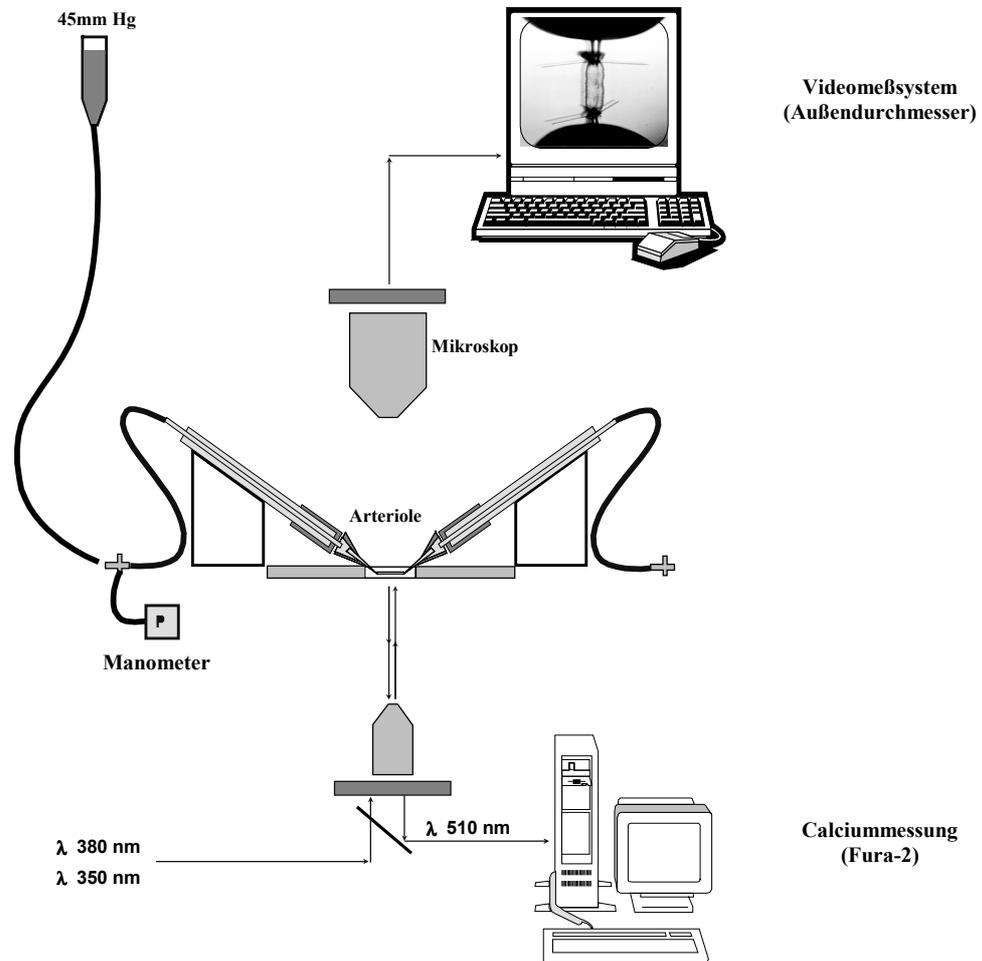
Weibliche, syrische Goldhamster (Körpergewicht 90-140g, Alter 3-8 Monate) wurden durch intraperitoneale Injektion von 50mg/kg Körpergewicht Pentobarbital-Natrium anästhesiert. Die Hinterläufe des Hamsters wurden rasiert, in Rückenlage gespreizt und dann mit Fäden fixiert. Nach Entfernung von Haut und subkutanem Fettgewebe des rechten Oberschenkels wurden die proximale *Arteria u. Vena femoralis* dargestellt. Das Versuchstier wurde danach durch eine intrakardiale Pentobarbital-Injektion getötet. Um mögliches Einströmen des intrakardial injizierten Pentobarbitals in das Präparationsgebiet zu vermeiden, wurde der Blutstrom zuvor durch eine Gefäßklemme (Dumont & Fils, Schweiz) ca. 1,5cm proximal des Präparationsgebietes unterbrochen. Das Gefäßbett distal der *Arteria femoralis* wurde unter einem Operationsmikroskop (OP-Mikroskop, Zeiss Jena) durch vorsichtiges, schichtweises Abtragen des *Musculus quadriceps femoris* mit mikrochirurgischen Instrumenten (Dumont & Fils, Schweiz, INOX 4 u. 5; Irisschere Aesculap OC 498) dargestellt und von den begleitenden Venen befreit. Eine kleine, muskelversorgende Arterie der 2. oder 3. Gefäßgeneration der *Arteria profunda femoris* (Außendurchmesser 100 - 220µm), die in dem zu präparierenden Abschnitt keine Abgänge aufweisen durfte, wurde anschließend unter Vermeidung von Zug atraumatisch von Bindegewebe freipräpariert, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass

Bindegewebsreste die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Durchmesser-messungen (siehe 4.3, *Durchmesserregistrierung*) beeinträchtigten.

Während der Präparation wurde das Präparationsgebiet kontinuierlich mit gekühltem (4 °C) Präparations-3-[N-Morpholino]propansulfonsäure - Puffer (Präparations-MOPS-Puffer) superfundiert, dessen Calciumkonzentration reduziert war (Ca^{2+} 1,5mmol/l), um Ruhetonus und Reagibilität der Gefäße herabzusetzen. (Perfusor E, Braun Melsungen; Zusammensetzung des MOPS-Präparationspuffers: Siehe 4.7 *Lösungen und Chemikalien*)

Nach der Präparation wurde die Widerstandsarterie (Außendurchmesser 100-220µm, Länge 1-2mm) vorsichtig aus dem Gefäßbett exzidiert und dann entweder zur sofortigen Kanülierung in das Organbad eingebracht (siehe 4.1.2 *Organbad*), oder bei 4°C in MOPS-Puffer bis zu 24 Stunden aufbewahrt. In Vorversuchen zeigte sich, dass zwischen Widerstandsarterien, die sofort kanüliert und für den Versuch verwendet wurden, und solchen, die bei 4°C für maximal 24 Stunden aufbewahrt wurden, im Hinblick auf alle in dieser Arbeit untersuchten Parameter kein Unterschied feststellbar war. (Siehe auch 4.4.3 *Kriterien für Endothelfunktion und glattmuskuläre Reaktivität*)

4.1.2 Organbad

**Abb. 1: Versuchsaufbau**

Messung des Außendurchmessers der Gefäße mittels Videosystem. Die mit Fura-2 beladene Arteriole wurde alternierend mit 380 und 350nm angeregt und die Emission bei 510nm gemessen. Der hydrostatische Druck P wurde mittels eines Manometers kontrolliert.

Die Gefäße wurden in ein Organbad eingebracht, an dessen beiden Seiten Vorrichtungen zum Kanülieren und Fixieren der Gefäße angebracht waren.

Die Haltevorrichtung bestand beidseits aus je zwei seitlich im Winkel von 45° angebrachten Metallschienen, die durch Mikromanipulatoren

(M-152, Narishige) in allen 3 Ebenen des Raumes präzise bewegt werden konnten. Auf den Metallschienen war durch eine Kunststoffhalterung je eine Pipette aus Glas mit einem Außendurchmesser von 3mm befestigt.

Zur eigentlichen Gefäßkanülierung wurden auf einem Mikropipetten-Puller (Moving Coil Microelectrode Puller Modell 753, Campden, Großbritannien) spitz ausgezogene Mikropipetten mit einem Außendurchmesser von ca. 30 μ m verwendet (Borosilikatglaskapillaren mit Filament, Hilgenberg, L=150mm, $D_a=1,20$ mm $D_i=0,96$ mm $s=0,12$ mm). Die fertige Kanülierungspipette wurde nun so durch die Führungspipette geschoben, dass ihre Spitze ca. 2mm aus der Öffnung der Führungspipette herausragte.

Mit den Mikromanipulatoren wurden beide Pipetten dann in das kreisrunde Organbad (Durchmesser 2,5cm, Tiefe 0,5cm) aus inertem Kunststoff abgesenkt, dessen Boden von einer 50 μ m dicken, UV-gängigen Quarzglasscheibe gebildet wurde (Bachhofer, Reutlingen). Mittels an beiden Kanülierungspipetten angebrachten Schläuchen mit Dreiwegehahnssystem und Injektionsspritzen wurden sämtliche Leitungen und Pipetten des Versuchaufbaus entlüftet und mit Standard-MOPS-Puffer gefüllt.

4.1.3 Kanülierung

Die Widerstandsarterien wurden dann mit maximaler Vergrößerung des OP-Mikroskops (40 fach) vorsichtig bis jeweils zu etwa einem Fünftel der Gefäßlänge auf eine der beiden Glasmikropipetten aufgezogen. Dabei wurde, um eine Traumatisierung zu vermeiden, das Gefäß nur

an den Enden mit einer feinen Pinzette (INOX 5, Dumont & Fils, Schweiz) so gefasst, dass das Gefäßlumen nicht kollabierte.

Das kanülierte Ende wurde nun zunächst mit 11-0 Faden (Ethicon 11-0, Polyamid monofil) durch einen doppelten Knoten auf der Mikropipette befestigt. Um die Kanülierung der Gegenseite zu erleichtern und ein Kollabieren des Gefäßes zu verhindern, wurde nun ein 50cm langes, senkrecht an einem Stativ befestigtes Stück Perfusorleitung (Heidelberger Verlängerung, Braun) luftblasenfrei mit Standard-MOPS-Puffer gefüllt und über das Dreiwegehahnsystem an die Kanülierungspipette angeschlossen, um so einen hydrostatischen Druck von 45mmHg anzulegen.

Die gegenüberliegende Gefäßseite wurde kanüliert, indem die andere Mikropipette mit Hilfe der Mikromanipulatoren unmittelbar am Gefäßende positioniert und das verbliebene Ende der Widerstandsarterie dann mit der Pinzette ebenfalls vorsichtig aufgezo-gen wurde. Auch diese Seite des Gefäßes wurde dann durch einen doppelten Knoten auf der Mikropipette fixiert.

Um das Vorhandensein von Leckagen durch kleine Gefäßabgänge oder nicht ausreichend dichtende Verknotungen sicher auszuschließen, wurde nach Abschluß der Kanülierung die Pufferlösung mit einer Rollerpumpe (PP 100, Brand) schnell aus dem Organbad abgesaugt und das Gefäß dann kurz unter dem OP-Mikroskop durchgemustert, bevor das Organbad nach wenigen Sekunden wieder mit MOPS-Puffer aufgefüllt wurde. Eventuell vorhandene Lecke waren während dieser Prozedur deutlich an der Bildung von Flüssigkeitstropfen zu erkennen. Falls

ein Abdichten des Lecks durch Verschieben des Gefäßes und erneutes Knoten nicht möglich war, wurde das Gefäß verworfen.

Um genügend Freiraum zum Knoten zu haben, wurde das Gefäß im oberen Drittel des 0,5cm tiefen Organbades kanüliert. Daher musste es zunächst noch in der Mitte des Organbades mit Hilfe der Mikromanipulatoren bis ca. 1mm über den Boden in den Arbeitsbereich des Objektivs (Olympus D-APO 20 UV) abgesenkt werden. (Siehe auch 3.2 *Ca²⁺-Meßsystem*)

Der Aufbau wurde nun auf ein inverses Mikroskop (Olympus, IMT-2) transferiert, dessen Bühne durch eine wasserbeheizte Wärmeplatte ersetzt war, welche die Organbadtemperatur bei konstant 37°C hielt.

Die Badlösung war mit Sauerstoff aus der Umgebungsluft gesättigt ("*ambient conditions*"). Häufiges Wechseln der Organbadlösung während des Versuches sollte der Bildung von "*unstirred layers*" entgegenwirken und damit eine ausreichende Sauerstoffversorgung der nur geringen Gewebemasse (Endothel und maximal 3 Schichten glatter Muskulatur) ermöglichen.

Über das Dreiwegehahnsystem wurde die eine Pipette mit einem mit MOPS-Standard-Puffer gefüllten Reservoir verbunden, während die zweite verschlossen wurde. Der unter diesen „no-flow-conditions“ resultierende hydrostatische Druck von 45mmHg wurde während des gesamten Versuches aufrechterhalten und regelmäßig mittels eines Manometers (Eigenkonstruktion) kontrolliert.

Das Gefäß wurde nach Ende der 2-stündigen Inkubation mit Fura-2AM-MOPS-Puffer (Zusammensetzung *siehe 4.7 Lösungen und Chemika-*

lien) mittels Mikromanipulator auf *in-situ* Länge vorgespannt (Siehe auch 4.4.1 Beladung der Gefäße mit Fura-2 und 4.4.4 Versuchsablauf und Inkubationszeiten).

4.1.4 Entfernung des Endothels

Das Endothel der isolierten Widerstandsgefäße wurde entfernt, indem die Gefäße entweder für zwei Minuten mit 50ml/l Saponin (n=4) oder für 5 Minuten mit Luft (n=5) perfundiert wurden.

4.2 Ca^{2+} -Meßsystem

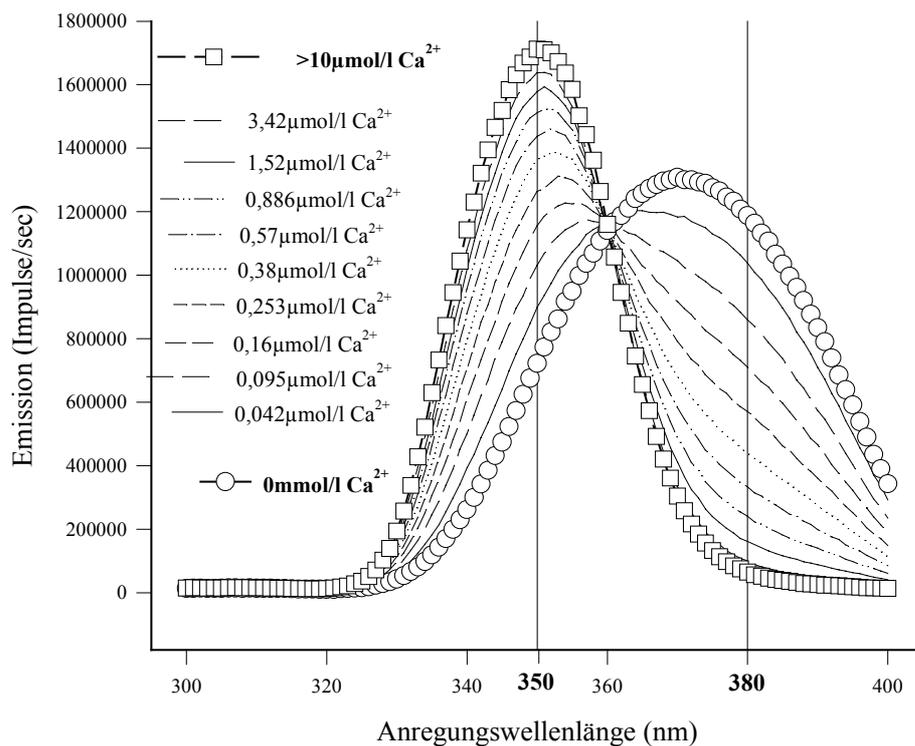


Abb.2: Emissionsintensitäten von Fura-2

Ca^{2+} -Konzentrationen von 0 – 10 $\mu\text{mol/l}$ in zellfreiem Puffer
Anregung mit 300-400nm, Emission gemessen bei 510nm

Die intrazelluläre Konzentration von freiem Calcium $[Ca^{2+}]_i$ wurde fluoreszenzmikroskopisch mit der Fura-2 Methode nach Grynkiewicz et al. bestimmt (Grynkiewicz et al. 1985). Dazu wurde das Gefäß vor Versuchsbeginn zwei Stunden lang mit Fura-Acetoxy-methylester (Fura-AM) inkubiert. Der lipophile Ester diffundiert dabei durch die Zellmembran. Intrazellulär wird durch unspezifische Esterasen die hydrophile, freie Säure Fura-2 abgespalten. So kommt es zu einer intrazellulären Anreicherung von Fura-2 in den glatten Gefäßmuskelzellen.

Die Säure Fura-2 emittiert bei Anregung mit UV-Licht der Wellenlängen 340nm bis 380nm jeweils Licht der Wellenlänge 510nm (Siehe Abb. 2). Die Intensität der Lichtemission bei verschiedenen Anregungswellenlängen hängt nun von der Calciumbindung des Farbstoffes ab: Calciumsättigung des Farbstoffes führt dabei zu maximaler Fluoreszenz bei Anregung mit 350nm (F_{350nm}) und minimaler Fluoreszenz bei Anregung mit 380nm (F_{380nm}).¹ In calciumfreier Lösung hingegen sind die Verhältnisse genau umgekehrt: Die Fluoreszenz bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 350nm (F_{350nm}) wird minimal, während die Fluoreszenz bei

¹ Die Emissionsmaxima von Fura-2 liegen bei 340nm bzw. 380nm. In dem für diese Arbeit verwendeten, Mikroskop-basierten System lagen die Emissionsmaxima bei 350nm bzw. 370nm, da die UV-Gängigkeit des verwendeten Objektivs (Olympus APO UV-20) in diesem Bereich am besten war. Zur Messung wurden die Anregungswellenlängen 350nm und 380nm verwendet, da sich damit der beste Signal Rauschabstand erzielen ließ.

Anregung mit 380nm (F_{380nm}) das Maximum erreicht. Die gemessene absolute Emissionsintensität unter beiden Anregungswellenlängen ist abhängig von der Calciumkonzentration, aber auch von der mit der Zeit durch Bleichung abnehmenden, intrazellulären Fura-Konzentration und dem durch Dilatation und Kontraktion veränderlichen Abstand des Gefäßes zur Schärfeebene.

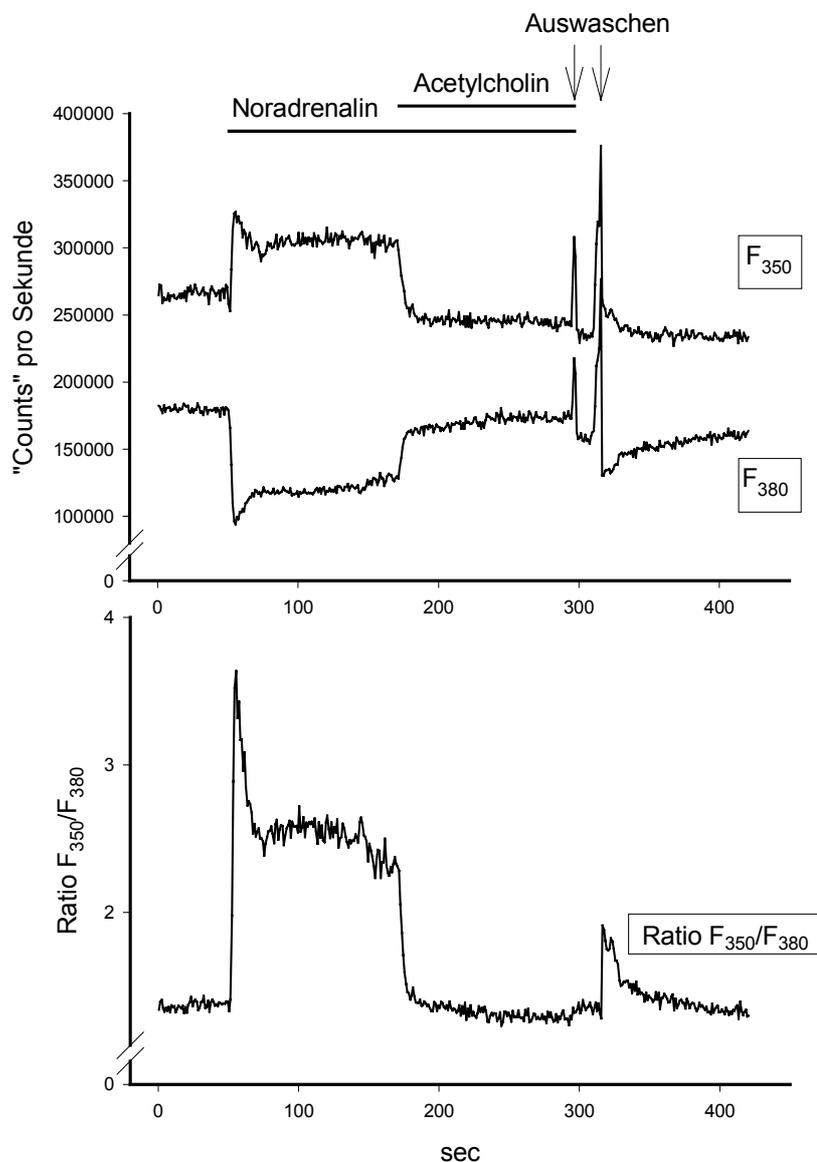


Abb. 3: Calciummessung an einer isolierten Arteriole mit Fura-2

Oben: Anregung mit 350nm und 380nm

Unten: Daraus berechnete Ratio F_{350}/F_{380}

Betrachtet man jedoch anstatt der absoluten Werte das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten, so ist diese Ratio R ($F_{350\text{nm}}/F_{380\text{nm}}$) abhängig von der intrazellulären Calciumkonzentration, aber unabhängig vom Abstand des Gefäßes zur Schärfenebene und von der Konzentration des Farbstoffes in den Zellen.

Abbildung 3 zeigt beispielhaft eine Originalregistrierung der Fluoreszenzintensitäten bei 350 und 380nm und die daraus berechnete Ratio (Siehe auch 4.5 *Auswertungen und Darstellung der Ergebnisse*).

Die so ermittelte Ratio kann im zellfreien System in absolute Calciumkonzentrationen umgerechnet werden (Grynkiewicz et al. 1985). Dazu müssen u. a. die Dissoziationskonstante K_D von Fura-2 und die Ratio bei zwei definierten, intrazellulären Calciumkonzentrationen bekannt sein. In Vorversuchen stellte sich allerdings heraus, dass sich die Werte von K_D in isolierten Arteriolen z. T. erheblich von den *in-vitro*-Werten unterscheiden. Da außerdem die absoluten Calciumkonzentrationen für die in dieser Arbeit untersuchten Fragestellungen keine zusätzlichen Informationen erbracht hätten, wurde auf die Umrechnung in Absolutwerte verzichtet und die Ratio $RF_{350/380}$ angegeben.

Messtechnisch wurde das Präparat hierzu schnell alternierend mit den beiden Wellenlängen 350nm und 380nm angeregt. Verwendet wurde dazu das System „Delta Scan“ der Firma PTI, Wedel. In diesem System wird Licht einer 75W Quecksilberdampflampe durch eine schnell rotierende, in gleichen Abständen mit spiegelnden und transparenten Segmenten besetzte Scheibe („Chopper-Wheel“) alternierend auf zwei Monochromatoren gelenkt. Über zwei Quarzlichtleiter gelangt das mo-

nochromatische Licht dann in den Strahlengang eines invertierten Mikroskops durch das Objektiv auf das Gefäß.

Eine vom Messprogramm gesteuerte Blende („Shutter“) verhinderte eine Bestrahlung des Präparats während der Versuchspausen. (Siehe auch *4.4.4 Versuchsablauf und Inkubationszeiten*)

Das Licht der Emissionswellenlänge 510nm fiel durch das Objektiv zurück und wurde durch einen halbdurchlässigen Spiegel in den Strahlengang eines Photomultipliers reflektiert. Ein nur für Wellenlängen um 510nm durchlässiger Kantenfilter sorgte dafür, dass nur das vom Gefäß emittierte Licht in den Photomultiplier gelangen konnte, dessen elektrisches Signal im Computer digitalisiert und mit der kommerziell erhältlichen Software Felix[®] weiterverarbeitet wurde (Siehe auch *4.5 Auswertungen und Darstellung der Ergebnisse*). Es wurden 10 Meßwerte pro Sekunde ermittelt (jeweils 5 Anregungen/sec bei 350nm und 380nm).

Für die Messung wurde der Fokus des Mikroskops auf die Mitte des Gefäßes eingestellt. Durch eine Blende im Strahlengang des Photomultipliers konnten dann Kanülierungspipetten und Fäden aus dem Messbereich ausgeblendet werden. Die Messungen erfolgten im Dunkeln, um Hintergrundrauschen und Ausbleichen des Farbstoffes möglichst zu minimieren.

Da biologisches Material bei Anregung im UV Bereich ebenfalls fluoresziert, wurden die Fluoreszenzeigenschaften des intrazellulären Furas nach Versuchsende durch Zugabe von 8mmol/l MnCl₂-Lösung aufgehoben. Die nach 10min gemessenen Werte der verbliebenen Hintergrundfluoreszenz bei 350nm und 380nm wurden bei der späteren Aus-

wertung vor Bildung der Ratio von den Rohwerten subtrahiert. (Siehe auch *4.5 Auswertungen und Darstellung der Ergebnisse*)

4.3 Durchmesserregistrierung

Für die eigentliche Messung wurde das Okular des Mikroskops (Olympus IMT-2) gegen eine Restlichtkamera (FA 76 SIT, Grundig) ausgetauscht. Der Außendurchmesser des Gefäßes wurde im Durchlichtverfahren mittels eines Computerprogramms (entwickelt von J. Baxevanis, Medizinische Universität Lübeck, „Frame-Grabber“-Prinzip) kontinuierlich bestimmt (1 Messwert pro Sekunde). Die dazu notwendige, schwache Beleuchtung störte die Calciummessung nicht, da das verwendete Rotlicht (650nm-700nm) durch ein Kantenfilter vor dem Photomultiplier herausgefiltert wurde. Die Durchmessermessung wurde entweder simultan mit der Calciummessung begonnen und beendet oder mit eingeblendetem Zeitsignal (Video Timer, FOR) zur späteren Auswertung auf Videoband aufgezeichnet.

Die Reproduzierbarkeit der Durchmesserregistrierungen, ermittelt durch wiederholtes Ausmessen derselben Versuchssequenz, betrug dabei $\pm 1,5\mu\text{m}$

4.4 Versuchsprotokolle

4.4.1 Beladung der Gefäße mit Fura-2

Das Gefäß wurde bei 37°C mit Fura-2-Acetoxymethylester (Fura-2 AM, Molecular Probes, Oregon, U.S.A) insgesamt 2 Stunden in Standard-MOPS-Puffer inkubiert (Zusammensetzung: *Siehe 4.7 Lösungen und Chemikalien*, Fura-MOPS-Puffer).

Die Inkubation erfolgte zum Schutz vor Ausbleichung des Farbstoffes im Dunkeln. Der Inhalt des Organbades (3ml) wurde nach Ablauf einer Stunde komplett ausgetauscht, um einer Aufkonzentrierung durch Verdunsten vorzubeugen.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Gefäß zweimal mit Standard-MOPS-Puffer gewaschen (Zusammensetzung: Siehe *4.7 Lösungen und Chemikalien*) und dann nach 30-minütiger Ruhepause mit dem Versuch begonnen. (Siehe auch *4.4.4 Versuchsablauf und Inkubationszeiten* und *4.4.2 Applikation und Auswaschen von Agenzien*).

4.4.2 Applikation und Auswaschen von Agenzien

Sämtliche Vasokonstriktoren und -dilatoren wurden mit einer 1000 μ l Eppendorf Pipette appliziert. Dazu wurde aus dem Gesamtvolumen des Organbades von 3ml zunächst 1ml abgenommen. Um die gewünschte Endkonzentration zu erhalten, wurde nun wieder 1ml einer Lösung zugegeben, welche den jeweiligen Stimulus in dreifach höherer als der gewünschten Endkonzentration enthielt.

Um hinzugefügte Substanzen wieder auszuwaschen wurde das Badvolumen zweimal gegen Standard-MOPS-Pufferlösung ausgetauscht (Absaugen mittels Wasserstrahlpumpe und Pasteurpipette; Zupipettieren mit 2500 μ l Eppendorf Pipette).

4.4.3 Kriterien für Endothelfunktion und glattmuskuläre Reaktivität

Zunächst wurde an allen Gefäßen das Kontraktionsverhalten durch Stimulation mit Noradrenalin 0,1 μ mol/l geprüft. Bedingung für die Fortsetzung des Versuchs war eine anhaltende Kontraktion auf mindestens

70% des Ausgangsdurchmessers, die sich über den gesamten nicht-kanülierten Mittelteil des Gefäßes erstrecken musste. Wenn mit Noradrenalin 0,1 $\mu\text{mol/l}$ diese Bedingungen nicht erfüllt wurden, wurde das Gefäß mit Noradrenalin 0,3 $\mu\text{mol/l}$ stimuliert. Wenn auch mit dieser Konzentration keine ausreichende Kontraktion erreicht werden konnte wurde das Gefäß verworfen.

Die Endothelfunktion wurde durch Applikation von 1 $\mu\text{mol/l}$ Acetylcholinlösung überprüft. Nur Gefäße, die daraufhin wieder auf mindestens 90% des Ausgangsdurchmessers dilatierten, wurden in die statistische Auswertung einbezogen.

4.4.4 Versuchsablauf und Inkubationszeiten

Vor Beginn eines jeden Versuches wurde geprüft, ob eine ausreichende Beladung der glatten Muskelzellen mit Fura-2 vorlag. Falls die Emission zu Versuchsbeginn nicht mindestens 8×10^5 Impulse pro Sekunde ($F_{350\text{nm}}$) bzw. 10^6 Impulse pro Sekunde ($F_{380\text{nm}}$) betrug, oder die Emission während des Versuchs unter diese Werte sank, wurde das Gefäß maximal einmal mit Fura-MOPS-Puffer (Zusammensetzung: Siehe *4.7 Lösungen und Chemikalien*) nachinkubiert. Wurde auch hierdurch keine ausreichende Beladung erreicht, so wurde das Gefäß verworfen.

Der „steady-state“ der Vorkontraktion der Gefäße in Gegenwart von Noradrenalin wurde bei dem verwendeten Versuchsprotokoll maximal 165 Sekunden nach Beginn der jeweiligen Messung erreicht. In den Grafiken unter *5. Ergebnisse* ist der besseren Übersicht halber nur die Zeitspanne von 165 Sekunden nach Beginn der jeweiligen Messung bis 290 Sekunden nach Beginn der jeweiligen Messung dargestellt.

In jedem Versuch wurde nach Applikation der NO-Donatoren die Intaktheit des Endothels durch Stimulation mit $1\mu\text{mol/l}$ Acetylcholin nochmals überprüft, was aber unter 5. *Ergebnisse* zur besseren Übersicht ebenfalls nicht dargestellt ist.

Wenn während eines Versuches nur eine Substanz untersucht werden sollte, wurde das folgende Versuchsprotokoll verwendet (s. Abb. 4):

1. Gleichzeitiger Start von Ca^{2+} - und Durchmesserregistrierung.
2. Nach 50 Sekunden: Vorkontraktion des Gefäßes mit Noradrenalin $0,1\mu\text{mol/l}$ oder $0,3\mu\text{mol/l}$.
3. Nach 170 Sekunden: Applikation des zu untersuchenden Vasodilators (SNAP, SNP oder Acetylcholin).
4. Nach 290 Sekunden: Zweimaliges Auswaschen.
5. Nach 470 Sekunden: Ende der Messung.

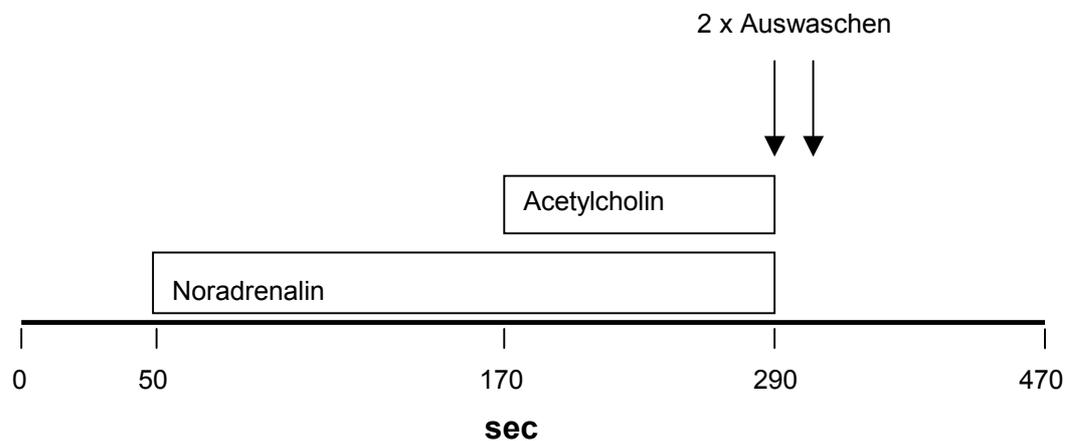


Abb. 4: Versuchsablauf bei Untersuchung von nur einem Vasodilatator
(Skizze)

Sollten während eines Versuches zwei Substanzen untersucht werden, so wurde folgendes Versuchsprotokoll verwendet (s. Abb. 5):

1. Gleichzeitiger Start von Ca^{2+} - und Durchmesserregistrierung.

2. Nach 50 Sekunden: Vorkontraktion des Gefäßes mit Noradrenalin 0,1 $\mu\text{mol/l}$ oder 0,3 $\mu\text{mol/l}$.
3. Nach 170 Sekunden: Applikation des zu untersuchenden Vasodilators (SNAP, SNP).
4. Nach 290 Sekunden: Applikation von Acetylcholin.
5. Nach 470 Sekunden: Zweimaliges Auswaschen.
6. Nach 540 Sekunden: Ende der Messung.

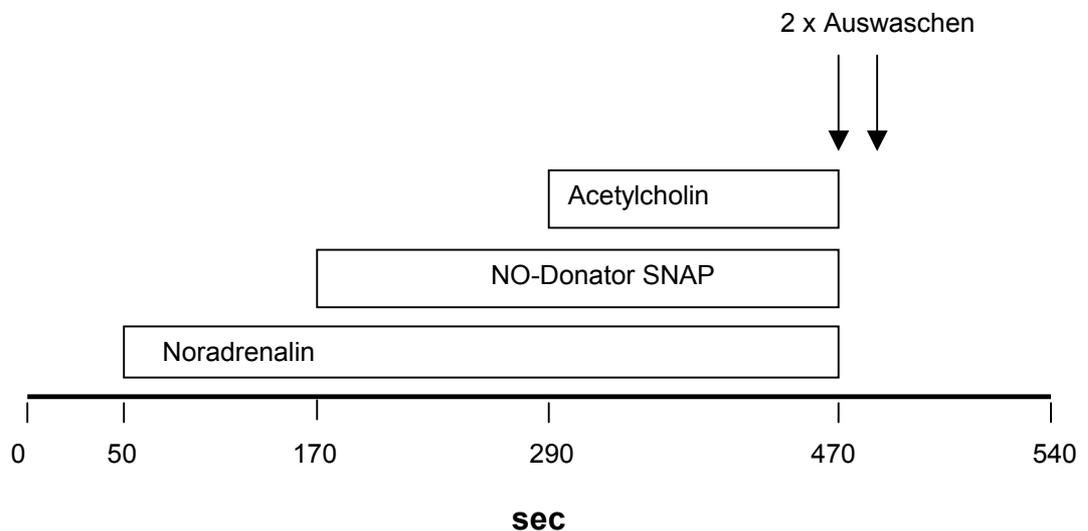


Abb. 5: Versuchsablauf bei Untersuchung von 2 Vasodilatoren (Skizze)

4.5 Auswertungen und Darstellung der Ergebnisse

In die statistische Auswertung gelangten nur Versuche, die folgende Voraussetzungen erfüllten:

- Kein Druckabfall während des Versuchs durch im Versuchsverlauf auftretende Undichtigkeiten
- Ausreichende Beladung der glatten Muskelzellen mit Fura-2: Bei einer durchschnittlichen Hintergrundfluoreszenz von 5×10^5 Impulse pro

Sekunde bei Anregung mit 350nm bzw. 4×10^5 bei 380nm gelangten nur Versuche in die statistische Auswertung, bei denen eine Anfangsemission von mindestens 8×10^5 Impulse pro Sekunde (350nm) bzw. 10^6 Impulse pro Sekunde (380nm) vorlag. (Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz siehe 4.2 *Ca²⁺-Meßsystem*)

- Kontraktion auf mindestens 70% des Ausgangsdurchmessers nach Stimulation mit 0,1µmol/l bzw. 0,3µmol/l Noradrenalin.
- Nach Stimulation mit 0,1µmol/l Acetylcholin Dilatation auf mindestens 90% des Ausgangsdurchmessers.

Für diese Arbeit wurden insgesamt 73 Gefäße untersucht. Davon gelangten 57 in die Auswertung, 16 Gefäße mussten verworfen werden.

Nach Korrektur der Calciummesswerte durch Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz (siehe 4.2 *Ca²⁺-Meßsystem*) wurde mit der Software Felix[®] (PTI) die Ratio $RF = F_{350}/F_{380}$ ermittelt. Die korrigierte Ratio wurde zusammen mit den Durchmessermessungen mit Hilfe des Statistikprogramms Stata[®] durch Bildung des arithmetischen Mittels aus jeweils fünf Sekunden datenreduziert und gespeichert.

Die Werte für die Calciumratio RF bzw. den Durchmesser d wurden jeweils auf die „steady state“-Werte des durch Noradrenalin vorkontrahierten Gefäßes bezogen:

- $\Delta [Ca^{2+}]_i = (RF_{NA}/RF) \times 100 - 100$
- $\Delta Dia = ((d_{NA}/d) \times 100) - 100$

mit:

- d: Durchmesser des Gefäßes
- RF: Ratio der Fluoreszenz F_{350} / F_{380}
- d_{NA} : Durchmesser der Gefäße im „steady-state“ (115 Sekunden nach Applikation von Noradrenalin, 165 Sekunden nach Versuchsbeginn; Unmittelbar vor Applikation der nächsten Stimulation. [Alle im Kapitel 5. *Ergebnisse* gezeigten Graphiken beginnen an diesem Punkt; Siehe auch Abb. 3 und 4.4.4 *Versuchsablauf und Inkubationszeiten*])
- RF_{NA} : Ca^{2+} -Ratio im „steady-state“

Mit dem Programm SigmaPlot® (Version 2001) wurden für jede der in Kapitel 5. *Ergebnisse* gezeigten Grafiken die auf den Ausgangswert normierten Meßwerte aus je n=3, n=5 oder n=7 Messungen (s. a. Legenden der Abbildungen) als Mittelwert \pm mittlerer Fehler des Mittelwertes (SEM = Standard Error of the Mean) dargestellt.

4.6 Nichtlineare Regressionsanalysen

Ziel der Regressionsanalysen war zu überprüfen, ob sich die durch SNAP-induzierten Dilatationen mathematisch in zwei verschiedene Phasen aufteilen ließen. Dazu wurden mit dem Programm SigmaPlot® (Version 2001) die Änderungen der Calcium- und Durchmesserwerte während der SNAP-induzierten Dilatation mit nichtlinearen Regressionen an verschiedenen Gleichungen angepasst. Dabei wurden jeweils Anpassungen für den gesamten Versuchsablauf (0-84 Sekunden), den ersten Teil des Versuches (0-32 Sekunden, "langsame Komponente")

sowie den zweiten Teil (32-84 Sekunden, "schnelle Komponente") gerechnet. Das Ergebnis der Regressionsanalyse wurde für die niedrigste ($0,1\mu\text{mol/l}$) und die höchste ($100\mu\text{mol/l}$) Konzentration von SNAP grafisch dargestellt, für die restlichen Konzentrationen in Tabellenform.

Bei der nichtlinearen Regressionsanalyse wird für eine vorgegebene Gleichung (z.B. $y=a-b/(1+cx^2)$) iterativ der jeweils beste Wert für die einzelnen Parameter der Gleichung (in diesem Fall a, b und c) ermittelt. Der Algorithmus optimiert durch Annäherung den Verlauf der Summenfunktion, so dass die Summe der Quadrate des Abstands von den tatsächlichen Messpunkten der Einzelkurven zu der durch errechneten Kurve minimal wird.

Die Güte dieser Annäherung wird durch die Parameter "R² korrigiert" (R^2_{Korr}) und F beschrieben. Der Determinationskoeffizient R^2 wird 0, wenn die Regression ausgehend von der unabhängigen Variablen keine Vorhersage über die abhängige Variable zulässt. Er wird 1, wenn sich aus der Regression das Verhalten der abhängigen Variablen vollständig vorhersagen lässt. Bei der Berechnung des "korrigierten Wertes für R^2 (R^2_{Korr})" wird zusätzlich noch der Freiheitsgrad der Regression berücksichtigt (d.h. die Zahl der Parameter der Gleichung).

Der Wert von F ermöglicht eine Aussage über den Beitrag der unabhängigen Variablen zur Änderung der abhängigen Variablen. Je größer der F-Wert, desto kleiner ist die "unerwartete Variabilität" der Regression im Vergleich zur Variabilität der Messwerte, d.h. je größer der Wert von F, desto besser die Annäherung der Regression an die Messwerte.

Es wurden jeweils die Werte von R^2_{Korr} und F für den gesamten Versuchsablauf (0-82 Sekunden), den Teil von 0-32 Sekunden ("langsame Komponente") sowie den Teil von 32-84 Sekunden ("schnelle Komponente") bestimmt und miteinander verglichen (Motulsky und Ransnas, 1987). Wenn die Werte für R^2_{Korr} und F bei einer Regression über den gesamten Versuchsablauf (0-82 Sekunden) näher bei 1 (R^2_{Korr}) lagen bzw. einen größeren Betrag hatten (F) als bei Regression über die beiden Einzelkomponenten allein (0-32 Sek. und 32-84 Sek.), konnte davon ausgegangen werden, dass die Dilatation nur aus einer Komponente bestand (Motulsky und Ransnas, 1987).

Wenn dagegen die Werte für R^2_{Korr} und F bei einer Regression über die "langsame" (0-32 Sek.) bzw. die "schnelle Komponente" (32-84 Sek.) allein näher bei 1 lagen (R^2_{Korr}) bzw. einen größeren Betrag hatten als bei einer Regression über den gesamten Versuchsablauf, so bedeutete dies, dass sich die Dilatation in zwei Phasen einteilen lässt (Motulsky und Ransnas, 1987). Eine weitergehende, formalstatistische Auswertung der Ergebnisse von nichtlinearen Regressionen ist wegen des iterativen Charakters der Algorithmen nicht zulässig (Motulsky und Ransnas, 1987), weswegen keine p-Werte angegeben wurden.

Es wurden nichtlineare Regressionsanalysen mit folgenden Gleichungen durchgeführt:

- Für die Calciumwerte: $y=y_0+ax$ und Weibull-Gleichung mit 4 Parametern
- Für die Durchmesserwerte: $y=y_0+(\log a)a^x$ und $y=a-b(1+cx)^2$

4.7 Lösungen und Chemikalien

Die verwendeten Pufferlösungen hatten folgende Zusammensetzung (Angaben in mmol/l):

- *Standard-MOPS-Puffer*: NaCl 145; KCl 4,7; CaCl₂ 3,0; MgSO₄ 1,17; NaH₂PO₄ 1,2; Pyruvat 2,0; Glucose 5,0; MOPS (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure) 3,0; EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) 0,02;
- *Präparations-MOPS-Puffer*: NaCl 145; KCl 4,7; CaCl₂ 1,5; MgSO₄ 1,17; NaH₂PO₄ 1,2; Pyruvat 2,0; Glucose 5,0; MOPS (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure) 3,0; EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) 0,02;
- *K⁺ 75mmol/l-MOPS-Puffer*: NaCl 75; KCl 75; CaCl₂ 3,0; MgSO₄ 1,17; NaH₂PO₄ 1,2; Pyruvat 2,0; Glucose 5,0; MOPS (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure) 3,0; EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) 0,02;
- *Fura-2AM-MOPS-Puffer*: Fura-2 AM 2µmol/l; 5% Bovines Serumalbumin; NaCl 145; KCl 4,7; CaCl₂ 3,0; MgSO₄ 1,17; NaH₂PO₄ 1,2; Pyruvat 2,0; Glucose 5,0; MOPS (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure) 3,0; EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) 0,02;

Hersteller der für die Puffer verwendeten Substanzen:

- *NaCl, KCl, NaH₂PO₄, Glucose, EDTA* und *EGTA*: Merck, Darmstadt
- *MgSO₄*: Fluka Chemie AG, Schweiz
- *MOPS*: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- *Pyruvat*: Serva GmbH&Co KG, Heidelberg

Weitere verwendete Substanzen: Hersteller, Konzentration der Stammlösungen und Lagerung

- *Acetylcholin*: Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen (Stammlösung 10mmol/l in Standard-MOPS-Puffer gelöst; Lagerung bei -30°C)
- *Bovines Serumalbumin*: (Stammlösung 20% ; Lagerung bei -30°C)
- *Charybdotoxin (CTX)*: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (Stammlösung 10µmol/l in Standard MOPS-Puffer; Lagerung bei -70°C)
- *DMSO wasserfrei*: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (Lagerung bei -30°C)
- *Furaacetoxymethylester (Fura-2 AM)*: Molecular Probes Inc., Junction City, Oregon, U.S.A. (Stammlösung 1mmol/l in wasserfreiem DMSO in N₂-Atmosphäre gelöst [1mg Fura-2 AM pro ml DMSO]; Lagerung bei -70°C in 20µl Aliquots in N₂-Atmosphäre)
- *Indometacin*: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (Stammlösung 10mmol/l in Standard-MOPS-Puffer gelöst; Lagerung bei -30°C)
- *L-Nitroarginin (L-NA)*: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (Stammlösung 3mmol/l durch Erhitzen auf 50°C im Wasserbad in Standard-MOPS-Puffer gelöst; täglich frisch angesetzt)
- *Manganchlorid (MnCl₂)*: Merck, Darmstadt (Stammlösung 8mmol/l in Standard-MOPS-Puffer angesetzt; täglich frisch angesetzt)
- *Natronlauge 1mol/l*: Merck, Darmstadt (Bei Zimmertemperatur gelagert)

- *Noradrenalin*: Hoechst AG, Frankfurt (Stammlösung 0,1mmol/l in Standard-MOPS-Puffer gelöst; täglich frisch angesetzt)
- *[1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-eins]* (ODQ): Alexis Chemicals, Grünberg (Stammlösung 10mmol/l in Standard MOPS-Puffer gelöst; Lagerung bei -30°C)
- *Pentobarbital*: Sanofi Winthrop GmbH, München (Stammlösung: Pentobarbital mit 0,9% NaCl im Volumenverhältnis 5:3 verdünnt; Lagerung bei 4°C)
- *Saponin*: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- *S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin* (SNAP): Alexis Chemicals, Grünberg (Stammlösung 10mmol/l in Standard-MOPS-Puffer gelöst; Lagerung lichtgeschützt bei -30°C)

Alle Arbeitslösungen - außer dem NO-Donator SNAP - wurden zu Beginn eines Versuchstages frisch aus den Stammlösungen angesetzt und in einem Wasserbad auf 37°C temperiert. Die Stammlösung von SNAP wurde zu Beginn des Versuchstages aufgetaut, im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahrt und erst unmittelbar vor Beginn des jeweiligen Versuchs auf die benötigte Endkonzentration verdünnt und für 3 Minuten auf 37°C erwärmt.

5. Ergebnisse

5.1 Die Vorkontraktion der isolierten Widerstandsgefäße mit Noradrenalin

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 73 Gefäßpräparationen durchgeführt. Davon mussten 16 verworfen werden, weil entweder die Vorkontraktion oder die endothelabhängige Dilatation nicht den unter 4. *Material und Methoden* genannten Bedingungen entsprachen. An 57 Gefäßpräparationen wurden insgesamt 458 Calcium- und Durchmesserregistrierungen durchgeführt. Das Kapitel 5. *Ergebnisse* beruht auf 96 Calcium- und Durchmesserregistrierungen an 43 isolierten Widerstandsgefäßen. Die übrigen Calcium- und Durchmesserregistrierungen dienten zur Überprüfung der Endothelfunktion, zur Optimierung der Versuchsbedingungen und zur Überprüfung von Hypothesen, die im Verlauf der Arbeit wieder verworfen werden mussten.

Nach Kanülierung und zweistündiger Inkubation mit Fura-2 betrug der Ruhedurchmesser der Gefäße $174 \pm 35 \mu\text{m}$. Die Gefäße wurden im Mittel mit einer Noradrenalinosis von $0,7 \pm 0,35 \mu\text{mol/l}$ auf $107 \pm 24 \mu\text{m}$ vorkontrahiert. Dabei stieg die Calciumratio RF von $1,48 \pm 0,32$ unter Ruhebedingungen auf einen Plateauwert von $2,08 \pm 0,41$ unter Noradrenalin.

5.2 Die Dilatation noradrenalin-vorkontrahierter Widerstandsarterien durch verschiedene Konzentrationen des endothelunabhängigen NO-Donors S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin (SNAP)

5.2.1 Effekte des „Sham-Treatments“ (Kontrollversuch)

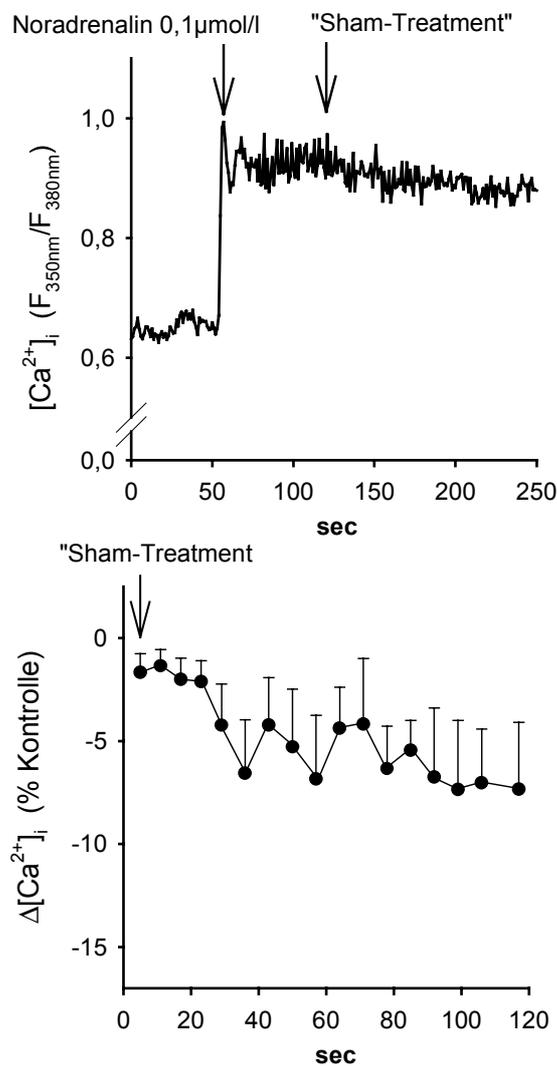


Abb. 6: „Sham-Treatment“ (Austausch von 1/3 des Organbadvolumens ohne Zusatz von Agenzien) Oben: Originalregistrierung; Unten²: $n = 7$

² In dieser und allen nachfolgenden Darstellungen sind die Messergebnisse auf den Wert des „steady state“ nach der Vorkontraktion mit Noradrenalin normiert. Der besseren Übersichtlichkeit wegen ist diese standardisierte Vorkontraktion in den Abbildun-

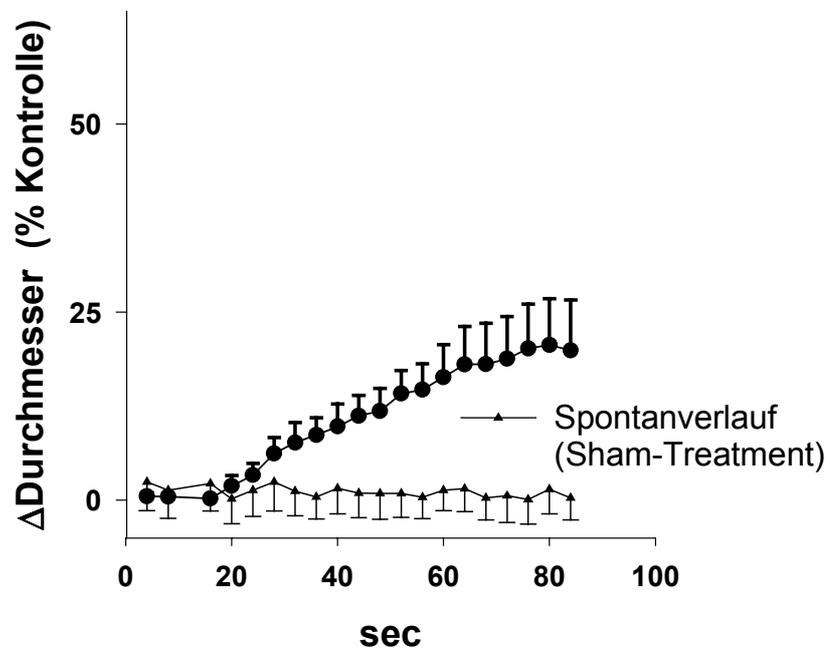
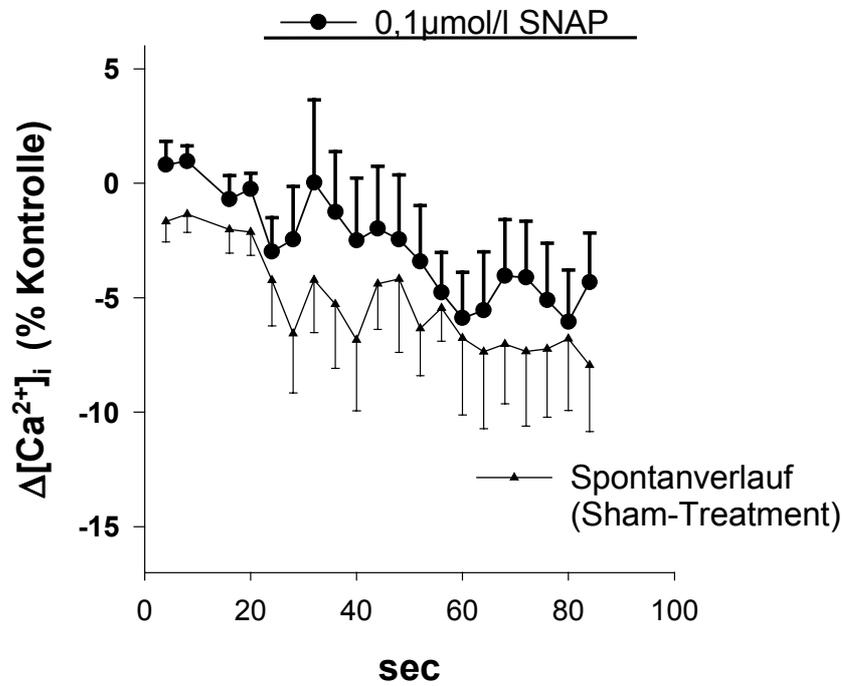
In allen Versuchen zur Charakterisierung der Wirkungen des NO-Donors S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin (SNAP) an Widerstandsgefäßen wurden diese zunächst mit Noradrenalin vorkontrahiert. Da die dadurch induzierte Erhöhung des glattmuskulären Ca^{2+} nach 2 Minuten keinen konstanten Wert erreichte und außerdem der Austausch von einem Drittel des Gesamtorganbadvolumens eigene Effekte haben könnte, wurden diese in einer separaten Versuchsserie an 7 Gefäßen analysiert.

Ausgehend vom Ruhewert des unstimulierten Gefäßes induzierten $0,1\mu\text{mol/l}$ Noradrenalin im „*steady state*“ einen Anstieg der Calcium-Ratio $[\text{Ca}^{2+}]_i$, um $31\pm 6\%$ (Abb. 6 oben). Bei $t=130$ Sekunden wurde ein Drittel des Organbadvolumens ohne Zusatz von Agenzien ausgetauscht („*Sham-Treatment*“). Abb. 6 unten beginnt zu diesem Zeitpunkt, bei dem der „*steady-state-Wert*“ der Vorkontraktion mit Noradrenalin erreicht war². Die Calcium-Ratio $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sank nach Ablauf von weiteren 85 Sekunden um $6\pm 2\%$ (Abb. 6 unten; $n=7$).

gen 6 – 19 nicht mehr gezeigt. Der Zeitpunkt $t = 0$ Sekunden in den Abbildungen 6 (unten) bis 19 entspricht daher dem Zeitpunkt, an dem die Gefäße den „*steady state*“ nach der Vorkontraktion mit Noradrenalin erreicht hatten.

5.2.2 Effekte niedriger Konzentrationen ($0,1\mu\text{mol/l}$) des NO-Donors

SNAP

Abb. 7: $0,1\mu\text{mol/l}$ SNAP

($n=7$; normiert auf Basiswerte: Durchmesser $183\pm 30,1\mu\text{m}$; $[\text{Ca}^{2+}]_i = 1,4\pm 0,15$)

Der NO-Donor S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin (SNAP) führte in niedriger Konzentration ($0,1\mu\text{mol/l}$) zu einer langsamen Dilatation der Gefäße um $20\pm 7\%$. Nach 85 Sekunden trat ein Abfall der Calcium-Ratio $[\text{Ca}^{2+}]_i$ um insgesamt $4\pm 2\%$ auf. Dieser war aber nicht höher als der auch im Kontrollversuch bei „Sham-Treatment“ nach 85 Sekunden beobachtete Abfall (Sham-Treatment: $6\pm 2\%$).

Um zu untersuchen, ob man bei der durch $0,1\mu\text{mol/l}$ SNAP induzierten Dilatation von einer oder zwei Komponenten der Calciumänderung ausgehen muss, wurden nichtlineare Regressionsanalysen durchgeführt. Für den Gesamtverlauf von 0-84 Sekunden bzw. für die Teilabschnitte von 0-32 Sekunden und 32-84 Sekunden ergaben sich dabei folgende Werte für R^2_{Korr} und F:

	0-32 Sek.	32-84 Sek.	0-84 Sek.
<i>Weibull-Gleichung</i>	$R^2_{\text{Korr}}=0,0$ $F=-0,16$	$R^2_{\text{Kor}}=0,61$ $F= 7,4$	$R^2_{\text{Kor}}=0,69$ $F= 14,9$
$y=y_0+ax$	$R^2_{\text{Korr}}=0,25$ $F=3,1$	$R^2_{\text{Korr}}=0,56$ $F=16,1$	$R^2_{\text{Kor}}=0,77$ $F= 63,2$

Tab. 1: R^2_{Korr} und F für nichtlineare Regressionen mit der Weibull-Gleichung und $y=y_0+ax$ über 0-32 Sek., 32-84 Sek. und 0-84 Sek.

Ausgangsmesswerte: $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei $0,1\mu\text{mol/l}$ SNAP

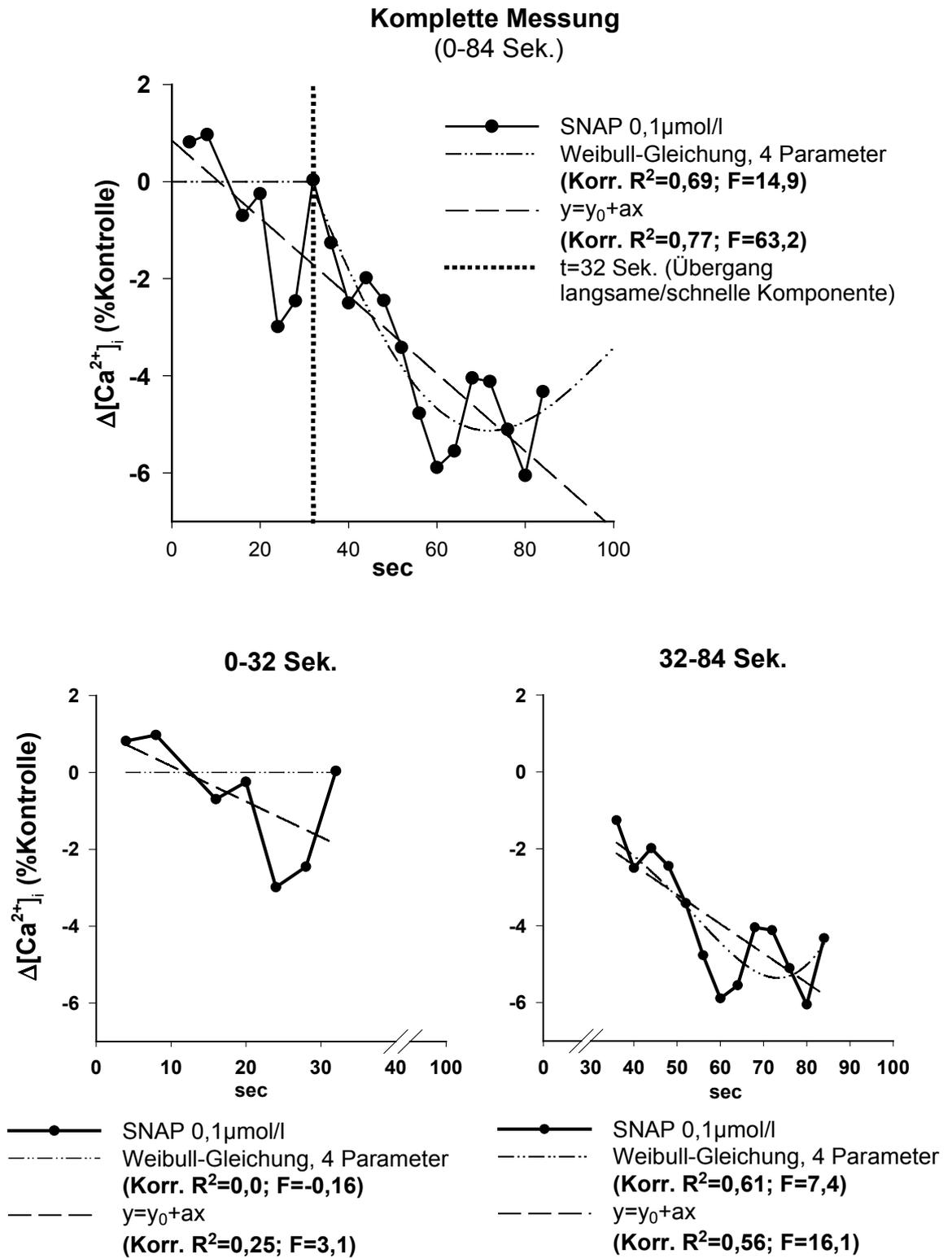


Abb. 7: Nichtlineare Regressionsanalyse für die Calciummesswerte ($[Ca^{2+}]_i$) bei 0,1 $\mu\text{mol/l}$ SNAP Oben: Gesamte Messung; Unten: Regressionsen für die Teilabschnitte 0-32 Sek. (links) und 32-84 Sek. (rechts); $R^2_{\text{Korr}}=0,77$ $F=63,2$ für die Gleichung $y=y_0+ax$ über die gesamte Messung.

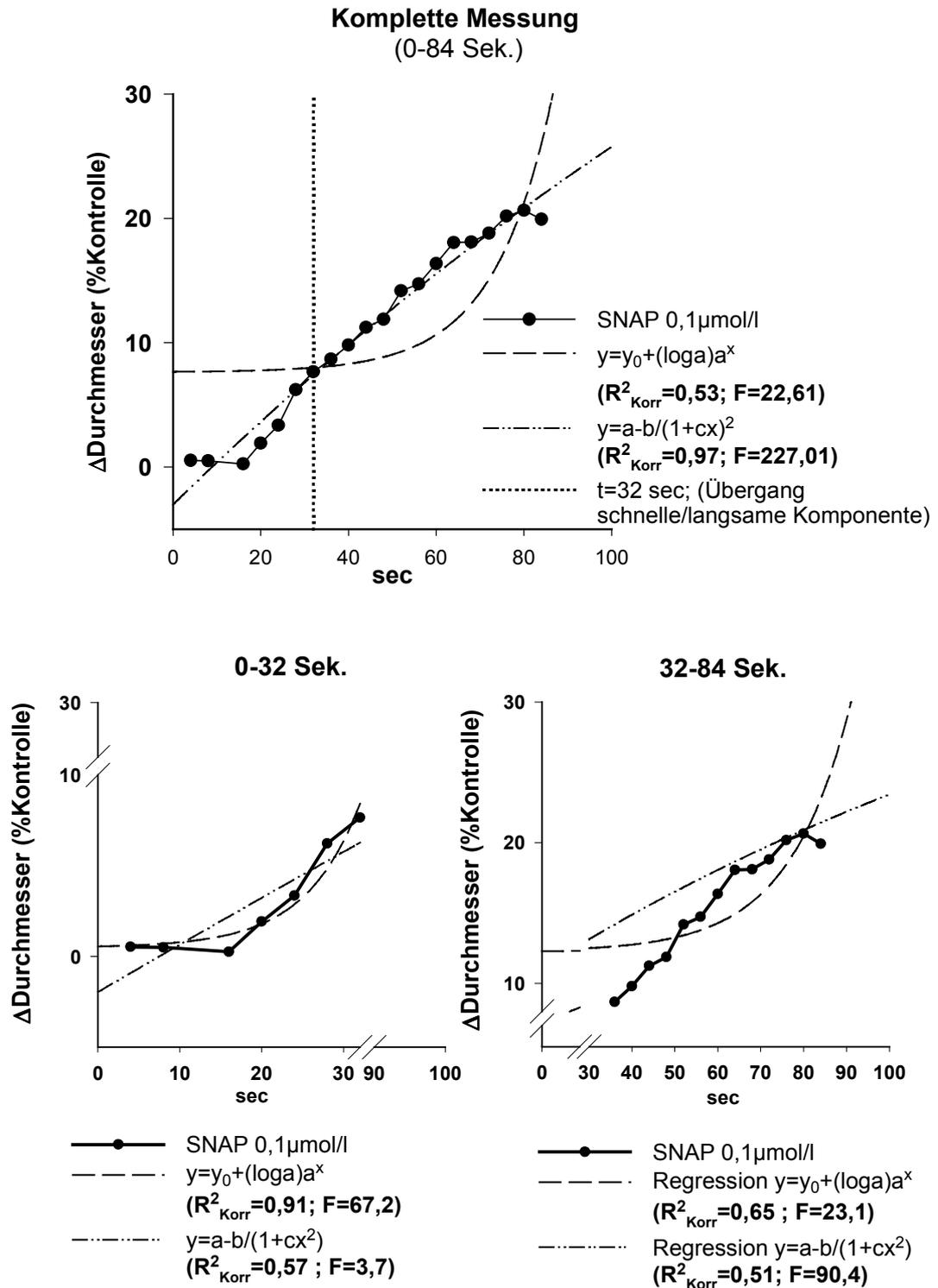


Abb. 8: Nichtlineare Regressionsanalyse für die Durchmesserwerte bei 0,1 μ mol/l SNAP

Oben: Gesamte Messung; **Unten:** Regressionen für die Teilabschnitte 0-32 Sek. (links) und 32-84 Sek. (rechts); $R^2_{Korr}=0,97$; $F=227,01$ für die Gleichung $y=a-b/(1+cx)^2$ über die gesamte Messung.

Um zu untersuchen, ob man von einer oder zwei Komponenten der Durchmesseränderung bei der durch $0,1\mu\text{mol/l}$ SNAP induzierten Dilatation ausgehen muss, wurden nichtlineare Regressionsanalysen durchgeführt. Für den Gesamtverlauf von 0-84 Sekunden bzw. für die Teilabschnitte von 0-32 Sekunden und 32-84 Sekunden ergaben sich dabei folgende Werte für R^2_{Korr} und F:

	0-32 Sek.	32-84 Sek.	0-84 Sek.
$y=y_0+(\log a)a^x$	$R^2_{\text{Korr}}= 0,91$ F= 67,2	$R^2_{\text{Korr}}=0,65$ F= 23,1	$R^2_{\text{Korr}}=0,53$ F= 22,61
$y=a-b/(1+cx^2)$	$R^2_{\text{Korr}}=0,57$ F=3,7	$R^2_{\text{Korr}}=0,51$ F=90,4	$R^2_{\text{Korr}}=0,97$ F= 227,01

Tab. 2: R^2_{Korr} und F für nichtlineare Regressionen mit $y=y_0+(\log a)a^x$ und $y=a-b/(1+cx^2)$ über 0-32 Sek., 32-84 Sek. und 0-84 Sek.

Ausgangsmesswerte: Durchmesseränderungen bei $0,1\mu\text{mol/l}$ SNAP

5.2.3 Effekte mittlerer Konzentrationen ($1\mu\text{mol/l}$ und $10\mu\text{mol/l}$) von SNAP

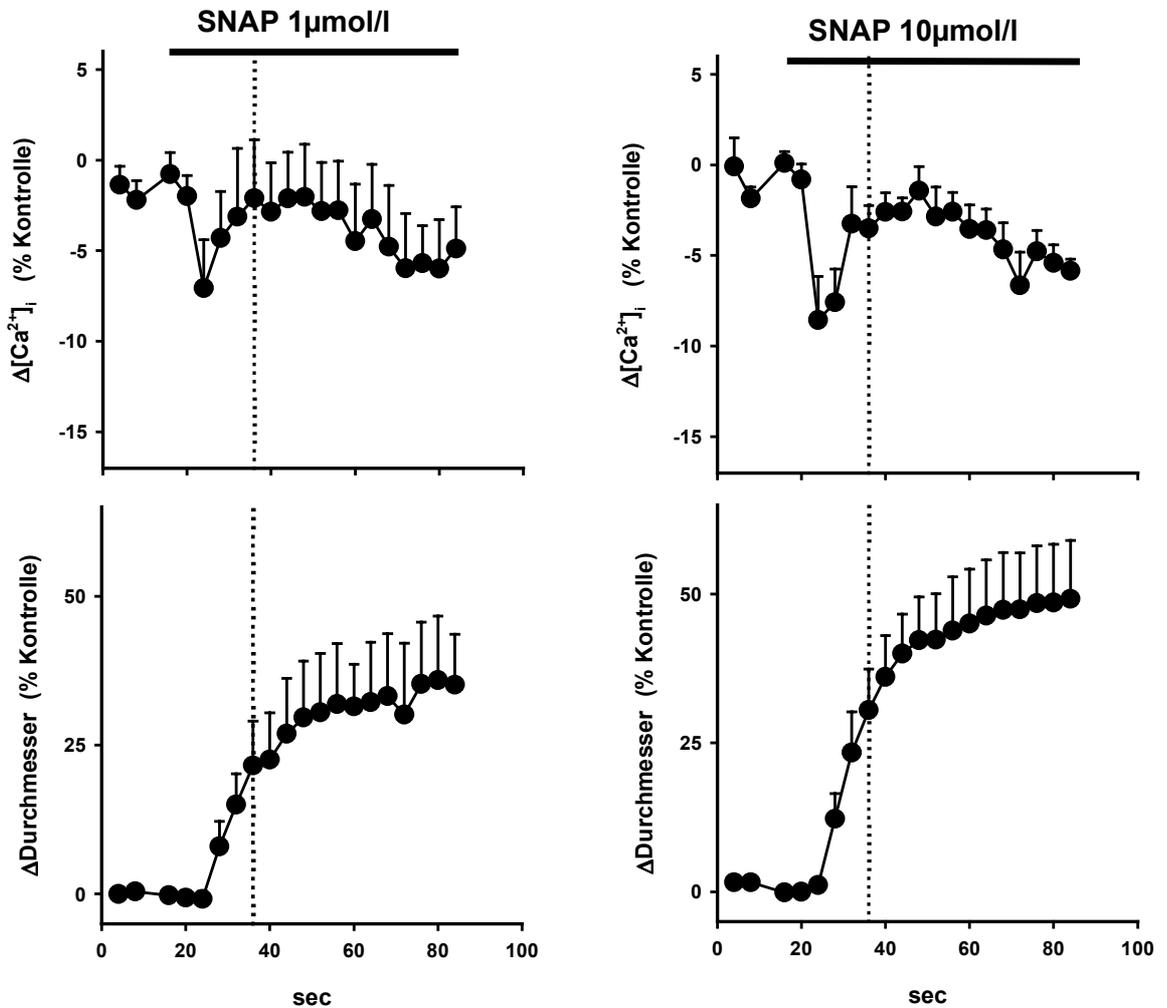


Abb. 8: $1\mu\text{mol/l}$ und $10\mu\text{mol/l}$ SNAP

($n=7$; normiert auf Basiswerte: Durchmesser $178\pm 22\mu\text{m}$; $[\text{Ca}^{2+}]_i$ $1,6\pm 0,13$ bzw. Durchmesser $216\pm 16\mu\text{m}$; $[\text{Ca}^{2+}]_i$ $1,5\pm 0,07$)

Die Applikation von $1\mu\text{mol/l}$ und $10\mu\text{mol/l}$ SNAP führten zu einer Dilatation, die sich durch nichtlineare Regressionsanalyse (s.u.) in zwei Phasen einteilen lässt: Eine erste schnelle Phase von $t=0$ Sekunden bis $t=32$ Sekunden und eine zweite, langsamere Phase von $t=32$ Sekunden bis $t=84$ Sekunden (veranschaulicht durch die gestrichelten, verti-

kalen Linien). Während der ersten, 32 Sekunden andauernden, schnellen Phase dilatierten die Gefäße um $22\pm 7\%$ bzw. $31\pm 7\%$. Der transiente Abfall der Ratio $[Ca^{2+}]_i$ erreichte dabei ein Minimum von $7\pm 3\%$ bzw. $9\pm 2\%$. Anschließend dilatierten die Gefäße in der sich anschließenden zweiten, langsamen Phase weiter um $35\pm 8\%$ bzw. $49\pm 9\%$. Der intrazelluläre Calciumspiegel $[Ca^{2+}]_i$ stieg während dieser zweiten Phase der Dilatation wieder an, während das Gefäß weiterdilatierte.

Bei $1\mu\text{mol/l}$ SNAP betrug der Abfall der Calcium-Ratio $[Ca^{2+}]_i$ nach 2 Minuten (entspricht dem Ende des Versuchs) $5\pm 2\%$. Dieser Abfall war nicht höher als der im Kontrollversuch bei „*Sham-Treatment*“ ebenfalls aufgetretene Abfall von $6\pm 2\%$. Auch bei $10\mu\text{mol/l}$ SNAP trat ein Abfall der Calcium-Ratio $[Ca^{2+}]_i$ nach 2 Minuten (also ebenfalls am Versuche) um $6\pm 1\%$ auf, aber auch diese Änderung war nicht höher als im Kontrollversuch bei „*Sham-Treatment*“.

Um zu untersuchen, ob man von einer oder zwei Komponenten der Calciumänderung bei $1\mu\text{mol/l}$ SNAP bzw. $10\mu\text{mol/l}$ SNAP ausgehen muss, wurden nichtlineare Regressionsanalysen durchgeführt. Für den Gesamtverlauf von 0-84 Sekunden bzw. für die Teilabschnitte von 0-32 Sekunden und 32-84 Sekunden ergaben sich dabei die in Tabelle 3 dargestellten Werte für R^2_{Korr} und F.

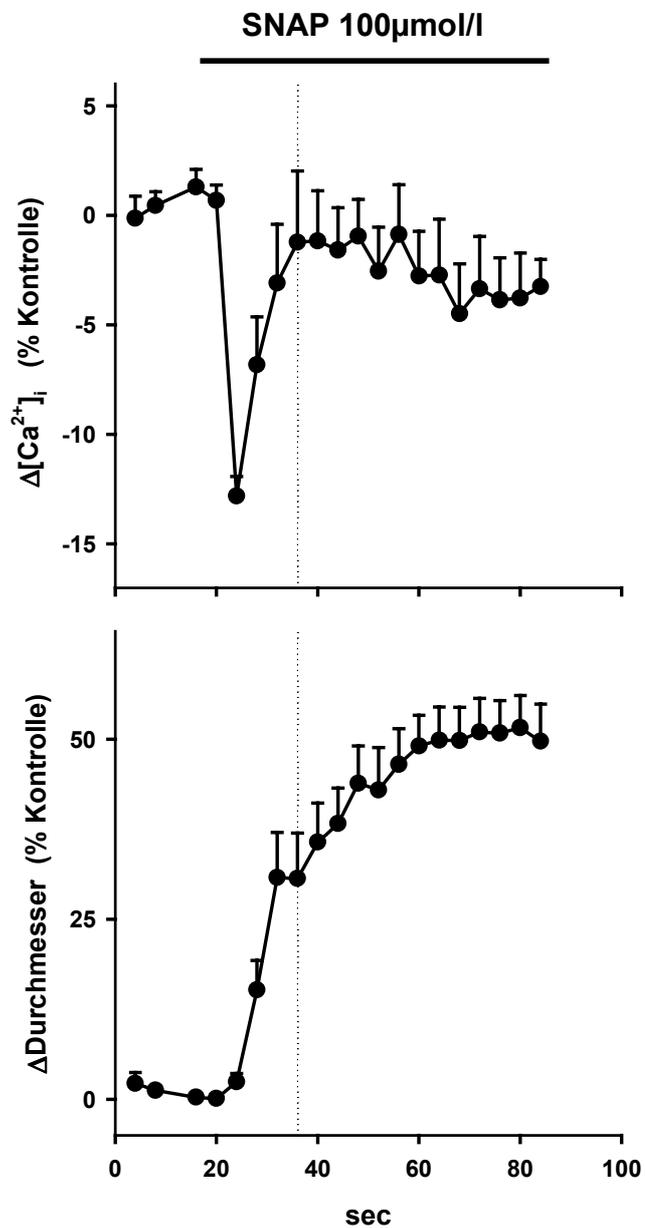
	0-32 Sek.		32-84 Sek.		0-84 Sek.	
	<i>1 μmol/l</i> SNAP	<i>10μmol/l</i> SNAP	<i>1 μmol/l</i> SNAP	<i>10μmol/l</i> SNAP	<i>1 μmol/l</i> SNAP	<i>10μmol/l</i> SNAP
Weibull- Gleichung	$R^2_{Korr}=0,07$ $F=-0,69$	$R^2_{Kor}=0,0$ $F=-0,5$	$R^2_{Kor}=0,77$ $F=14,4$	$R^2_{Kor}=0,58$ $F=6,6$	$R^2_{Kor}=0,0$ $F=-0,02$	$R^2_{Kor}=0,0$ $F=-0,03$
$y=y_0+ax$	$R^2_{Korr}=0,88$ $F=2,39$	$R^2_{Korr}=0,26$ $F=3,12$	$R^2_{Korr}=0,77$ $F=39,8$	$R^2_{Korr}=0,61$ $F=20,3$	$R^2_{Kor}=0,32$ $F=9,86$	$R^2_{Kor}=0,16$ $F=4,67$

Tab. 3: R^2_{Korr} und F für nichtlineare Regressionen mit der Weibull-Gleichung und $y=y_0+ax$ über 0-32 Sek., 32-84 Sek. und 0-84 Sek. Ausgangsmesswerte: $[Ca^{2+}]_i$ bei $1\mu\text{mol/l}$ SNAP bzw. $10\mu\text{mol/l}$ SNAP

Um zu untersuchen, ob man von einer oder zwei Komponenten der Durchmesseränderung bei $1\mu\text{mol/l}$ und $10\mu\text{mol/l}$ SNAP ausgehen muss, wurden nichtlineare Regressionsanalysen durchgeführt. Für den Gesamtverlauf von 0-84 Sekunden bzw. für die Teilabschnitte von 0-32 Sekunden und 32-84 Sekunden ergaben sich dabei die in Tabelle 4 dargestellten Werte für R^2_{Korr} und F.

	0-32 Sek.		32-84 Sek.		0-84 Sek.	
	<i>1 $\mu\text{mol/l}$ SNAP</i>	<i>10$\mu\text{mol/l}$ SNAP</i>	<i>1 $\mu\text{mol/l}$ SNAP</i>	<i>10$\mu\text{mol/l}$ SNAP</i>	<i>1 $\mu\text{mol/l}$ SNAP</i>	<i>10$\mu\text{mol/l}$ SNAP</i>
$y=y_0+(\log a)a^x$	$R^2_{\text{Korr}}=0,89$ F=50,3	$R^2_{\text{Kor}}=0,93$ F=75,1	$R^2_{\text{Kor}}=0,49$ F=12,9	$R^2_{\text{Kor}}=0,48$ F=11,9	$R^2_{\text{Kor}}=0,33$ F= 10,4	$R^2_{\text{Kor}}=0,89$ F=8,9
$y=a-b/(1+cx^2)$	$R^2_{\text{Korr}}=0,0$ F=0,9	$R^2_{\text{Korr}}=0,0$ F=0,9	$R^2_{\text{Korr}}=0,88$ F=29,8	$R^2_{\text{Korr}}=0,98$ F=257,6	$R^2_{\text{Kor}}=0,88$ F= 45,9	$R^2_{\text{Kor}}=0,87$ F=44,5

Tab. 4: R^2_{Korr} und F für nichtlineare Regressionen mit $y=y_0+(\log a)a^x$ und $y=a-b/(1+cx^2)$ über 0-32 Sek., 32-84 Sek. und 0-84 Sek. Ausgangsmesswerte: Durchmesseränderungen bei $1\mu\text{mol/l}$ SNAP bzw. $10\mu\text{mol/l}$ SNAP

5.2.4 Effekte hoher SNAP Konzentration (100 $\mu\text{mol/l}$)Abb. 9: SNAP 100 $\mu\text{mol/l}$

($n=7$; normiert auf Basiswerte: Durchmesser $171 \pm 23 \mu\text{m}$; $[\text{Ca}^{2+}]_i$ $1,5 \pm 0,11$)

Die Dilatation bei 100 $\mu\text{mol/l}$ SNAP konnte durch nichtlineare Regressionsanalyse (s.u.) in zwei Phasen eingeteilt werden: Eine erste, schnelle Komponente, die sich bis $t=32$ Sekunden erstreckte und eine zweite,

langsamen Komponente von $t=32$ Sekunden bis $t=84$ Sekunden. Während der ersten, schnellen Phase dilatierten die Gefäße um $31\pm 6\%$. Der transiente Abfall des intrazellulären Calciumspiegels $[Ca^{2+}]_i$ erreichte dabei ein Minimum von $13\pm 1\%$. Anschließend dilatierten die Gefäße in der zweiten, langsameren Phase weiter bis auf $52\pm 4\%$ des Kontrolldurchmessers. Der intrazelluläre Calciumspiegel $[Ca^{2+}]_i$ stieg nach steilem, initialen Abfall während dieser zweiten Phase der Dilatation wieder an, während das Gefäß weiterdilatierte. Der nach 85 Sekunden beobachtete Abfall der Calcium-Ratio $[Ca^{2+}]_i$ war auch hier nicht höher als der im Kontrollversuch bei „Sham-Treatment“ ebenfalls beobachtete.

Um zu untersuchen, ob man von einer oder zwei Komponenten der durch $100\mu\text{mol/l}$ SNAP induzierten Calciumänderung ausgehen muss, wurden nichtlineare Regressionsanalysen durchgeführt. Für den Gesamtverlauf von 0-84 Sekunden bzw. für die Teilabschnitte von 0-32 Sekunden und 32-84 Sekunden ergaben sich dabei folgende Werte für R^2_{Korr} und F :

	0-32 Sek.	32-84 Sek.	0-84 Sek.
Weibull-Gleichung	$R^2_{\text{Korr}}=0,971$ $F=68,28$	$R^2_{\text{Korr}}=0,0$ $F=0,861$	$R^2_{\text{Korr}}=0,0$ $F=0,086$
$y=y_0+ax$	$R^2_{\text{Korr}}=0,157$ $F=2,11$	$R^2_{\text{Korr}}=0,65$ $F=22,92$	$R^2_{\text{Korr}}=0,0$ $F=0,749$

Tab. 5: R^2_{Korr} und F für nichtlineare Regressionen mit der Weibull-Gleichung und $y=y_0+ax$ über 0-32 Sek., 32-84 Sek. und 0-84 Sek.

Ausgangsmesswerte: $[Ca^{2+}]_i$ bei $100\mu\text{mol/l}$ SNAP

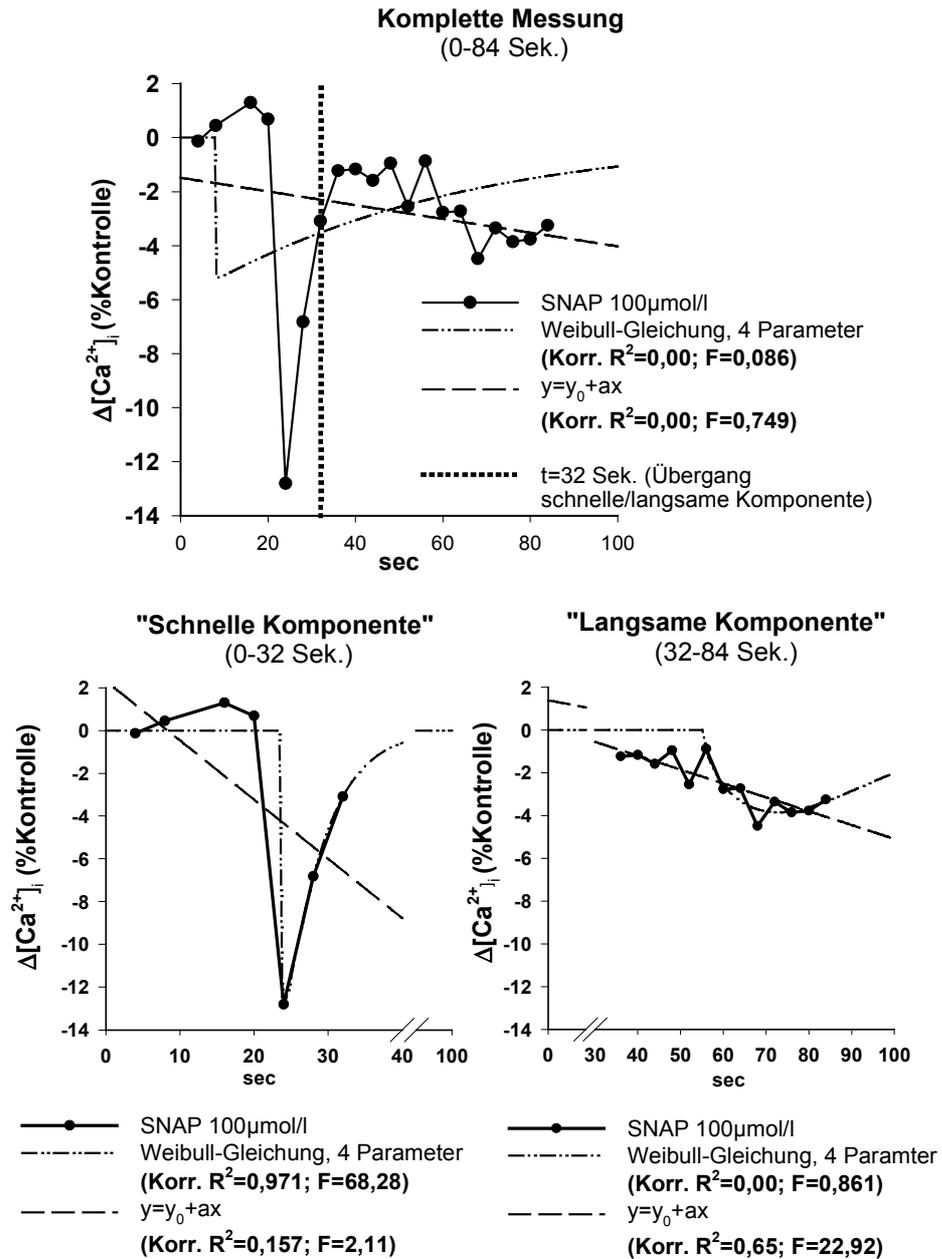


Abb. 10: Nichtlineare Regressionsanalyse für die Calciummesswerte ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) bei 100 $\mu\text{mol/l}$ SNAP

Oben: Gesamte Messung; **Unten:** Regressions für die Teilabschnitte 0-32 Sek. (links) und 32-84 Sek. (rechts)

Um zu untersuchen, ob man von einer oder zwei Komponenten der durch 100 $\mu\text{mol/l}$ SNAP induzierten Dilatation ausgehen muss, wurden nichtlineare Regressions durchgeföhrt.

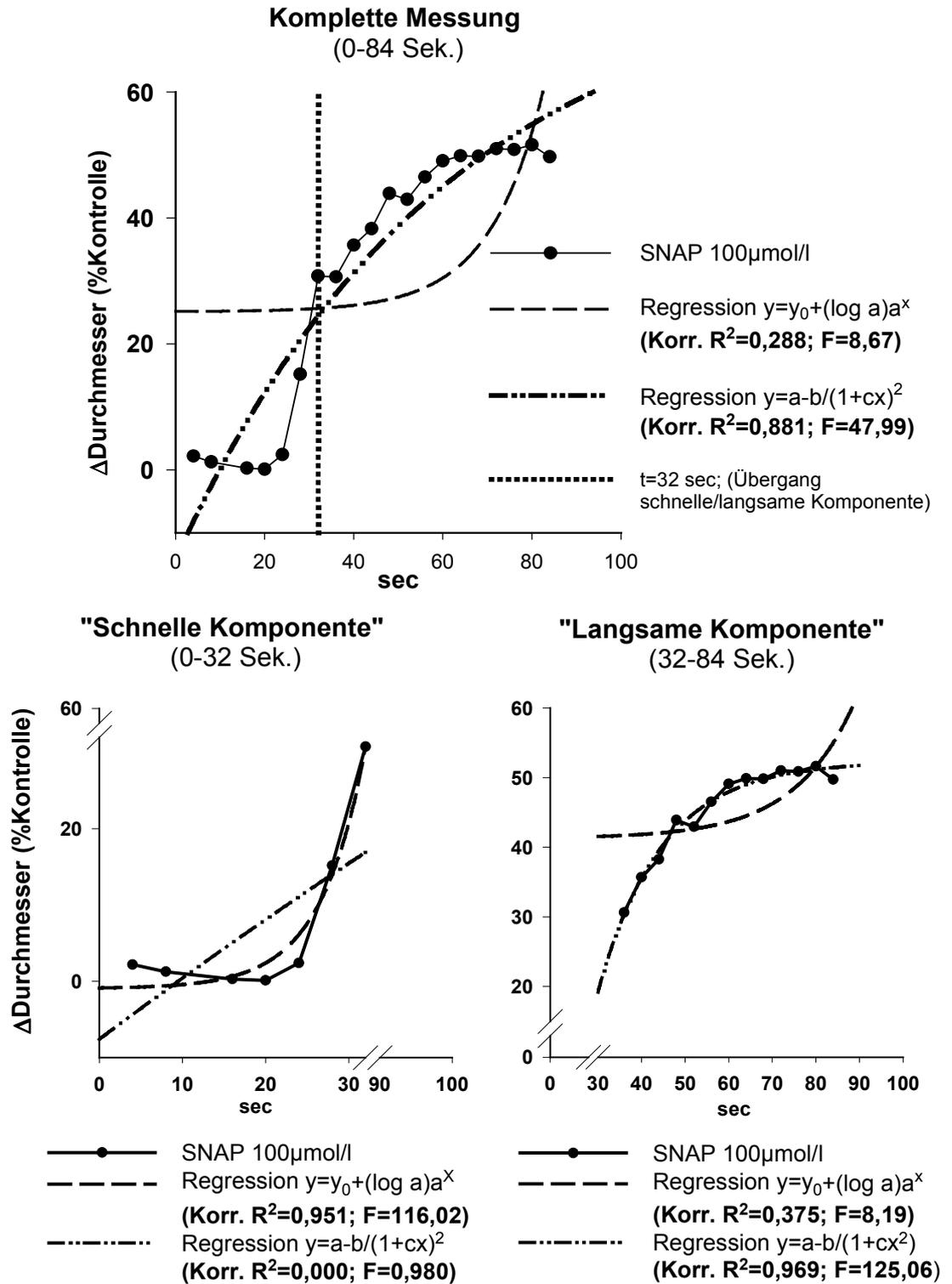


Abb. 11: Nichtlineare Regressionen für die Durchmesserwerte bei 100 μmol/l SNAP

Oben: Gesamte Messung; Unten: Regressionen für die Teilabschnitte 0-32 Sek. (links) und 32-84 Sek. (rechts)

Für den Gesamtverlauf von 0-84 Sekunden bzw. für die Teilabschnitte von 0-32 Sekunden und 32-84 Sekunden ergaben sich dabei folgende Werte für R^2_{Korr} und F:

	0-32 Sek.	32-84 Sek.	0-84 Sek.
$y=y_0+(\log a)a^x$	$R^2_{\text{Korr}}= 0,951$ F= 116,02	$R^2_{\text{Korr}}=0,375$ F= 8,19	$R^2_{\text{Korr}}=0,288$ F= 8,67
$y=a-b/(1+cx^2)$	$R^2_{\text{Korr}}=0,0$ F=0,98	$R^2_{\text{Korr}}=0,969$ F=125,06	$R^2_{\text{Korr}}=0,881$ F= 47,99

Tab. 6: R^2_{Korr} und F für nichtlineare Regressionen mit $y=y_0+(\log a)a^x$ und $y=a-b/(1+cx^2)$ über 0-32 Sek., 32-84 Sek. und 0-84 Sek. Ausgangsmesswerte: Durchmesseränderungen bei 100 $\mu\text{mol/l}$ SNAP

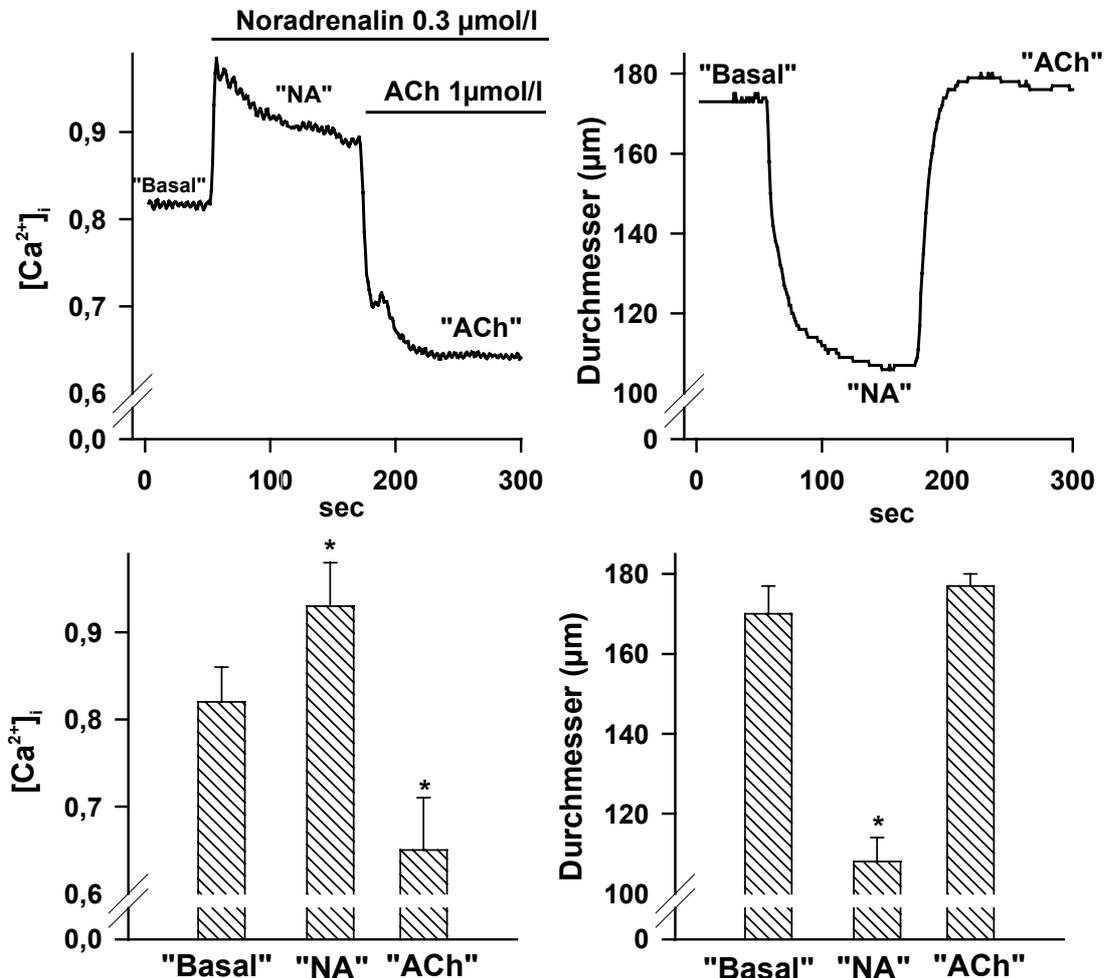
5.3 Die Effekte von 1 $\mu\text{mol/l}$ Acetylcholin

Abb. 12: 1 $\mu\text{mol/l}$ Acetylcholin

Oben: Originalregistrierung; Unten: Mittelwert \pm SEM zu den Zeitpunkten $t=10\text{sec}$ (basal), $t=170\text{sec}$ (Noradrenalin [NA] \llcorner) und $t=290\text{sec}$ (Acetylcholin [ACh]); ($n=8$)

Nach der Applikation von 0,3 $\mu\text{mol/l}$ Noradrenalin stieg der intrazelluläre, glattmuskuläre Ca^{2+} -Spiegel $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zunächst um $26 \pm 3\%$ und erreichte dann ein konstantes Plateau von $15 \pm 2\%$ des Kontrollwertes ($n=8$). Die Gefäße kontrahierten dabei schnell um $36 \pm 1\%$, von 170 ± 7

μm auf 108 ± 6 ($n=8$). $10 \mu\text{mol/l}$ Acetylcholin führte zu einem schnellen Abfall des Calciumspiegels $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der glatten Muskelzellen (Ratio RF: Ausgangswert $0,82 \pm 0,04$; Wert nach Applikation von Noradrenalin: $0,93 \pm 0,05$; nach Applikation von Acetylcholin: $0,65 \pm 0,06$, $n=8$).

Im Unterschied zu SNAP kam es unter Acetylcholin zu einem anhaltenden Abfall des Calciumspiegels $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der glatten Muskelzellen, der deutlich unter dem Ausgangsniveau vor der Kontraktion des Gefäßes mit Noradrenalin lag. Nach dem Auswaschen von Noradrenalin und Acetylcholin erreichten die Werte des Calciumspiegels $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und des Durchmessers wieder den Ausgangswert.

5.4 Auswirkungen der Depolarisation mit 75mmol/l K^+ auf die SNAP-induzierte Dilatation

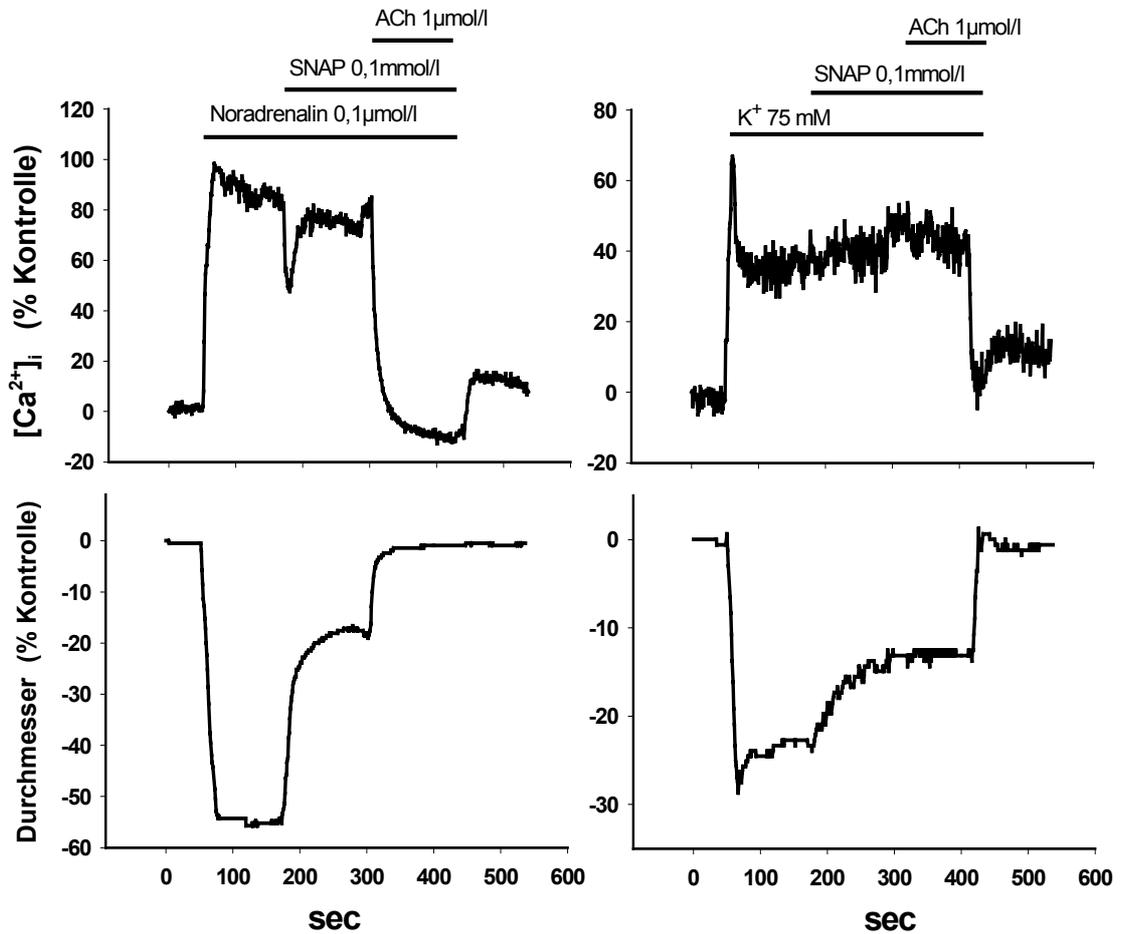


Abb. 13: Hemmung der SNAP-induzierten Hyperpolarisation durch 75 mmol/l K^+ (Links: Kontrolle; Rechts: 75mmol/l K^+ ; Originalregistrierung, repräsentativ für drei Versuche)

An insgesamt drei Gefäßen wurden die Auswirkungen einer Depolarisation mit 75mmol/l K^+ auf die SNAP-induzierte Dilatation untersucht (Abb. 13). In der dargestellten, für die drei Versuche repräsentativen Originalregistrierung, wurde das Gefäß im Kontrollversuch (Abb. 13 links) mit 0,1 $\mu\text{mol/l}$ Noradrenalin vorkontrahiert. Dabei stieg die Calci-

umratio $RF(F_{350nm}/F_{380nm})$ von 1,68 auf 3,3 und das Gefäß kontrahierte von 202 μ m auf 96 μ m. SNAP 0,1mmol/l führten zu einem Abfall der Calciumratio auf 2,49, die von einer Dilatation auf 89 μ m begleitet wurde. Um die Auswirkungen einer Depolarisation auf die SNAP-induzierte Dilatation zu untersuchen (Abb. 13 rechts), wurde das Gefäß mit 75mmol/l K^+ von 202 μ m auf 166 μ m vorkontrahiert. Dabei kam es zu einem Anstieg der Ratio $RF(F_{350nm}/F_{380nm})$ von 1,68 auf 2,37. Nach Applikation von 0,1mmol/l SNAP dilatierete das Gefäß bis auf 171 μ m. Gleichzeitig kam es zu einem Anstieg der Ratio $RF(F_{350nm}/F_{380nm})$ von 2,37 bis auf 2,52. Die langsame, mutmaßlich calciumunabhängige Komponente der Dilatation blieb also auch nach Depolarisation mit 75 mmol/l K^+ erhalten. Nach Applikation von 1 μ mol/l Acetylcholin in 75mmol/l K^+ blieben der Durchmesser des Gefäßes mit 172 μ m und die Calciumratio $RF(F_{350nm}/F_{380nm})$ mit 2,49 praktisch unverändert.

5.5 Auswirkungen des K_{Ca} -Kanalblockers Charybdotoxin (CTX) auf die SNAP induzierte Dilatation

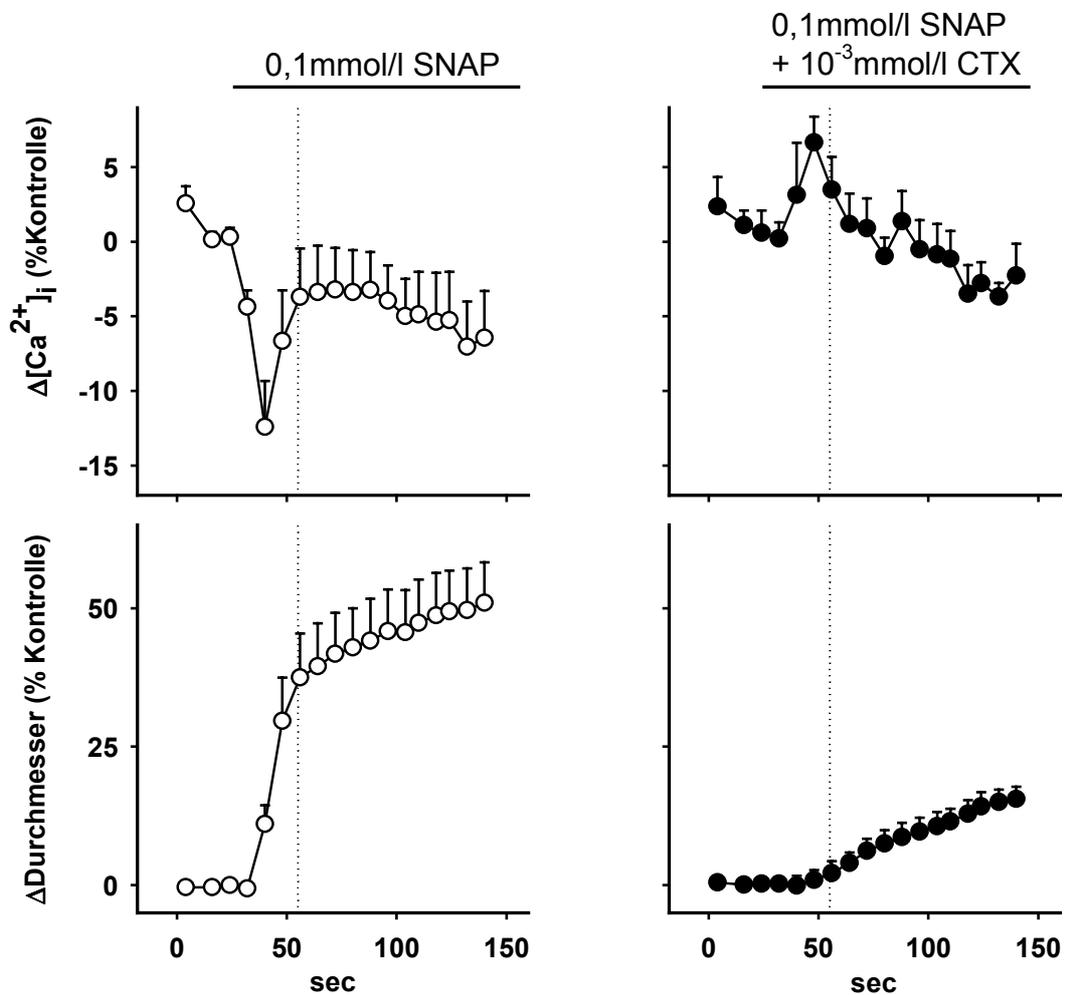


Abb. 14: SNAP und Charybdotoxin (CTX); Links: Kontrolle; Rechts: CTX

($n=5$; normiert auf Basiswerte: Durchmesser $176 \pm 19 \mu\text{m}$; $[Ca^{2+}]_i$ $1,4 \pm 0,12$; Die GefäÙe wurden eine Stunde lang vor Beginn der Messung mit $1 \mu\text{mol/l}$ CTX inkubiert; CTX war allen während der Messung applizierten Lösungen zugesetzt.)

Im Kontrollversuch (Abb. 14 links) wurde das GefäÙ mit $0,1 \text{mmol/l}$ Noradrenalin von $200 \mu\text{m}$ auf $90 \mu\text{m}$ vorkontrahiert. Dabei stieg die Ratio $RF(F_{350\text{nm}}/F_{380\text{nm}})$ von $1,27$ auf $2,35$. Die Applikation von $0,1 \text{mmol/l}$ SNAP führte jetzt zu einer Dilatation auf $165 \mu\text{m}$. Begleitet wurde diese

Dilatation von einem transienten Abfall der Ratio $RF(F_{350nm}/F_{380nm})$ von 2,35 auf 1,87.

Die Auswirkungen des K_{Ca} -Kanalblockers Charybdotoxin wurden in 5 Versuchen untersucht. Im Kontrollversuch ohne Charybdotoxin (Abb. 14 links) lassen sich wieder die bei dieser Konzentration bereits zuvor untersuchten zwei Komponenten der Dilatation unterscheiden: Eine erste schnelle Komponente, die sich bei dem hier verwendeten Versuchsprotokoll von $t=5$ Sekunden (Applikation von SNAP) bis ca. $t=56$ Sekunden erstreckte und eine zweite, langsamere von ca. $t=56$ Sekunden bis $t=140$ Sekunden.

Der K_{Ca} -Blocker Charybdotoxin (Abb. 14 rechts) hemmte die erste, schnelle Komponente der SNAP-induzierten Dilatation und den transienten Calciumabfall (Bei $t=36$ Sekunden: Δ Durchmesser unter Kontrollbedingungen $2\pm 0,7\%$; Δ Durchmesser unter Charybdotoxin $0,1\pm 0,7\%$; $\Delta[Ca^{2+}]_i$ unter Kontrollbedingungen $-13\pm 2\%$; $\Delta[Ca^{2+}]_i$ unter Charybdotoxin $+1,6\pm 3\%$).

Die zweite, langsame - mutmaßlich calciumunabhängige - Komponente der Dilatation blieb unter Charybdotoxin erhalten. Ab $t=56$ Sekunden dilatierten die Gefäße (ausgehend von unterschiedlichen Ausgangswerten) jeweils um ca. 13% (unter Kontrollbedingungen von $38\pm 8\%$ auf $50\pm 7\%$; unter Charybdotoxin von $2\pm 2\%$ auf $16\pm 2\%$). Die Gesamtdilatation betrug $15\pm 2\%$ bei Hemmung der K_{Ca} -Kanäle durch Charybdotoxin gegenüber $50\pm 7\%$ im Kontrollversuch.

5.6 Effekte des Calciumkanalblockers Felodipin

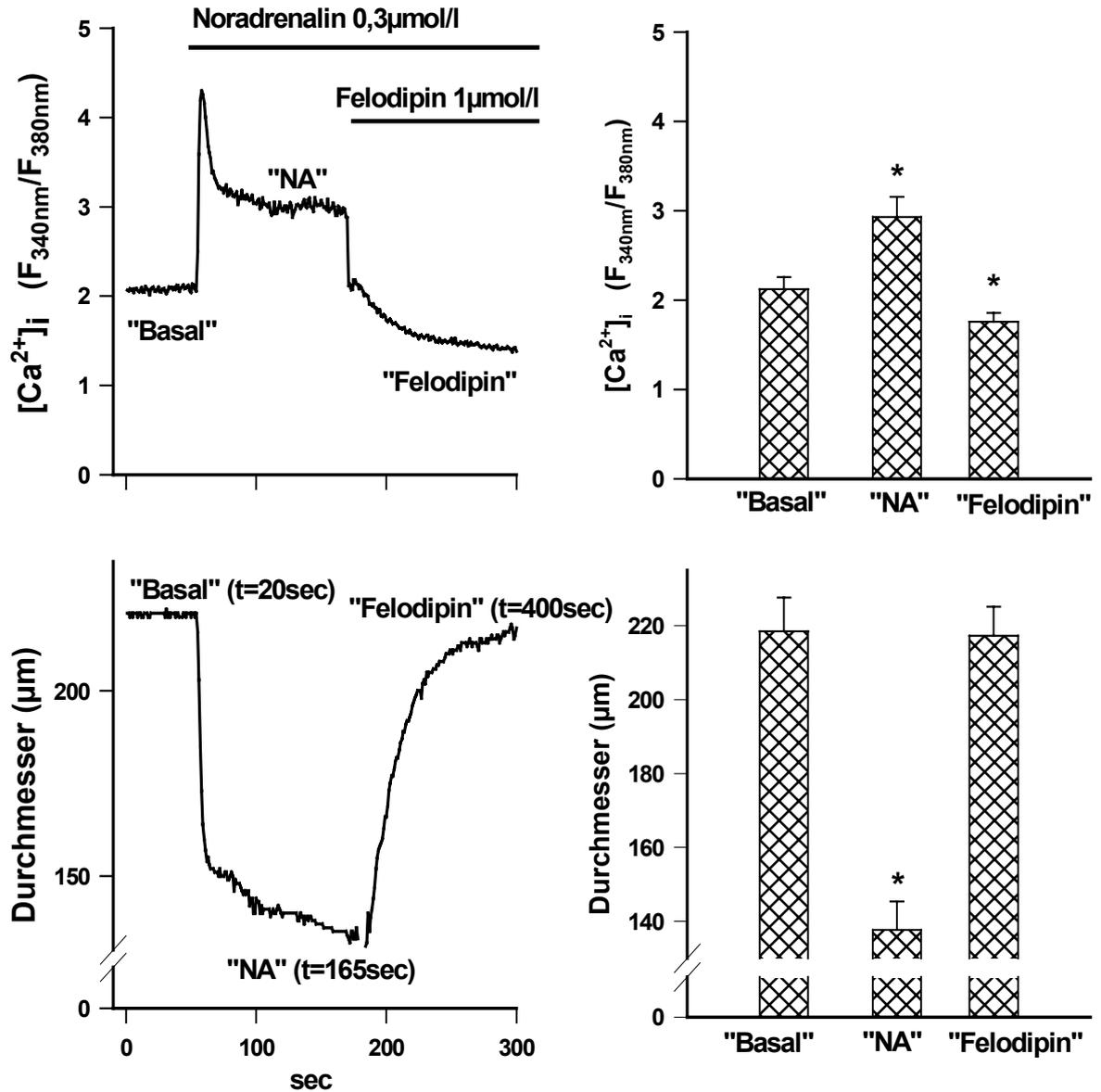


Abb. 15: Effekte des L-Typ Calciumkanalblockers Felodipin

Links: Einzelregistrierung; Rechts: $n=9$; $*=p<0,05$;

Die Effekte des L-Typ Calciumkanalblockers Felodipin wurden in 9 Versuchen untersucht. Der Ausgangsdurchmesser der Gefäße vor Vorkontraktion mit $0,3\mu\text{mol/l}$ Noradrenalin zum Zeitpunkt $t=20$ Sekunden betrug $219\pm 10\mu\text{m}$, die Calciumratio $[Ca^{2+}]_i$ $2\pm 0,1$. Im „steady state“ nach

der Applikation von Noradrenalin (der bei $t=165$ Sekunden erreicht war) kontrahierten die Gefäße auf $138 \pm 8 \mu\text{m}$ und die Calciumratio stieg auf $3 \pm 0,2$. Die Applikation von $1 \mu\text{mol/l}$ Felodipin führte bei $t=400$ Sekunden zu einer Dilatation auf $217 \pm 8 \mu\text{m}$ und einem Abfall der Calciumratio auf $1,8 \pm 0,1$.

5.7 Auswirkungen des K_{Ca} -Kanalblockers Charybdotoxin und des NO-Synthasehemmers L-Nitroarginin auf die acetylcholin-induzierte Dilatation

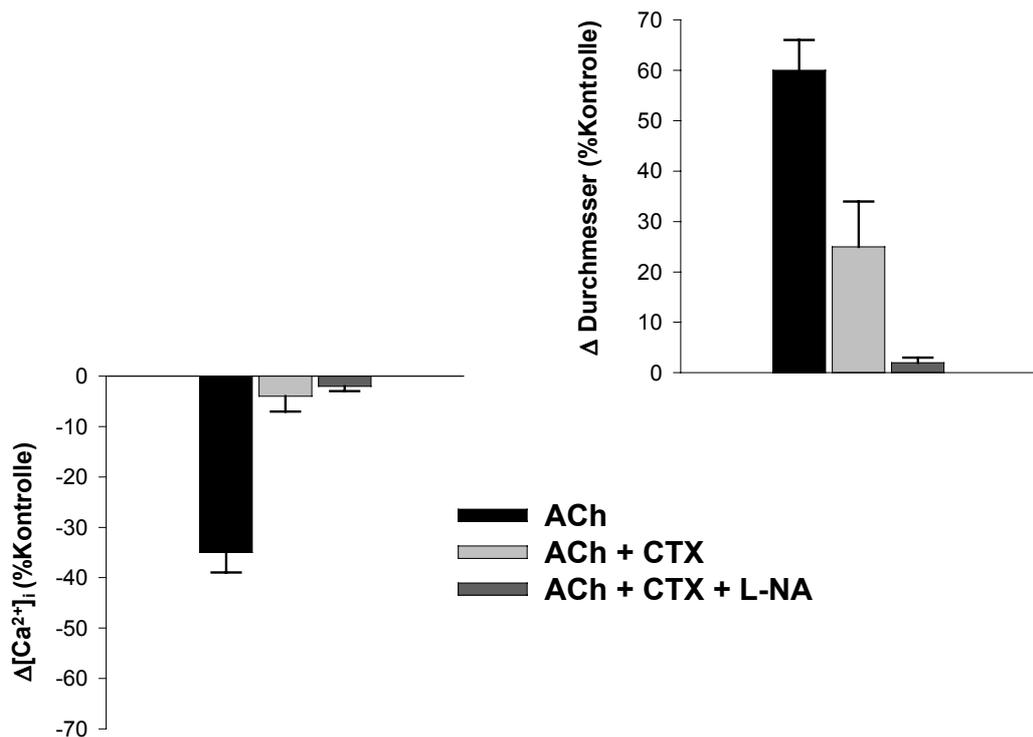


Abb. 16: Effekte von Charybdotoxin (CTX) und L-Nitroarginin (L-NA) auf die durch Acetylcholin (ACh) induzierte Dilatation

(Die Gefäße wurden eine Stunde vor Beginn der Messung mit $1 \mu\text{mol/l}$ Charybdotoxin bzw. $30 \mu\text{mol/l}$ L-NA vorinkubiert. CTX, L-NA und Noradrenalin waren allen während der Messung applizierten Lösungen zugesetzt; Acetylcholin + L-NA: s. a. Abb. 18; $n=5$)

Die Gefäße wurden eine Stunde vor Beginn der Messung mit $1\mu\text{mol/l}$ Charybdotoxin (CTX) und $30\mu\text{mol/l}$ L-Nitroarginin (L-NA) vorinkubiert. Charybdotoxin und L-NA waren allen während der Messung applizierten Lösungen zugesetzt. Nach Vorkontraktion mit $0,3\mu\text{mol/l}$ Noradrenalin wurden die Effekte des K_{Ca} -Kanalblockers Charybdotoxin untersucht. In Abb. 16 ist jeweils der „steady state“-Wert 1 Minute nach Applikation von $1\mu\text{mol/l}$ Acetylcholin dargestellt.

Im Kontrollversuch induzierte $1\mu\text{mol/l}$ Acetylcholin eine Dilatation um $58\pm 4\%$ und einen Calciumabfall um $33\pm 3\%$.

Bei Hemmung der K_{Ca} -Kanäle mit Charybdotoxin betrug die Acetylcholin-induzierte Dilatation nur noch $24\pm 8\%$ und der Calciumabfall nur noch $2\pm 2\%$.

Wurde zusätzlich noch die NO-Synthase mit L-Nitroarginin gehemmt, so betrug die Dilatation nur noch $1,0\pm 0,3\%$ und der Calciumabfall noch $1\pm 1\%$.

5.8 Auswirkungen des Guanylatcyclaseblockers ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-eins) auf die SNAP-induzierte Dilatation

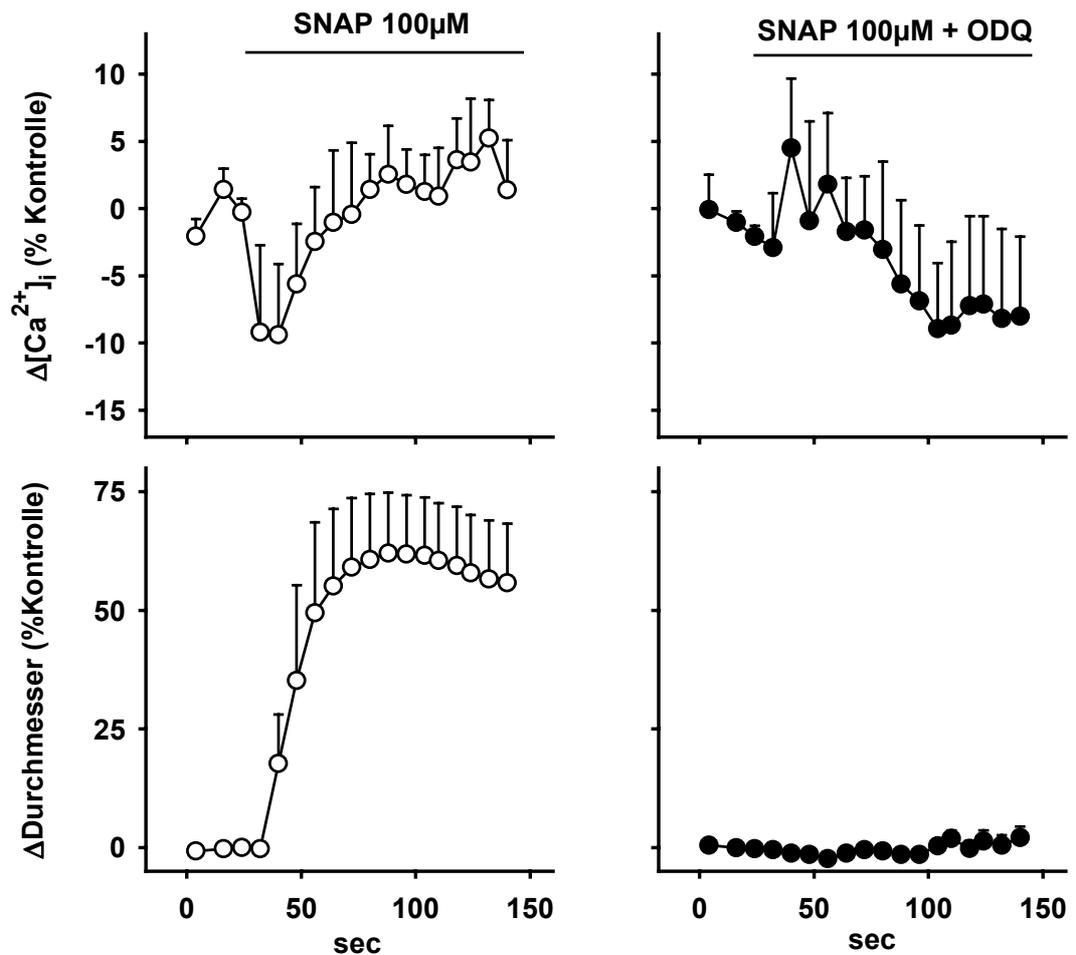


Abb. 17: SNAP und ODQ

($n=5$; normiert auf Basiswerte: Durchmesser $193 \pm 10,4 \mu\text{m}$; Ratio $2,21 \pm 0,53$) Die Gefäße wurden eine Stunde vor Beginn der Messung mit $1 \mu\text{mol/l}$ ODQ vorinkubiert. ODQ war allen während der Messung applizierten Lösungen zugesetzt.

Der spezifische Inhibitor der löslichen Guanylatcyclase ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-eins) hemmte alle Effekte des NO-Donators SNAP. Im Kontrollversuch führte SNAP zu einer maximalen

Dilatation von $55 \pm 12\%$, während bei Hemmung der löslichen Guanylatcyclase nur eine nicht-signifikante Dilatation um $2 \pm 2\%$ beobachtet wurde.

5.9 Auswirkungen des NO-Synthase-Hemmers L-NA auf die ACh-induzierte Dilatation

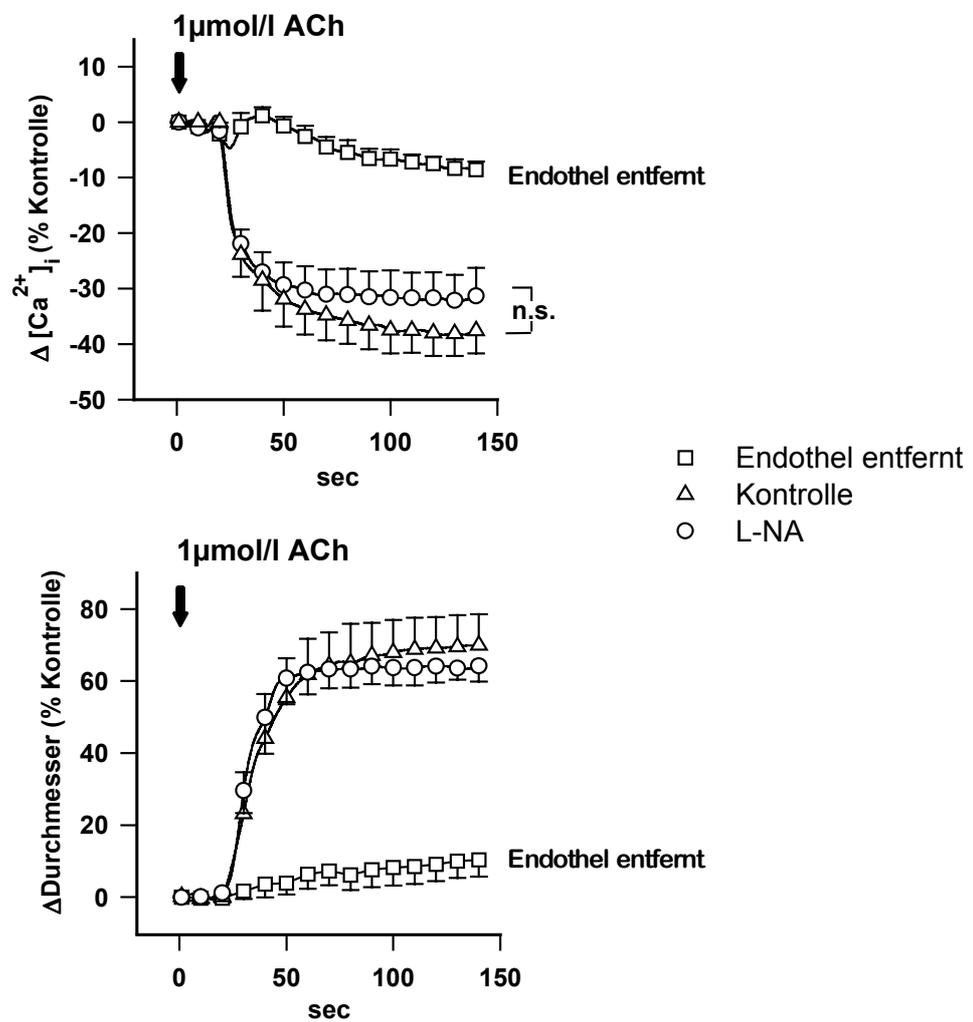


Abb. 18: Auswirkungen des NO-Synthase Hemmers L-NA auf die ACh-induzierte Dilatation ($n=5$; $n.s.=p < 0,05$)

Die Gefäße wurden eine Stunde vor Beginn der Messung mit 30µmol/l L-NA vorinkubiert. L-NA war allen während der Messung applizierten Lösungen zugesetzt.

Durch die Hemmung der NO-Synthase mit L-Nitroarginin wurden die acetylcholininduzierte Dilatation und der Calciumabfall nicht beeinflusst. 1µmol/l ACh führte im Kontrollversuch zu einer Dilatation um 64±4% und einem Calciumabfall von 31±5%. Hemmung der NO-Synthase mit L-NA führte zu einer Dilatation um 69±8% und einen Calciumabfall um 37±4%. Der Calciumabfall unter L-NA war statistisch nicht signifikant verschieden von dem im Kontrollversuch beobachteten Wert.

Nach Entfernung des Endothels betrug die Dilatation nur noch 10±4% und der Calciumabfall nur 8±1%.

5.10 Die Auswirkungen des Blocks der löslichen-Guanylatcyclase mit ODQ auf die ACh-induzierte Dilatation

Die Gefäße wurden eine Stunde vor Beginn der Messung mit 1µmol/l ODQ vorinkubiert. ODQ war allen während der Messung applizierten Lösungen zugesetzt. In n=3 Versuchen wurden die Auswirkungen des Guanylatcyclasehemmers ODQ auf die Acetylcholin-induzierte Dilatation untersucht. Dazu war ODQ während des gesamten Versuches im Organbad vorhanden.

Die Gefäße wurden zunächst mit 1µmol/l Noradrenalin um 50±2% vor- kontrahiert. Dabei kam es zu einem Anstieg des glattmuskulären $[Ca^{2+}]_i$ um 23±8% (Plateauwert bei t=170 Sekunden). Nach Applikation von 1µmol/l Acetylcholin dilatierte das Gefäß über den Ausgangsdurchmes-

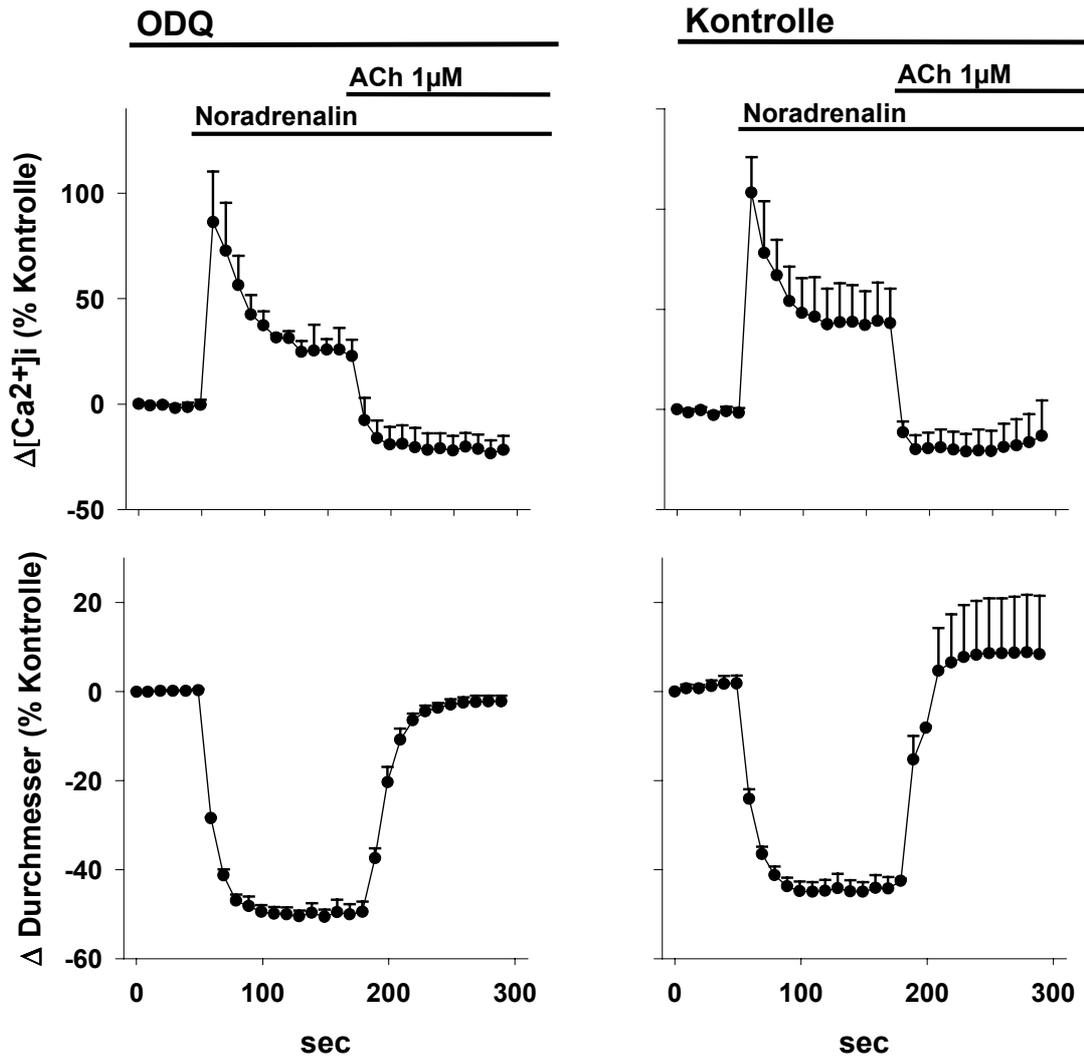


Abb. 19: Auswirkungen des lösliche-Guanylatcyclasehemmers ODQ auf die ACh-induzierte Dilatation

($n=3$; normiert auf Basiswerte; Kontrolle: Durchmesser $216 \pm 15 \mu\text{m}$; $[Ca^{2+}]_i = 2 \pm 0,4$; ODQ: Durchmesser $195 \pm 31 \mu\text{m}$; $[Ca^{2+}]_i = 1,7 \pm 0,2$)

ser auf $-2 \pm 1\%$. Gleichzeitig kam es zu einem Abfall des glattmuskulären $[Ca^{2+}]_i$ unter den Ausgangswert auf $-22 \pm 7\%$.

Im Kontrollversuch ohne ODQ wurde das Gefäß mit $1 \mu\text{mol/l}$ Noradrenalin um $44 \pm 3\%$ vorkontrahiert. Dabei stieg das glattmuskuläre $[Ca^{2+}]_i$ auf $43 \pm 7\%$ des Ausgangswertes. Die Applikation von $1 \mu\text{mol/l}$ ACh führte zu einer Dilatation auf $8 \pm 13\%$ des Ausgangsdurchmessers. Begleitet wurde diese Dilatation von einem Abfall des glattmuskulären $[Ca^{2+}]_i$ auf $13 \pm 18\%$ des Ausgangswertes.

6. Diskussion

6.1 NO

Verschiedene Wirkmechanismen von NO sind an unterschiedlichen experimentellen Modellen beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst geklärt werden, welche dieser Mechanismen in den Widerstandsgefäßen des Kreislaufs (den kleinen Arterien und Arteriolen) tatsächlich beobachtet werden können. Dazu wurden kleine, isolierte Widerstandsgefäße aus dem *M. gracilis* des Hamsters in einem Organbad an beiden Enden mit Glasmikropipetten druck- und flüssigkeitsdicht kanüliert. Der Außendurchmesser der Gefäße wurde mit einem Videosystem und die glattmuskuläre Calciumkonzentration mit der Fura-2 Methode (Gryniewicz et al. 1985) bestimmt.

Dieses Versuchsmodell wurde gewählt, weil die sog. Widerstandsgefäße im distalen Teil des Gefäßbaumes den peripheren Widerstand maßgeblich mitregulieren und sich die tonusregulierenden Mechanismen in diesen kleinen Arterien signifikant von den bisher vorrangig untersuchten, großen Leitungsgefäßen unterscheiden (Mügge et al. 1991, Nagao et al. 1992, Woolfson and Poston 1991, Urakami-Harasawa et al. 1997). Das Modell der histologisch intakten, isolierten Widerstandsarterie des Hamsters kann als eine Art Bindeglied zwischen Untersuchungen an Zellkulturen und intakten Tieren betrachtet werden. Zwar kann dieses Modell nicht die Komplexität des Gesamtorganismus abbilden, aber seine Aussagekraft geht doch weit über die der Zellkultur hinaus. Somit ist eine Extrapolation der Ergebnisse auf den Gesamtor-

ganismus als eine durchaus zulässige Spekulation zu betrachten, die aber in weiteren Schritten am intakten Tier und, wo es möglich ist, beim Menschen bestätigt werden müssen. Der Vergleich zwischen Befunden, die am Modell der isolierten Widerstandsarterie des Hamsters *in-vitro* erhoben wurden und denen, die im Hamster *in-vivo* gewonnen wurden, ist schwierig. Bei einem Vergleich der Wirkungen von Prostacyclin (PGI₂) *in-vitro* am isolierten Widerstandsgefäß des Hamsters mit *in-vivo* Befunden an Gefäßen des *M. cremaster* des lebenden Hamsters wurde z. B. festgestellt, dass *in-vitro* im Modell der isolierten Widerstandsarterie weder endotheliales, endogenes PGI₂, noch exogen zugegebenes PGI₂ eine Dilatation induzierte (Bolz et al., 1999; Bolz et al 2000). Hingegen konnte beim narkotisierten Hamster *in-vivo* eine Acetylcholin-induzierte, NO- und PGI₂ vermittelte Dilatation nachgewiesen werden (de Wit et al., 1994). Da es sich dabei um zwei verschiedene Stromgebiete handelt, wird der Vergleich noch zusätzlich erschwert. Unter gewissen Umständen könnte das *in-vitro* Modell der isolierten Widerstandsarterie des Hamsters evtl. genauere Schlüsse auf die Situation im Gesamtorganismus zulassen als ein *in-vivo* Versuchsansatz. Denn im Gegensatz zu einem *in-vivo* Modell werden die Befunde im Modell der isolierten Widerstandsarterie nicht durch die Auswirkungen einer für *in-vivo* Versuche oft notwendigen Narkose beeinflusst. So konnten de Wit et al. durch Experimente an der Rückenhautkammer des wachen Hamsters zeigen, dass ein wesentlicher Anteil der acetylcholin-induzierten EDHF-Antwort durch eine Narkose mit Pentobarbital gehemmt wird (de Wit et al., 1999).

Um die Mechanismen der Dilatation von Widerstandsgefäßen durch NO zu untersuchen, wurden zunächst Versuche mit dem NO-Donator SNAP durchgeführt. SNAP gehört chemisch zu den S-Nitrosothiolen, die in wässriger Lösung spontan zerfallen (Megson 2000). Dabei gibt 0,3 mmol/l SNAP in wässriger Lösung nach zwei Minuten ca. 1 µmol/l NO ab (Hou et al. 1999).

Der NO-Donator SNAP induzierte in niedrigen Konzentrationen (0,1 µmol/l) eine langsame Dilatation der Gefäße, bei der keine signifikanten Änderungen des glattmuskulären Ca^{2+} -Spiegels auftraten. Zwar wurde ein geringer, initialer Abfall des glattmuskulären Ca^{2+} -Spiegels auch bei 0,1 µmol/l SNAP beobachtet. Dieser geringe Abfall war aber nicht größer als der spontane Calciumabfall, der auch im Kontrollversuch ohne Zugabe von Acetylcholin oder NO-Donatoren in Anwesenheit von Noradrenalin allein auftrat.

In der Literatur ist die Änderung des Kontraktionszustandes von glatten Muskelzellen ohne gleichzeitige Änderung ihres intrazellulären Calciumspiegels als „Calciumdesensitivierung“ beschrieben (Wu et al. 1996, Lee et al. 1997).

Der Kontraktionszustand der glatten Muskelzelle wird hauptsächlich durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung der 20 kDa Myosin-Leichtkette reguliert. Die Myosin-Leichtkette wird von der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Myosin-Leichtkettenkinase (MLCK) durch Phosphorylierung aktiviert und von der Myosin-Leichtkettenphosphatase (MLCP) durch Dephosphorylierung wieder inaktiviert (Übersicht bei Pfitzer 2001).

Bei einer durch Agonisten (wie. z. B. Noradrenalin) induzierten Kontraktion von glatten Muskelzellen kann es zu einer Calciumsensitivierung kommen, die durch eine Hemmung der MLCP-Aktivität entsteht. Die Aktivität der MLCP wird durch die kleine 22-26 kDa GTPase RhoA reguliert, die wiederum eine Rhokinase aktiviert (Matsui et al. 1996). Die Rhokinase aktiviert eine ZIP-Kinase, welche die Aktivität der MLCP durch Phosphorylierung hemmt. (MacDonald et al. 2001). Der entgegengesetzte Effekt ist die „Calciumdesensitivierung“ von glatten Muskelzellen (Wu et al. 1996, Lee et al. 1997). Bei gleichbleibendem Calciumspiegel führt eine Abnahme der Myosin-Leichtkettenphosphorylierung zu einer verminderten Kontraktion und damit zu einer Calciumdesensitivierung des kontraktiven Apparates. An großen Leitungsgefäßen konnte gezeigt werden, dass die Calciumdesensitivierung durch NO von der cGMP-abhängigen G-Kinase cGK I vermittelt wird, die RhoA phosphoryliert und damit inhibiert (Sauzeau et al. 2000; Chitale und Webb 2002). Wird die Aktivität der MLCP sehr hoch, so könnte theoretisch ein Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration auftreten, ohne dass es dabei zu einer Kontraktion des Gefäßes kommt. Tatsächlich konnte bei den Experimenten mit den höheren Konzentrationen des NO-Donors SNAP beobachtet werden, dass das Gefäß weiterdilatiert, obwohl die Ca^{2+} -Konzentration (nach einem transienten Abfall, ausgelöst durch eine Hyperpolarisation) bereits wieder anstieg (s.u. *Ergebnisse 5.2.2 1 μ M SNAP* und *Ergebnisse 5.2.3 10 μ mol/l SNAP*).

Neben Änderungen der globalen, intrazellulären Calciumkonzentration können auch lokale Änderungen des Calciumspiegels (sog. „Ca²⁺-sparks“) für den Kontraktionszustand einer glatten Muskelzelle eine große Rolle spielen (Nelson et al. 1995). Ca²⁺-sparks entstehen durch die Aktivierung von „Ryanodin-sensitive Ca²⁺-release channels“ (RyR) in den Membranen des plasmalemm-nahen sarcoplasmatischen Reticulums (SR). Ca²⁺-sparks können calciumabhängige Kaliumkanäle (BK_{Ca}-Kanäle) aktivieren und die glatte Gefäßmuskelzelle somit durch Hyperpolarisation relaxieren (Fürstenau et al. 2000). Zyklische Nucleotide, wie z. B. cGMP, können in glatten Gefäßmuskelzellen ebenfalls die Frequenz von Ca²⁺-sparks erhöhen (Porter et al. 1998). Weil in der vorliegenden Arbeit messtechnisch bedingt nur der Nettowert der Calciumumsätze registriert wurde, blieben evtl. auftretende Ca²⁺-sparks unberücksichtigt. Theoretisch wäre es daher denkbar, dass die calciumunabhängige Komponente der SNAP-induzierten Dilatation nicht durch eine Calciumdesensitivierung des kontraktilen Apparates zustande kommt, sondern durch lokale Ca²⁺-sparks, die sich nicht auf das Netto-Calciumsignal auswirken würden und trotzdem BK_{Ca}-Kanäle aktivieren könnten. Dagegen spricht, dass die calciumunabhängige Komponente der Dilatation unter erhöhten extrazellulären K⁺-Konzentrationen (75mM) erhalten blieb. Die erhöhte K⁺-Konzentration führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichtspotentials für K⁺ (E_K⁺) zu positiveren Werten, wodurch eine Hyperpolarisation der Zellmembran verhindert werden sollte. Auch unter dem Einfluss des BK_{Ca}-Kanalblockers Charybdotoxin (der hyperpolarisierende, calciumabhän-

gige Kaliumkanäle blockiert) blieb die calciumunabhängige Komponente der Dilatation erhalten. Daher ist eine funktionelle Bedeutung der Ca^{2+} -sparks für die NO- und EDHF-induzierte Dilatation in diesem Modell unwahrscheinlich.

Nach Applikation der höchsten Dosis des NO Donators SNAP (100 μM) ließen sich pharmakologisch zwei Komponenten der Dilatation unterscheiden: eine erste, schnelle Komponente, die mit einem synchronen, transienten Abfall der Ca^{2+} -Konzentration einherging und eine sich anschließende zweite, langsamere Komponente. Bei dieser zweiten, langsamen Komponente traten keine weiteren Änderungen des Calciumspiegels auf, die größer waren als die im Kontrollversuch („*Sham-Treatment*“) ebenfalls beobachteten Änderungen. Daher wurde diese zweite Komponente vermutlich durch calciumdesensitivierende Mechanismen vermittelt.

Änderungen des glattmuskulären Calciumspiegels sind in diesen Gefäßen und unter diesen Versuchsbedingungen Folge einer Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen, welche die Offenwahrscheinlichkeit von L-Typ Calciumkanälen reduziert. Deshalb wurde die Hyperpolarisation in zwei Experimenten durch Erhöhung des extrazellulären K^+ bzw. durch den K_{Ca} -Kanalblocker Charybdotoxin verhindert. Beide Interventionen hemmten den transienten Calciumabfall und die schnelle Komponente der Dilatation komplett, hatten allerdings keinen Effekt auf die langsame, calciumunabhängige Komponente der Dilatation. Diese Ergebnisse unterstützen daher die Annahme zweier unterschiedlicher Komponenten innerhalb der Gesamtreaktion.

In einem zweiten, mathematischen Ansatz wurde in Ergänzung der pharmakologischen Daten gezeigt, dass die durch hohe Dosen von SNAP ($1\mu\text{mol/l}$, $10\mu\text{mol/l}$ und $100\mu\text{mol/l}$) induzierte Dilatation aus zwei Komponenten besteht.

Dazu wurden die Datensätze mit einem mathematischen Modell beschrieben und dann auf ihre Verschiedenheit untersucht. Obwohl dies ein häufiges Problem ist, gibt es dafür keine allgemein akzeptierte Lösung (Motulsky und Ransnas, 1987). Ein Vergleich der einzelnen Messwerte von verschiedenen Datensätze mittels herkömmlicher statistischer Methoden (wie z. B. dem t-Test) würde nur eine Aussage über Unterschiede zwischen den einzelnen Messwerten erlauben, aber keine Aussage darüber, ob sich die Datensätze als Ganzes signifikant unterscheiden. Motulsky und Ransnas haben deswegen vorgeschlagen, dieses Problem mittels nichtlinearer Regressionsanalyse näherungsweise zu lösen. Prinzipiell wird dabei davon ausgegangen, dass Datensätze dann signifikant verschieden sind, wenn getrennte, nichtlineare Regressionen über die einzelnen Datensätze eine bessere Annäherung an die Messwerte ergeben als eine nichtlineare Regression über die zusammengefassten Datensätze (Motulsky und Ransnas, 1987). In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Prinzip angewandt. Dazu wurden nichtlineare Regressionen über den gesamten Versuchsablauf ("zusammengefasster Datensatz"), sowie über die langsame bzw. schnelle Komponente getrennt durchgeführt.

Die Annäherung der nichtlinearen Regressionen an die Messwerte kann durch verschiedene Parameter quantitativ beschrieben werden.

Wenn sich für eine Regression mit nur einer Gleichung über den gesamten Versuchsablauf eine bessere Annäherung an die Messwerte ergab als bei einer Regression über die beiden getrennten Einzelkomponenten, so wurde von nur einer Komponente der Dilatation ausgegangen. Wenn sich dagegen für eine Regression über die beiden getrennten Einzelkomponenten mit zwei verschiedenen Gleichungen eine bessere Annäherung an die Messwerte ergab als bei einer Regression mit nur einer Gleichung über den gesamten Versuchsablauf, so wurde von zwei verschiedenen Komponenten ausgegangen.

Eine nichtlineare Regression kann grundsätzlich nur iterativ, also durch schrittweise Annäherung, durchgeführt werden. Dadurch ergibt sich aber das Problem, dass die Parameter, welche die Güte einer nichtlinearen Regression beschreiben, nicht für eine formalstatistische Auswertung der verwendet werden können (Motulsky und Ransnas, 1987). Daher können anhand der Ergebnisse von nichtlinearen Regressionen nur Abschätzungen vorgenommen werden. Dabei unterstützen die errechneten Parameter R^2_{Korr} und F die Annahme, dass die durch $0,1\mu\text{mol/l}$ SNAP induzierte Dilatation nur aus einer Komponente besteht, während sich für die durch $100\mu\text{mol/l}$ SNAP induzierte Dilatation zwei Komponenten mathematisch darstellen lassen. Auch für die mittleren Konzentrationen von SNAP ($1\mu\text{mol/l}$ und $10\mu\text{mol/l}$) unterstützen die Regressionsanalysen die Annahme zweier Komponenten bei diesen Konzentrationen. Wahrscheinlich handelt es sich bei den zwei Komponenten der SNAP-induzierten Dilatation um ein dosisabhängiges Konti-

num, bei dem der Anteil der schnellen Komponente mit höheren Dosen des NO-Donors SNAP zunimmt.

Um zu untersuchen, ob die schnelle Komponente der Dilatation und der transiente Calciumabfall durch eine Hyperpolarisation zustande kamen, wurden Experimente mit erhöhten extrazellulären K^+ -Konzentrationen durchgeführt. Das Gleichgewichtspotential für K^+ (E_{K^+}) der glatten Muskelzellen wird durch die erhöhte extrazelluläre K^+ -Konzentration auf rechnerisch -19mV verschoben, wodurch eine Hyperpolarisation der Zellmembran verhindert werden sollte. Falls eine Aktivierung von hyperpolarisierenden Ionenkanälen für den transienten Calciumabfall und die schnelle Komponente der Dilatation verantwortlich ist, so sollten diese durch die Depolarisation mit K^+ inhibiert werden. Tatsächlich wurden der SNAP-induzierte, transiente Calciumabfall und die schnelle Komponente der Dilatation durch die erhöhte extrazelluläre K^+ -Konzentration gehemmt. Die calciumunabhängige Komponente der Dilatation wurde durch die Depolarisation mit K^+ nicht beeinflusst.

Als nächstes sollte geklärt werden, durch welche Ionenkanäle die Hyperpolarisation hervorgerufen wird. Dazu wurden die Auswirkungen des K_{Ca} -Kanalblockers Charybdotoxin untersucht. Charybdotoxin ist ein aus 37 Aminosäuren bestehendes Peptid, das aus dem Gift des Skorpions *Leiurus quinquestriatus var. Hebraeus* isoliert wurde. Es blockiert calciumabhängige „high-conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK_{Ca})“ Kaliumkanäle (Garcia et al. 1995). Charybdotoxin hat eine hohe Affinität zu

BK_{Ca}-Kanälen, kann aber auch spannungsabhängige Kaliumkanäle blockieren (Übersicht bei Miller 1995). Der transiente Abfall der Ca²⁺-Konzentration und die damit einhergehende, initiale, schnelle Komponente der Dilatation waren dosisabhängig und vollständig durch Charybdotoxin hemmbar. Die langsame Komponente der Dilatation wurde durch Charybdotoxin nicht beeinflusst. Obwohl das Membranpotential nicht gemessen wurde, deuten die Ergebnisse der Versuche mit K⁺ und Charybdotoxin darauf hin, dass die schnelle Komponente der Dilatation und der transiente Calciumabfall wahrscheinlich durch eine Hyperpolarisation hervorgerufen werden, die am wahrscheinlichsten durch die Aktivierung von calciumabhängigen BK_{Ca}-Kaliumkanälen entsteht.

Die Hyperpolarisation könnte zu einer Inaktivierung von spannungsabhängigen L-Typ-Ca²⁺-Kanälen führen. Diese Annahme wird durch die Experimente mit dem L-Typ Calciumkanalblocker Felodipin gestützt. Nach Vorkontraktion mit Noradrenalin führte Felodipin (ähnlich wie bei Hyperpolarisation beobachtet) zu einer raschen Dilatation der Gefäße und einem Calciumabfall unter den Ausgangswert vor der Vorkontraktion mit Noradrenalin. Vermutlich kommt es im Modell der isolierten Widerstandsarterie des Hamsters nach Stimulation mit Noradrenalin zu einem ständigen Ca²⁺-Influx durch L-Typ Ca²⁺-Kanäle. Der intrazelluläre Calciumspiegel wird an diesen Gefäßen wahrscheinlich unmittelbar durch das Membranpotential beeinflusst. Eine NO-induzierte Aktivierung von calciumabhängigen Kaliumkanälen führt durch Hyper-

polarisation der Zellmembran vermutlich zu einer verringerten Öffnungswahrscheinlichkeit der L-Typ-Calciumkanäle und damit zu einem Abfall des intrazellulären Calciumspiegels.

Neben den cGMP-abhängigen Effekten von NO wurden auch cGMP-unabhängige Effekte beschrieben. So kann gasförmiges NO im glatten Gefäßmuskel direkt BK_{Ca}-Kanäle aktivieren (Bolotina et al. 1994). Um zu klären, ob cGMP-unabhängige Effekte von NO an histologisch intakten Widerstandsarterien eine funktionelle Bedeutung haben, sollten die Auswirkungen einer pharmakologischen Hemmung der löslichen Guanylatcyclase (sGC) untersucht werden. In vielen Studien, in denen die Wirkmechanismen von NO untersucht wurden, wurde Methylenblau als Inhibitor für die lösliche Guanylatcyclase verwendet. Allerdings kann Methylenblau die Funktion von NO-Synthasen hemmen und NO direkt inaktivieren (Mayer et al. 1993). Daher wurde für diese Arbeit der sGC-inhibitor ODQ (1H-[1,2,4]Oxodiazolo[4,3- α]quinoxalin-1-eins) gewählt (Garthwaite et al. 1995). ODQ hemmt die lösliche Guanylatcyclase (sGC) relativ spezifisch und nichtkompetitiv, wahrscheinlich durch Oxidation des Fe²⁺ der Hämgruppe zu Fe³⁺ (Garthwaite et al. 1995). ODQ hat keinen nachweisbaren Einfluß auf die membrangebundene, partikuläre Guanylatcyclase (Garthwaite et al. 1995). Wenn ODQ durch den Zellstoffwechsel metabolisch verändert wird, kann es allerdings auch die NO-Synthase hemmen und mit dem Cytochrom P450-Enzymsystem interferieren (Feelisch et al. 1999). Da der in dieser Arbeit verwendete NO-Donator SNAP, im Gegensatz zu z.B. SNP (Sodi-

um-Nitroprussid-Hydrochlorid) oder den organischen Nitraten, nicht durch das Cytochrom P450-Enzymsystem aktiviert werden muss (Megson 2000), ist eine Beeinflussung der NO-Freisetzung durch ODQ unwahrscheinlich. Bei laborinternen Messungen mit einer NO-Sonde konnte außerdem festgestellt werden, dass ODQ die Bioverfügbarkeit von gasförmigem oder durch SNAP freigesetztem NO nicht beeinflusst (Bolz et al., unveröffentlichte Daten).

Sowohl die langsame, calciumunabhängige Komponente der SNAP-induzierten Dilatation als auch die schnelle Komponente mit dem transienten Calciumabfall waren vollständig durch ODQ hemmbar. Die glattmuskuläre cGMP-Konzentration konnte zwar nicht gemessen werden, aber ODQ hemmte alle im Kontrollversuch beobachteten Effekte des NO-Donators SNAP. Daher haben cGMP-unabhängige Wirkmechanismen von NO, wie die direkte Aktivierung von calciumabhängigen Kaliumkanälen (Bolotina et. al. 1994), im Modell der isolierten Widerstandsarterie des Hamsters wohl keine funktionelle Bedeutung.

Dosisabhängig spielen bei der Dilatation isolierter Widerstandsarterien durch NO wahrscheinlich nur zwei, durch cGMP-vermittelte Effekte, eine Rolle: Bei niedrigen Konzentrationen von NO eine Dilatation ohne signifikante Beeinflussung der glattmuskulären Ca^{2+} -Konzentration (vermutlich durch calciumdesensitivierende Mechanismen) und bei höheren Dosen die Aktivierung von calciumabhängigen Kaliumkanälen durch cGMP.

Der bei hohen SNAP-Dosen beobachtete, transiente Abfall des glattmuskulären Calciumspiegels konnte vollständig durch Charybdotoxin (CTX) gehemmt werden. Wahrscheinlich haben im Modell der isolierten Widerstandsarterie des Hamsters die von Cohen et al. beschriebene Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarcoplasmatischen Retikulum (SR) bzw. die Aktivierung von sarcoplasmatischen Ionenpumpen (durch vermutlich cGMP und Proteinkinase G abhängige Mechanismen) keine funktionelle Bedeutung (Cohen et al. 1999) .

6.2 EDHF

Die in den 1980er Jahren von mehreren Autoren gemachte Annahme, dass ein eigenständiger „Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor“ EDHF existiert (Bolton et al. 1984, Komori et al. 1988, Felétou und Vanhoutte 1988, Taylor et al. 1988, Chen et al. 1988, Huang et al. 1988) wird mittlerweile durch eine ganze Reihe von pharmakologischen und molekularbiologischen Experimenten gestützt (Bény und Brunet 1988, Cowan und Cohen 1991, Mügge et al. 1991, Mombouli et al. 1996, Popp et al. 1996). Aus Untersuchungen mit pharmakologischen Hemmstoffen ergaben sich erste Hinweise, dass EDHF in Cerebral-, Koronar- und Nierenarterien eine Epoxyeicosatriensäure (EET) sein könnte (Hecker et al. 1994, Campbell et al. 1996). Epoxyeicosatriensäuren (EETs) werden durch das Enzym Cytochrom P450 aus Arachidonsäure gebildet und durch vasoaktive Substanzen wie Acetylcholin oder Bradykinin, aber auch durch Arachidonsäure selbst, aus Endothelzellen freigesetzt. Bestimmte EETs, z.B 5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-

EET und 14,15-EET, können calciumabhängige Kaliumkanäle (K_{Ca} -Kanäle) aktivieren und so die glatte Muskelzelle hyperpolarisieren. Diese frühen Hinweise auf die Identität von EDHF sind wegen der mangelnden Spezifität der verwendeten Cytochrom-P450 Inhibitoren allerdings kontrovers diskutiert worden, denn die meisten Cytochrom-P450 Hemmstoffe inhibieren gleichzeitig auch calciumabhängige K^+ -Kanäle, also das „Ziel“ des EDHF (Zygmunt et al. 1996). Wesentlich stärkere Hinweise auf die Identität des EDHF ergaben jüngste molekularbiologische Experimente. In weiterführenden Untersuchungen konnte in dem für diese Arbeit verwendeten Modell der kleinen Skelettmuskelgefäße des Hamsters gezeigt werden, dass die Effekte von EDHF durch Cytochrom P450-2C8/9 (CYP 2C8/9) Antisenseoligonucleotide gehemmt werden können (Bolz et al. 2000). Durch analoge Experimente konnten auch Fisslthaler et al. zeigen, dass CYP 2C8/9 in Schweinekoronararterien eine „EDHF-Synthase“ ist (Fisslthaler et al. 1999).

Allerdings wäre es denkbar, dass einige der Effekte, die bisher dem EDHF zugeschrieben wurden, nur auf einer unvollständigen Hemmung der NO-Synthase beruhen könnten. Denn NO ist ebenfalls in der Lage, glatte Gefäßmuskelzellen zu hyperpolarisieren und hat somit EDHF-ähnliche Wirkungen auf den glattmuskulären Calciumspiegel (Cohen et al. 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die Acetylcholin (ACh)-induzierte, nicht durch L-NA und Indomethacin hemmbare Dilatation in der *Arteria carotis* des Kaninchens vollständig durch die Kombination von zwei NO-Synthase-Inhibitoren (L-NA und L-NAME) hemmbar ist

(Cohen et al. 1997). Weiterhin sind in der *Arteria carotis* und der Aorta des Kaninchens endothelabhängige Hyperpolarisationen nachweisbar, obwohl beide Gefäße keine P450 abhängigen Arachidonsäure Metaboliten produzieren (Pfister et al. 1991).

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, welche zellulären Mechanismen der EDHF-induzierten Dilatation von Widerstandsarterien zugrunde liegen. Es sollte geklärt werden, ob sich NO und EDHF am Modell der isolierten Widerstandsarterie des Hamsters anhand ihrer Wirkmechanismen unterscheiden lassen und ob diese auch durch unterschiedliche *second-messenger*-Systeme vermittelt werden.

Dabei spielen die Größe des untersuchten Gefäßes und die Versuchsbedingungen eine wichtige Rolle, denn von mehreren Autoren wurde sowohl in tierexperimentellen Studien (Mügge et al. 1991, Nagao et al. 1992) als auch an menschlichen Blutgefäßen (Woolfson and Poston 1991, Urakami-Harasawa et al. 1997) gezeigt, dass der Beitrag von EDHF zur Gefäßdilatation in den kleinen Widerstandsarterien, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, wesentlich größer ist als in den großen Leitungsgefäßen. Auch die Versuchsbedingungen, insbesondere das Ausgangsmembranpotential, sind für die Freisetzung von EDHF durch Agonisten und seine Wirkung am glatten Gefäßmuskel von entscheidender Bedeutung. So unterscheidet sich z. B. das Membranpotential von Arterien, die aufgeschnitten auf einer ebenen

Fläche befestigt sind, deutlich von dem Membranpotential, das unter physiologischem, transmuralen Druck gemessen wird (Campbell und Harder 1999). Außerdem werden durch transmuralen Druck *second-messenger* Systeme aktiviert, die u.a. den Aktivierungszustand des glatten Muskels und die Interaktion zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen beeinflussen (Hill et al. 1990, Kauser et al. 1989). Das für diese Arbeit verwendete Modell kommt durch die histologisch intakten Widerstandsgefäße unter einen transmuralen Druck von ca. 45 mmHg sowie durch isobare Kontraktion und Dilatation der Gefäße den physiologischen Bedingungen relativ nahe.

Um die Wirkmechanismen von EDHF in dem hier verwendeten Modell näher untersuchen und mit denen von NO vergleichen zu können, wurden in einer früheren Studie die Cyclooxygenase und die NO-Synthase durch Inkubation mit Indometacin bzw. L-NA gehemmt (Bolz et al. 1999). Dabei konnte gezeigt werden, dass Indometacin und L-NA in den verwendeten Konzentrationen alle beobachteten Effekte von endogenem NO und Prostaglandinen hemmen (Bolz et al. 1999).

Unter L-NA und Indometacin führte die Stimulation der Gefäße mit 1 $\mu\text{mol/l}$ ACh zu einer schnellen Dilatation und einem Abfall der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Die Calciumkonzentration blieb bis zum Auswaschen des Acetylcholins auf diesem niedrigen Wert, der unter dem Ausgangswert vor der Vorkontraktion mit Noradrenalin lag. Es konnte gezeigt werden, dass diese durch 1 $\mu\text{mol/l}$ Acetylcholin induzierte Dilatation durch EDHF zustande kommt (Bolz et al 1999).

Durch niedrige Dosen des NO-Donators SNAP (0,1µmol/l) wurden die Gefäße hingegen dilatiert, ohne dass ein signifikanter Abfall des glattmuskulären Calciumspiegels auftrat, vermutlich also durch calciumunabhängige Mechanismen. (Zwar wurde ein geringer, initialer Abfall des glattmuskulären Ca²⁺-Spiegels auch bei 0,1µmol/l SNAP beobachtet. Dieser geringe Abfall war aber nicht größer als der spontane Calciumabfall, der auch im Kontrollversuch ohne Zugabe von Acetylcholin oder NO-Donatoren in Anwesenheit von Noradrenalin allein auftrat [Kontrollversuch]).

Erst bei höheren Dosen des NO-Donators SNAP trat ein signifikanter Calciumabfall (der größer war als im Kontrollversuch) mit einer schnellen Komponente der Dilatation auf. Dieser Calciumabfall wurde wahrscheinlich durch die Aktivierung von hyperpolarisierenden, calciumabhängigen Kaliumkanälen ausgelöst, war aber nur transient. Das durch Acetylcholin induzierte EDHF hingegen führte zu einem dauerhaften Ca²⁺-Abfall unter das Ausgangsniveau, der bis zum Auswaschen des Acetylcholins anhielt. Damit konnte gezeigt werden, dass sich die Effekte von NO und EDHF an diesem Modell durch ihre unterschiedlichen Auswirkungen auf den Calciumspiegel unterscheiden lassen.

Um zu klären, ob die NO- und die EDHF-induzierte Dilatation auch durch verschiedene *second-messenger* vermittelt werden, wurden nun die Auswirkungen des löslichen-Guanylatcylase-Hemmstoffes ODQ auf die Acetylcholin-induzierte Dilatation untersucht. ODQ hatte keine Auswirkungen auf die mit 1µmol/l Acetylcholin induzierte Dilatation durch

EDHF. Zwar kann ODQ auch NO-Synthasen und Cytochrom-P450 Enzymsysteme hemmen (Feelisch et al. 1999), aber die NO-Synthase-Hemmung war in diesen Versuchen erwünscht und bereits durch L-NA erfolgt. Laborinterne Messungen ergaben, dass ODQ die Bioverfügbarkeit von gasförmigem und durch SNAP freigesetztem NO nicht beeinträchtigt (Bolz et al., unveröffentlichte Daten). Eine eventuelle Hemmung des Cytochrom P450 Enzymsystems (und damit der „EDHF-Synthase“ in diesen Gefäßen) kann zwar nicht ausgeschlossen werden, hat aber vermutlich keine funktionelle Bedeutung, da die EDHF-abhängige Dilatation unter ODQ nicht beeinträchtigt wurde.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich die Effekte von NO und EDHF im Modell der isolierten Widerstandsarterie des Hamsters in ihrer Charakteristik grundlegend unterscheiden und außerdem durch die Aktivierung von zwei verschiedenen Signalketten vermittelt werden.

Die bei niedrigen Dosen von NO beobachtete, langsame Dilatation - durch mutmaßlich calciumunabhängige - Mechanismen ist möglicherweise für die langfristige Anpassung der Durchblutung von Bedeutung. Beispielsweise könnte die kontinuierliche, durch die Wandschubspannung gesteuerte Freisetzung von niedrigen NO-Dosen die Calciumsensitivität der glatten Gefäßmuskelzellen modulieren und so den „Grundtonus“ eines Gefäßbettes regulieren (Übersicht bei Fisher et al. 2001).

Die Freisetzung von EDHF durch Acetylcholin-Konzentrationen, wie sie in diesen Untersuchungen verwendet wurden, könnte auch unter physiologischen Bedingungen *in-vivo* eine Rolle spielen. In Modellrechnungen konnte gezeigt werden, dass aus Synapsen des arbeitenden Skelettmuskels freigesetztes Acetylcholin durch Diffusion die Muskelgefäße in Konzentrationen von bis zu 1 $\mu\text{mol/l}$ erreichen kann (Pierzga und Segal 1994). Die beschriebene, schnelle Dilatation durch eine Acetylcholin-induzierte Bildung von EDHF könnte daher, ausgehend von der „Grundeinstellung“ durch calciumdesensitivierende Mechanismen, z. B. für die kurzfristige Anpassung der Durchblutung im arbeitenden Skelettmuskel von Bedeutung sein.

7. Zusammenfassung

Verschiedene Wirkmechanismen des endothelialen Autacoids NO sind an unterschiedlichen, experimentellen Modellen beschrieben worden. Es ist aber noch nicht abschließend geklärt, welche Wirkmechanismen von NO in den Widerstandsgefäßen des Kreislaufs (den kleinen Arterien und Arteriolen) tatsächlich funktionell bedeutsam sind. In der vorliegenden Arbeit sollten daher die Wirkmechanismen von NO am Modell der isolierten Widerstandsarterie des Hamsters untersucht werden. Kleine Arterien (Durchmesser $174 \pm 35 \mu\text{m}$) aus dem *M. quadriceps* weiblicher syrischer Goldhamster wurden mikrochirurgisch präpariert, in einem Organbad mit Glasmikropipetten kanüliert und dann an beiden Enden mit monofilem Faden druck- und flüssigkeitsdicht befestigt. Im Gefäß wurde ein hydrostatischer Druck von 45mmHg erzeugt. Die glattmuskuläre Ca^{2+} -Konzentration wurde mit der Fura-2 Methode und der Außendurchmesser des Gefäßes mittels eines Videosystems bestimmt. Zu Beginn des Versuchs wurden die Gefäße mit Noradrenalin vorkontrahiert.

Der NO-Donator SNAP induzierte in niedrigen Konzentrationen (0,1 $\mu\text{mol/l}$) eine langsame Dilatation des Gefäßes ohne signifikante Beeinflussung der glattmuskulären Ca^{2+} -Konzentration. In niedrigen Dosen dilatiert NO isolierte Widerstandsarterien also nur durch calciumunabhängige Mechanismen, wahrscheinlich durch eine Calciumdesensitivierung des kontraktilen Apparates.

Höhere Dosen des NO Donators SNAP (100µmol/l) führten hingegen zu einer zusätzlichen, initialen, schnellen Komponente der Dilatation, die von einem transienten Abfall der Ca^{2+} -Konzentration ausgelöst wurde. Obwohl die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bereits nach kurzer Zeit den Ausgangswert wieder erreicht hatte, dilatierte das Gefäß weiter. Der zeitliche Verlauf dieser sich anschließenden, zweiten, langsamen Komponente zeigte dabei in Bezug auf Kinetik und Amplitude Ähnlichkeiten zu der langsamen Dilatation, wie sie bereits bei Verwendung von niedrigen SNAP-Konzentrationen beobachtet wurde. Der transiente Abfall der Ca^{2+} -Konzentration und die damit einhergehende, initiale, schnelle Komponente der Dilatation waren dosisabhängig und vollständig durch Charybdotoxin hemmbar, das hauptsächlich calciumabhängige Kaliumkanäle (BK_{Ca} -Kanäle) blockiert.

Versuche mit dem L-Typ Calciumkanalblocker Felodipin stützen die Hypothese, daß eine NO-induzierte Aktivierung von calciumabhängigen Kaliumkanälen zur Hyperpolarisation der Zellmembran und schließlich zu einer verringerten Öffnungswahrscheinlichkeit der L-Typ-Calciumkanäle und damit zu einem Abfall des intrazellulären Calciumspiegels führt.

Die langsame Komponente der Dilatation, ohne Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, wurde hingegen durch Charybdotoxin nicht beeinflusst. Der transiente Ca^{2+} -Abfall und die schnelle Komponente der Dilatation kommen also wahrscheinlich durch die Aktivierung von hyperpolarisierenden, calciumabhängigen Kaliumkanälen zustande.

Beide Komponenten der NO-induzierten Dilatation waren vollständig durch ODQ, einen Inhibitor der löslichen Guanylatcyclase (sGC), hemmbar. Zwar ist ODQ nicht vollständig spezifisch für die sGC, aber die Versuche legen den Schluss nahe, dass in isolierten Widerstandsarterien des Hamsters die NO-induzierten Calciumabfälle und Dilatationen durch cGMP vermittelt werden.

Die Hypothese, dass der „Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor“ EDHF eine Cytochrom P450 abhängige gebildete Epoxyeicosatriensäure (EET) ist, wurde inzwischen durch eine ganze Reihe von pharmakologischen und molekularbiologischen Experimenten untermauert. Allerdings kann auch NO, wie oben beschrieben, glatte Gefäßmuskelzellen durch Hyperpolarisation relaxieren und der Beitrag von EDHF zur agonisteninduzierten Dilatation hängt vom untersuchten Stromgebiet, der Spezies und vor allem der Gefäßgröße ab. Welche Rolle EDHF in den Widerstandsgefäßen des Kreislaufs spielt und über welche zellulären Mechanismen die Wirkungen von EDHF vermittelt werden, ist noch nicht abschließend geklärt. Daher sollten im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die Wirkmechanismen von EDHF an isolierten, kleinen Widerstandsarterien charakterisiert werden und mit denen des zuvor untersuchten NO verglichen werden.

Während auch bei hohen Dosen von NO ein nur transienter Ca^{2+} -Abfall beobachtet wurde, löste EDHF einen lang anhaltenden Ca^{2+} -Abfall unter das Ausgangsniveau aus. Der EDHF-induzierte Ca^{2+} -Abfall und die

Dilatation wurden durch ODQ, einen Inhibitor der löslichen Guanylatcyclase, nicht beeinflusst. Während die NO-induzierten Dilatationen im Modell der isolierten Widerstandsarterie des Hamsters vermutlich ausschließlich durch cGMP vermittelt werden, sind die Effekte von EDHF cGMP-unabhängig.

Die beobachteten Effekte von NO und EDHF unterscheiden sich in diesem Modell also grundlegend, denn sie haben verschiedene Charakteristiken und werden durch die Aktivierung von zwei unterschiedlichen Signalketten vermittelt.

8. Literaturverzeichnis

Andriantsitohaina R, Lagaud GJ, Andre A, Muller B, Stoclet JC (1995) Effects of cGMP on calcium handling in ATP-stimulated rat resistance arteries *Am J Physiol Mar*; **268(3 Pt 2):H1223-31**

Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK (1994) Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A Aug 2*; **91(16):7583-7**

Bayliss WM (1919) On the local reaction of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol. Lond* **28**, 220-231

Bény JL, Brunet PC, (1988) Neither nitric oxide nor nitroglycerin accounts for all the characteristics of endothelially mediated vasodilatation of pig coronary arteries. *Blood Vessels* **25**, 308-11

Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* **368**, 850-3

Bolton TB, Lang RJ, Takewaki T (1984) Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *J Physiol Jun*; **351:549-72**

Bolz SS, de Wit C, Pohl U (1999) Endothelium-derived hyperpolarizing factor but not NO reduces smooth muscle Ca^{2+} during acetylcholine-induced dilation of microvessels. *Br. J. Pharmacol.* **128**, 124-34

Bolz SS, Fisslthaler B, Pieperhoff S, De Wit C, Fleming I, Busse R, Pohl U (2000) Antisense oligonucleotides against cytochrome P450 2C8 attenuate EDHF-mediated Ca^{2+} changes and Dilatation in isolated resistance arteries. *FASEB J.* **2**, 255-60

Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR (1996) Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ. Res.* **78(3)**, 415-23

Campbell WB, Harder DR (1999) Endothelium-derived hyperpolarizing factors and vascular cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the regulation of tone. *Circ Res.* **84(4)**, 484-8

Carrier GO, Fuchs LC, Winecoff AP, Giulumian AD, White RE (1997) Nitrovasodilators relax mesenteric microvessels by cGMP-induced stimulation of Ca-activated K channels. *Am J Physiol Jul*; **273(1 Pt 2):H76-84**

Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP (2000) Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J. Cell. Physiol.* **184(3)**, 409-20

Chataigneau T, Feletou M, Duhault J, Vanhoutte PM (1998) Epoxyeicosatrienoic acids, potassium channel blockers and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. *Br. J. Pharmacol.* **123(3)**, 574-80

Chen G, Suzuki H, Weston AH (1988) Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol Dec*; **95(4):1165-74**

Chitaley K, Webb RC (2002) Nitric oxide induces dilation of rat aorta via inhibition of rho-kinase signaling. *Hypertension* **39(2 Pt 2):438-42**

Cohen RA, Plane F, Najibi, S, Huk, I, Malinski T, Garland CJ (1997) Nitric Oxide is the mediator of both endothelium dependent relaxation and hyperpolarization of the rabbit carotid artery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **94**, 4193-4198

Cohen RA, Weisbrod RM, Gericke M, Yaghoubi M, Bierl C, Bolotina VM (1999) Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and inhibition of store-operated Ca²⁺ influx. *Circ Res.*, **84**, 210-9

Cowan CL, Cohen RA (1991) Two mechanisms mediate relaxation by bradykinin of pig coronary artery: NO-dependent and -independent responses. *Am. J. Physiol*, **261**, H830-5

de Wit C, von Bismarck P, Pohl U (1994) Synergistic action of vasodilators that increase cGMP and cAMP in hamster cremaster microcirculation. *Cardiov. Res.* **28**, 1513-1518

de Wit C, Esser N, Lehr H, Bolz SS, Pohl U (1999) Pentobarbital-sensitive EDHF mediates ACh-induced arteriolar dilation in the hamster microcirculation. *Am J. Physiol.*, **276**, H1527-1534

Dimmeler S, Lottspeich F, Brune B (1992) Nitric oxide causes ADP-ribosylation and inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **267**, 16771-4

Edwards, G, Dora, KA, Gardener, MJ, Garland, CJ & Weston, AH (1998) K^+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* **396**, 269-272

Feelisch M, Kotsonis P, Siebe J, Clement B, Schmidt HH (1999) The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a]quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. *Mol Pharmacol Aug*; **56(2)**:243-53

Feletou M, Vanhoutte PM (1988) Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol Mar*; **93(3)**:515-24

Feletou M, Vanhoutte PM (1999) The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization. *J Physiol Pharmacol*. **50(4)**, 525-34

Fisher AB, Chien S, Barakat AI, Nerem RM (2001) Endothelial cellular response to altered shear stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **281(3)**, L529-33

Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, Busse R (1999) Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* **401**, 493-7

Fleming I, Busse R (1999) NO: the primary EDRF. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1**, 5-14

Fukao M, Mason HS, Britton FC, Kenyon JL, Horowitz B, Keef K (1999) Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J Biol Chem Apr 16*; **274(16)**:10927-35

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288** 5789, 373-6

Furukawa K, Ohshima N, Tawada-Iwata Y, Shigekawa M (1991) Cyclic GMP stimulates Na^+/Ca^{2+} exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. *J Biol Chem Jul 5*; **266(19)**:12337-41

Fürstenau M, Lohn M, Ried C, Luft FC, Haller H, Gollasch M (2000) Calcium sparks in human coronary artery smooth muscle cells resolved by confocal imaging *J. Hypertens.* **18(9)**, 1215-22

Garcia ML, Knaus HG, Munujos P, Slaughter RS, Kaczorowski GJ (1995) Charybdotoxin and its effects on potassium channels. *Am J Physiol Jul*; **269(1 Pt 1)**: C1-10

Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B (1995) Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.* **48(2)**, 184-8

Gong MC, Fujihara H, Walker LA, Somlyo AV, Somlyo AP (1997) Down-regulation of G-protein-mediated Ca²⁺ sensitization in smooth muscle. *Mol. Biol. Cell.* **8(2)**, 279-86

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **360**, 3440-3450

Hecker M, Bara AT, Bauersachs J, Busse R (1994) Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J. Physiol.* **481(Pt 2)**, 407-14

Hill MA, Falcone JC, Meininger GA (1990) Evidence for protein kinase C involvement in arteriolar myogenic reactivity. *Am J Physiol.* **259(5 Pt 2)**, H1586-94

Hou Y, Wang, JQ, Ramirez, J, Wang, PG (1999) Glyco-S-nitrosothiols: Sugar-SNAP, a new type of nitric oxide donor. *Methods in Enzymology* **301**: 242 – 249.

Huang AH, Busse R, Bassenge E (1988) Endothelium-dependent hyperpolarization of smooth muscle cells in rabbit femoral arteries is not mediated by EDRF (nitric oxide). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol Oct*; **338(4)**:438-42

Hwa JJ, Ghibaudi L, Williams P, Chatterjee M (1994) Comparison of Acetylcholine-dependent relaxation in large and small arteries of rat mesenteric vascular bed. *Am. J. Physiol.* **266**, H952-H958

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **24**, 9265-9.

Kauser K, Stekiel WJ, Rubanyi G, Harder DR (1989) Mechanism of action of EDRF on pressurized arteries: effect on K⁺ conductance. *Circ Res.*, **65(1)**, 199-204

Komalavilas P, Lincoln TM (1994) Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem Mar 25*; **269(12)**:8701-7

Komalavilas P, Lincoln TM (1996) Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. CyclicGMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J Biol Chem Sep 6*; **271(36)**:21933-8

Komori K, Lorenz RR, Vanhoutte PM (1988) Nitric oxide, ACh, and electrical and mechanical properties of canine arterial smooth muscle. *Am J Physiol* **255(1 Pt 2)**:H207-12

Lee MR, Li L, Kitazawa T (1997) Cyclic GMP causes Ca²⁺ desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem Feb 21*; **272(8)**:5063-8

MacDonald, JA, Borman, MA, Murányi, A, Somlyo, AV, Hartshorne, DJ, Haystead, TAJ (2001) Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **98**: 2419 – 2424

Matsui, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K. (1996) Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO Journal* **15**: 2208 - 2216

Mayer B, Brunner F, Schmidt K (1993) Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue *Biochem. Pharmacol.* **45(2)**, 367-74

Megson, I L (2000) Nitric oxide donor drugs. *Drugs of the Future* **25**: 701 - 715

Miller C (1995) The charybdotoxin family of K⁺ channel-blocking peptides. *Neuron*, **15**, 5-10

Mombouli JV, Bissiriou I, Agboton VD, Vanhoutte PM (1996) Bioassay of Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **221**, 484-488

Motulsky JM, Lennart AR (1987) Fitting curves to data using nonlinear regression: a practical and nonmathematical review *FASEB J.* **1**, 365-374

Mügge A, Lopez JAG, Piegros DJ, Breese KR, Heistadt DD (1991) Acetylcholine-induced vasodilation in rabbit hindlimb in-vivo is not inhibited by analogues of L-Arginine. *Am. J. Physiol.* **260**, H242-H247

Nagao T, Iliano S, Vanhoutte, PM (1992) Heterogenous distribution of endothelium dependent-relaxations resistant to NG-nitro-L-Arginine in rats. *Am. J. Physiol.* **263**, H1090-H1094

Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ, Lederer WJ. (1995) Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* **270**, 633-7

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-6.

Pfister SL, Falck JR, Campbell WB (1991) Enhanced synthesis of epoxyeicosatrienoic acids by cholesterol-fed rabbit aorta. *Am J Physiol.* **261(3 Pt 2)**, H843-52

Pfitzer G (2001) Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol.* 2001 Jul; **91(1)**:497-503

Pierzga JM, Segal SS (1994) Spatial relationships between neuromuscular junctions and microvessels in hamster cremaster muscle. *Microvasc Res.* **48(1)**, 50-67

Popp R, Bauersachs J, Hecker M, Flemming I, Busse R (1996) A transferable, β -naphthoflavone-inducible, hyperpolarizing factor is synthesized by native and cultured porcine coronary endothelial cells. *J Physiol Lond* **497**, 699-709

Porter VA, Bonev AD, Knot HJ, Heppner TJ, Stevenson AS, Kleppisch T, Lederer WJ, Nelson MT (1998) Frequency modulation of Ca^{2+} sparks is involved in regulation of arterial diameter by cyclic nucleotides. *Am J Physiol*; **274(5 Pt 1)**:C1346-55

Ruth P, Wang GX, Boekhoff I, May B, Pfeifer A, Penner R, Korth M, Breer H, Hofmann F (1993) Transfected cGMP-dependent protein kinase suppresses calcium transients by inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc Natl Acad Sci U S A Apr 1*; **90(7)**:2623-7

Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P, Loirand G (2000) Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca^{2+} sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem Jul 14*; **275(28)**:21722-9

Somlyo AP, Somlyo AV (2000) Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J. Physiol.* **522 Pt 2**, 177-85.

SoRelle R (1998) Nobel prize awarded to scientists for Nitric Oxide discoveries. *Circulation* **22**, 2365-2366

Taylor SG, Southerton JS, Weston AH, Baker JR (1988) Endothelium-dependent effects of acetylcholine in rat aorta: a comparison with sodium nitroprusside and cromakalim. *Br J Pharmacol Jul*; **94(3)**:853-63

Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A (1997) Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin Invest.* **100(11)**, 2793-9.

Wu, X, Somlyo, AV & Somlyo, AP (1996) Cyclic-GMP dependent stimulation reverses G-Protein coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **187**, 1517-1522

Woolfson RG, Poston L (1991) Effect of ouabain on endothelium-dependent relaxation of human resistance arteries. *Hypertension* **17(5)**, 619-25.

Zygmunt PM, Edwards G, Weston AH, Davis SC, Hogestatt ED (1996) Effects of cytochrome P450 inhibitors on EDHF-mediated relaxation in the rat hepatic artery. *Br J Pharmacol Jul*; **118(5)**:1147-52

9. Anhang: Publikationen / Kongressbeiträge

U. Pohl, M. Neininger, S. S. Bolz

“Endothelium Dependent Control of Smooth Muscle Calcium and Tone in Resistance Vessels” (Abstract)

(European Journal of Physiology, Supplement to Volume 433, No 6 [1997])

S. S. Bolz, M. Neininger, C. de Wit, U. Pohl

“NO Dependent Activation of K_{Ca} -Channels in Small Muscle Arteries is Mediated by Activation of Soluble Guanylate Cyclase” (Abstract)

(European Journal of Physiology, Supplement to Volume 433, No 6 [1997])

S. S. Bolz, J. Galle, S. Schwarz, M. Neininger, C. de Wit, U. Pohl

“nLDL Inhibits the NO- but not the EDHF-mediated Dilation in Isolated Small Muscle Arteries of the Hamster” (Abstract)

(European Journal of Physiology, Supplement to Volume 433, No 6 [1997])

S. S. Bolz, M. Neininger, C. de Wit, U. Pohl

“The NO Induced Activation of K_{Ca} -Channels in Small Skeletal Muscle Arteries is Dependent on the Activation of Soluble Guanylate Cyclase” (Abstract)

(Joint Meeting of the Benelux and German Microcirculation Societies 1997)

10. Tabellarischer Lebenslauf

	Persönliche Angaben:
	Familienstand: ledig
	Staatsangehörigkeit: deutsch
	Geburtsdatum: 18. Januar 1973
	Geburtsort: Ludwigsburg
	Eltern: Dipl.-Ing. Günter Neiningen Renate Neiningen
	E-mail: michael.neiningen@web.de
	Ausbildung
1979 -1983	Grundschule Ludwigsburg-Hoheneck
1983 -1992	Goethe Gymnasium Ludwigsburg
1992	Abitur mit den Leistungskursen Deutsch und Englisch
Nov. 92 – März 93	Zivildienst beim DRK Rettungsdienst Ludwigsburg als Rettungssanitäter
WS 93/94 – WS 99/00	Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg Universität Mainz
April 1996	Ärztliche Vorprüfung mit der Note "gut" (Prozent- rang: Unter den Besten 8,4% bundesweit)
SoSe 1996	Forschungssemester: Ca ²⁺ - Messungen an isolier- ten Arteriolen
WS 1996/1997	1. klinisches Semester
SoSe 1997	Forschungssemester: Membranpotential- messungen an isolierten Arteriolen
WS 97/98 – WS 02/03	Klinisches Studium
Sept. 1998	Erster Teil der Ärztlichen Prüfung; Note "gut" (Pro- zentrang: Unter den besten 7,0% bundesweit)

Sept. 1998 – Juni 1999	Teilnahme am BMEP (Biomedical Science Exchange Program) Academic Year Program
Sept. 1998 - März 1999	Teil I: Grundlagenforschung: "Gene Therapy for Myocardial Angiogenesis. Investigation of Bioactivity of pVG.1VEGF2 Plasmid DNA in a Porcine Modell of Myocardial Ischemia" Tutor: Dr. J. Isner, Tufts University, Boston
März 1999 - Juni 1999	Teil II: Clinical Rotations: Radiologie, Innere Medizin, Intensivmedizin, Notaufnahme (Emergency Medicine) an der Tufts University School of Medicine, Boston, USA
Juni 1999	Teilnahme am "Techniques in Molecular Biology Course" an der University of Maine, USA
Juli 1999 – Oktober 1999	Arbeit am Forschungsprojekt "Protein Kinase C and endothelial differentiation" am Mount Desert Island Biological Laboratory, Maine, USA mit Prof. Dr. H. Haller
Okt. 1999 – Nov. 2002	Klinisches Studium an der LMU München
August 2001	Zweites Staatsexamen (Noten: schriftlich "gut", mündlich "sehr gut")
Nov. 2001 – Feb. 2002	Praktisches Jahr, Terial Innere Medizin, University of Newcastle upon Tyne, UK
Feb. 2002 – Mai 2002	Praktisches Jahr, Terial Chirurgie, Kantonsspital Chur, Schweiz
Mai 2002	Teilnahme am EMBO Kurs „Advanced Techniques in Molecular Medicine“, Uppsala, Schweden
Mai 2002 – Sept. 2002	Praktisches Jahr, Terial Anästhesie, LMU München
15. November 2002	3. Staatsexamen, Note „Sehr gut“, Gesamtnote „Sehr gut“

Feb. 2003 - Feb. 2004

Pre-Registration House Officer Rotation,
University of Cambridge School of Medicine, UK

Seit Februar 2004

Pre-Registration House Officer Rotation,
Glasgow Royal Infirmary, UK

Stipendien

1997

Dissertationsstipendium der Universität Mainz

1998

Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes DAAD für Teilnahme am Biomedical Sciences Exchange Program BMEP

1999

Stipendium des Boehringer Ingelheim Fonds für Teilnahme am "Techniques in Molecular Biology Course" an der University of Maine, USA

Dissertation

seit April 1996

"Zelluläre Mechanismen der Dilatation isolierter Widerstandsarterien durch NO-Donatoren und den Endothelabhängigen Hyperpolarisierenden Faktor" bei Prof. Dr. med. U. Pohl, Physiologisches Institut der Ludwig-Maximilians Universität München

Famulaturen

Feb. 1998 - April 1998

Cardiology, University of Cambridge, School of Clinical Medicine, UK

	Berufliche Tätigkeiten neben dem Studium
seit 1994	Tätigkeit als Rettungsanitäter
1997 - 1999	Dozent in der Rettungsdienst-Aus- und Fortbildung
1997 - 1998	Dozent in der Hebammenausbildung an der Universität Mainz
März 2000 – April 2001	Werkstudent bei der Vereinten Krankenversicherung AG, Abteilung Gesundheitsmanagement, "Modellprojekt Diabetes"
Oktober 2001	Werkstudent bei "Oncology World GmbH", München
	Hobbies
seit 1991	Privatpilotenlizenz C (Segelflugzeuge) und B (Motorsegler)

11. Danksagung

Bei Herrn **Prof. Dr. med. U. Pohl** möchte ich mich sehr herzlich für die Vergabe des interessanten Themas und die Betreuung bei der Anfertigung dieser Dissertation bedanken.

Dr. med. Steffen-Sebastian Bolz gilt mein besonderer Dank für die sehr engagierte und außerordentlich kompetente Betreuung der vorliegenden Arbeit. Er hat meinen anfangs eher phänomenologisch geprägten Enthusiasmus („Was passiert, wenn ...“) in wissenschaftliche Bahnen gelenkt und geduldig (fast) alle meine Unzulänglichkeiten ertragen. Die Gespräche mit ihm und seine Anregungen haben mir so manche neue, unerwartete und faszinierende Perspektive eröffnet.

„Last but not least“ möchte ich mich an dieser Stelle ganz besonders bei meinen Eltern, **Dipl.-Ing. Günter und Renate Neining**, bedanken. Ihr Engagement und ihre Unterstützung haben mir das Medizinstudium, viele weitere Aktivitäten (wie z. B. die Teilnahme am BMEP-Programm) und die Anfertigung der vorliegenden Arbeit ermöglicht. Ihnen möchte ich diese Dissertation widmen.

“Two ways in the forest. I chose the one less travelled and it changed my life” (Robert Frost)

Ludwigsburg, im Mai 2004