

Aus dem Physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

EDHF initiiert fortgeleitete Gefäßdilatationen in Arteriolen des Skelettmuskels

Dissertation

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

vorgelegt von

Bernd Höpfl

aus

Heilbronn

München 2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

2. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Fichtl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. C. Hammer

Prof. Dr. H. Bartels

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

PD Dr. med. Cor de Wit

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. Klaus Peter

Tag der mündlichen Prüfung:

17. Februar 2005

Inhaltsübersicht

1	Einleitung	6
1.1	Physiologischer Hintergrund	6
1.2	Mikrozirkulation	7
1.3	Bekannte Eigenschaften fortgeleiteter Vasomotorantworten	15
1.4	Fragestellungen	18
1.4.1	Arteriöläre Druckmessung	18
1.4.2	Flussabhängige Komponente fortgeleiteter Vasomotorantworten	18
1.4.3	Auswirkungen der Pentobarbital-Narkose	18
1.4.4	Rolle endothelialer Autakoide bei fortgeleiteten Acetylcholinantworten	19
1.4.5	Ort der EDHF-Wirkung	19
1.4.6	Beeinflussung der Fortleitung durch NO	19
2	Material und Methode	20
2.1	Versuchsvorbereitung und Präparation	20
2.1.1	Narkoseeinleitung, Katheterisierung und Beatmung	20
2.1.2	Aortenmanschette und Femoraliskatheter	21
2.1.3	Präparation des Musculus cremaster	22
2.1.4	Narkose	23
2.2	Versuchsaufbau	24
2.2.1	Mikroskop und Anbauten	24
2.2.2	Superfusionssystem	25
2.2.3	Applikationswege zu untersuchender Substanzen	26
2.2.4	Mikropipetten	26
2.3	Messung und Aufzeichnung der Messwerte	27
2.3.1	Arterieller Druck und Herzfrequenz	27
2.3.2	Erythrozytenflussgeschwindigkeit und Schergrad	27
2.3.3	Arteriöläre Druckmessung	27
2.3.4	Gefäßdurchmesserbestimmung	28
2.3.5	Datenaufzeichnung	28
2.4	Versuchsprotokolle	29
2.4.1	Arteriöläre Druckmessung	29
2.4.2	Versuche zu fortgeleiteten Antworten	31
2.4.3	Lokalisierte Applikation von Acetylcholin	32
2.4.4	Lokalisierte Applikation von Nitroprussid, Phenylephrin und Kaliumchlorid	32
2.4.5	Untersuchung von potentiellen Änderungen der Wandschubspannung während fortgeleiteter Dilatationen	32
2.4.6	Hemmung der NO-Synthase und Cyclooxygenase	33
2.4.7	Cytochrom P450 2C8/9-Hemmung durch Sulfaphenazol	33
2.4.8	Lokalisierte Hemmung von K_{Ca} -Kanälen durch Iberiotoxin und Charybdotoxin	33
2.4.9	Wirkung von exogenem NO auf fortgeleitete ACh-Dilatationen	34

2.5	Datenverarbeitung	35
2.5.1	Versuchsdatei und Einzelbeobachtung	35
2.5.2	Zusammenfassung und Normalisierung	35
2.5.3	Statistik und Abbildungen	36
2.6	Verwendete Chemikalien und Lösungen	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Arteriöläre Druckmessung	38
3.2	Lokalisierte Applikation von Vasodilatoren	41
3.2.1	Acetylcholin	41
3.2.2	Nitroprussid-Natrium	42
3.3	Lokale Applikation von Vasokonstriktoren	44
3.3.1	Kaliumchlorid	44
3.3.2	Phenylephrin	46
3.3.3	Kontrolle mit Mikroinjektion von NaCl-Lösung	47
3.4	Potentielle Änderungen des Schergrades während fortgeleiteter Vasodilatationen	48
3.5	Hemmung der NO-Synthase und Cyclooxygenase	50
3.5.1	Pentobarbitalnarkose	50
3.5.2	Neuroleptnarkose	52
3.6	Cytochrom P450 2C8/9-Hemmung durch Sulfaphenazol	54
3.7	Lokalisierte Hemmung von K_{Ca} -Kanälen durch Iberiotoxin und Charybdotoxin	56
3.8	Wirkung von NO auf die Fortleitung von Acetylcholin-Antworten	60
4	Diskussion	62
5	Zusammenfassung	74
6	Literatur	76
7	Lebenslauf	82
8	Danksagung	84

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
ChTX	Charybdotoxin
COX	Cyclooxygenase
DAG	Diacylglycerin
EDHF	endothelialer hyperpolarisierender Faktor (endothelium-derived hyperpolarizing factor)
EFG	Erythrozytenflussgeschwindigkeit
GTP	Guanosintriphosphat
IbTX	Iberiotoxin
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K _{Ca} -Kanal	kalziumabhängiger Kaliumkanal
KCl	Kaliumchlorid
L-NA	N ^ω -nitro-L-arginin
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	(endotheliale) NO-Synthase
PG	Prostaglandin(e)
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
ROC	rezeptorabhängige Kalziumkanäle (receptor operated calcium channels)
SG	Schergrad
SNP	Nitroprussid-Natrium (sodium nitroprusside)
TRPC	zuerst in Drosophila-Spezies beschriebener Kationenkanal der Zellmembran (transient receptor potential channel)

1 Einleitung

1.1 Physiologischer Hintergrund

Ein funktionierender Blutkreislauf ist unentbehrlich für einen komplexen Organismus wie den eines Säugetieres. Er führt den Geweben Sauerstoff, Substrate und humorale Signale zu, transportiert CO₂ und Metabolite ab, und dient durch die Verteilung von Antigenen, Antikörpern und Immunzellen der Immunabwehr. Um ausreichend und energiesparend zu funktionieren und dabei den stark schwankenden Ansprüchen von Geweben, Organen und des Gesamtorganismus gerecht zu werden, ist es notwendig das nur in bestimmten Grenzen variable Herzzeitvolumen optimal im Organismus aufzuteilen. Dies wird im Rahmen von Krankheitsprozessen wie Sepsis oder akuten allergischen Reaktionen deutlich, in denen diese Regulation gestört ist. Wird das Herzzeitvolumen nicht mehr kontrolliert verteilt, weil der Gefäßtonus aufgehoben wurde, kann dies zu kritischem Blutdruckabfall und komplettem Versagen des Kreislaufs führen.

Um seiner komplexen Aufgabe gerecht zu werden, unterliegt das Herz-Kreislaufsystem zentralen und peripheren Steuerungsmechanismen. Herzleistung, peripherer Widerstand und Blutvolumen werden zentral durch das vegetative Nervensystem und eine Vielzahl von Hormonen reguliert, während periphere Mechanismen von der Autoregulation der Durchblutung einzelner Organe durch die myogene Antwort der Gefäßmuskulatur bis zur Kontrolle des Tonus einzelner Arteriolen der Mikrozirkulation durch endotheliale Autakoide und Gewebismetabolite reichen.

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit beziehen sich vor allem auf einen Regulationsmechanismus auf arteriolärer Ebene. Es interessierte, wie der Gefäßtonus in einzelnen Arterien und Arteriolen reguliert wird, und wie das Verhalten von benachbarten und hintereinander geschalteten Arteriolen zu einer sinnvollen Gesamtantwort koordiniert wird. Als spezielle Fragestellung wurden elektrotonisch fortgeleitete Gefäßreaktionen an Arteriolen der Skelettmuskel-Mikrozirkulation mittels Intravitalmikroskopie am Musculus cremaster des Goldhamsters untersucht.

1.2 Mikrozirkulation

Im Skelettmuskel schwanken der Arbeitszustand und damit die Stoffwechselaktivität in einem sehr breiten Bereich. Dies bedingt einen sehr veränderlichen Bedarf an Durchblutung - im aktiven Muskel kann der Blutfluss auf das 10- bis 50-fache des Ruhewertes ansteigen (Segal & Kurjiaka, 1995).

Gefäßwiderstand und Blutfluss

Der Blutfluss (I) in einem Stromgebiet wird nach dem Ohmschen Gesetz $I = U / R$ durch zwei Größen bestimmt, dem Druckunterschied (U) zwischen der arteriellen und venösen Seite und dem Strömungswiderstand (R).

Da der arterielle Blutdruck unter physiologischen Umständen maximal verdoppelt wird, und der venöse Druck unter Belastung eher ansteigt, beruht eine Änderung der Durchblutung vor allem auf der Fähigkeit von arteriellen Gefäßen, den Strömungswiderstand zu verändern. Der permanent vorhandene Anspannungszustand (Tonus) der glatten Muskulatur der Gefäßwand kann zu- oder abnehmen, was den Gefäßdurchmesser vergrößert (Vasodilatation) oder verringert (Vasokonstriktion). Durchmesseränderungen wirken sich dabei nach dem Hagen-Poiseuille Gesetz $R = (8 \cdot \eta \cdot l) / (\pi \cdot r^4)$ in der 4. Potenz auf den Widerstand (R) aus (η Viskosität, l Gefäßlänge). So kann der Widerstand und damit der Blutfluss in einem Gefäßabschnitt durch Änderung des Gefäßradius extrem variiert werden. Dies macht eine sehr feine Steuerung des Gefäßtonus notwendig. Die Zellen der Gefäßwand, Endothelzellen und glatte Muskelzellen, haben dabei nicht nur eine ausführende, sondern auch eine steuernde Funktion.

Endothel

Das Endothel kleidet als einlagige Schicht von ca. 140 μm langen und 7 μm breiten, längsorientierten Zellen die Innenseite aller Gefäße und des Herzens aus (Haas & Duling, 1997). Durch seine Lage zwischen Blut und Gefäßwand kommt ihm im Kreislaufsystem eine besondere Rolle zu. Es interagiert einerseits mit den zellulären und humoralen Komponenten des Blutes und beeinflusst wesentlich Thrombozytenaggregation, Blutgerinnung und Leukodiapedese (Durchwanderung der Gefäßwand durch Leukozyten). Andererseits trägt es durch Abgabe von parakrin wirkenden, vasoaktiven Substanzen (Autakoide) wesentlich zur Kontrolle des

Gefäßtonus bei. Es ist zudem in der Lage, den Blutfluss im Gefäß indirekt über die Wandschubspannung zu erfassen und die Autakoidabgabe dieser anzupassen (Furchgott & Zawadzki, 1980; Palmer *et al.*, 1987; Rubanyi *et al.*, 1986; Quilley *et al.*, 1997; de-Wit *et al.*, 1993; de-Wit *et al.*, 1997; Davies *et al.*, 1988).

Endothelzellen sind sowohl untereinander als auch mit den sie umgebenden glatten Muskelzellen über Gap-Junctions (Nexus, s.u) gekoppelt (Little *et al.*, 1995).

Endotheliale Autakoide

Unter physiologischen Bedingungen bilden Endothelzellen kontinuierlich verschiedene Autakoide, vor allem Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandin I₂ (PGI₂ / Prostacyclin) und einen hyperpolarisierenden Faktor (Endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF), dessen chemische Identität je nach Gefäßgebiet und Spezies unterschiedlich ist (s.u.). Diese basale Produktion kann durch physiologische Reize, wie erhöhte Wandschubspannung oder pulsatilem Druck, und durch pharmakologische Stimulation deutlich gesteigert werden. Am besten untersucht ist in letzterer Hinsicht der Neurotransmitter Acetylcholin (ACh).

Nach Tierspezies, Gefäßbett und Gefäßkaliber kann der Anteil dieser Mediatoren an der endothelialen Autakoidproduktion erheblich schwanken. Um die Rolle von NO, Prostacyclin und EDHF am Hamstercremaster weiter zu untersuchen, wurde deren Synthese bzw. Wirkung durch Blockade von Enzymen, Rezeptoren oder Membrankanälen gehemmt, und dann die Wirkung von Acetylcholin auf Arteriolen untersucht.

NO-Bildung und –Wirkung

Acetylcholin stimuliert Endothelzellen über die Bindung an einen membranständigen muskarinergen Rezeptor (M₃). Dieser aktiviert über ein G-Protein die membranständige Phospholipase C, welche das Phospholipid PIP₂ in die Second-messenger IP₃ und DAG spaltet. IP₃ führt nach Bindung an den IP₃-Rezeptor des endoplasmatischen Retikulums zu intrazellulärer Kalziumfreisetzung. Zum Anstieg des Kalzium-Spiegels und zur Wiederauffüllung intrazellulärer Kalziumspeicher trägt ausserdem wesentlich ein Kalziueinstrom aus dem Extrazellularraum über bisher wenig charakterisierte Zellmembrankanäle (receptor operated calcium channels, ROC / transient receptor potential channels, TRPC) bei. Der extrazelluläre Kalzium-Einstrom wird wie bei glatten Muskelzellen durch das Membranpotential beeinflusst. Da Endothelzellen keine spannungsabhängigen Kalziumkanäle besitzen, verhält sich dies jedoch

umgekehrt wie bei glatten Muskelzellen: Hyperpolarisation erhöht den elektrochemischen Gradienten für Kalzium und es strömt verstärkt in die Zelle ein.

An Calmodulin gebundenes Kalzium aktiviert die endotheliale NO-Synthase (eNOS / NOS III) (Busse *et al.*, 1991), welche im Zytosol aus L-Arginin NO synthetisiert (Palmer *et al.*, 1988). NO diffundiert transmembranär ins Zytosol der glatten Muskelzellen und stimuliert dort die lösliche Guanylatzyklase, welche GTP zum Second-messenger cGMP umformt. cGMP aktiviert dann eine cGMP-abhängige Proteinkinase (cGKI), welche verschiedene Zielproteine phosphorylieren kann. Dies führt über verschiedene Mechanismen zu einem Absinken des intrazellulären Kalziumspiegels und einer Kalzium-Desensitivierung des kontraktilen Apparates (Schlossmann *et al.*, 2003) der glatten Muskelzelle und damit zur Relaxation.

Prostacyclin-Bildung und –Wirkung

Die Prostacyclin-Synthese in den Endothelzellen wird ebenfalls durch einen Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels in Gang gesetzt und beginnt mit der Abspaltung von Arachidonsäure aus Phospholipiden durch die Ca^{2+} -abhängige Phospholipase A_2 . Dies ist der syntheseslimitierende Schritt. Die Cyclooxygenase wandelt Arachidonsäure in Prostaglandin H_2 um, aus dem die Prostaglandin I_2 -Synthase Prostaglandin $\text{I}_2 =$ Prostacyclin synthetisiert. Nach Diffusion über die Endothelzellmembran und Bindung an den membranständigen, G-Proteingekoppelten IP -Rezeptor der glatten Muskelzelle (Smyth & FitzGerald, 2002) aktiviert es dort die Adenylatzyklase, welche aus ATP den Second-messenger cAMP synthetisiert. Dieser aktiviert die Proteinkinase A, welche über die Phosphorylierung unterschiedlicher Zielproteine die Relaxation der glatten Muskelzelle bewirkt (Shaul *et al.*, 1992).

Endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF

Neben der Bildung von NO und PGI_2 gibt es mindestens einen weiteren Mediator oder Mechanismus, der als Antwort auf eine Vielzahl von Stimuli eine endothelabhängige Vasodilatation vermittelt. Dieser bewirkt durch Öffnung kalziumabhängiger Kaliumkanäle (K_{Ca}) in Gefäßzellen eine Hyperpolarisation glatter Muskelzellen, was über eine verringerte Öffnungswahrscheinlichkeit spannungsabhängiger Kalziumkanäle zur Abnahme der zytosolischen Kalziumkonzentration führt und so die Muskelzellen relaxiert. In der Annahme, dass es sich dabei wie um einen diffusiblen, parakrin wirkenden Mediator handelt, wurde er als endothelialer hyperpolarisierender Faktor oder Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) bezeichnet.

Der Mechanismus der EDHF-induzierten Dilatation und der Anteil von EDHF an der endothelabhängigen Vasodilatation kann je nach Stimulus, Spezies, Gefäßbett und Gefäßgröße variieren. So ist EDHF in kleinen Arterien und Arteriolen der Mikrozirkulation von großer Bedeutung, während er in großen Leitungsarterien wie der Aorta keine Rolle zu spielen scheint. Während die Befunde einiger Autoren darauf hinweisen, dass für die EDHF-Wirkung kein diffusibler Faktor sondern die Zellkopplung zwischen Endothel und glatten Muskelzellen verantwortlich ist (Review siehe (Griffith, 2004)), sprechen eine Reihe anderer Untersuchungen für in-vivo geschlossene interzelluläre Verbindungen zwischen Endothel und glatter Muskulatur und für einen diffusiblen Faktor. Die chemische Struktur dieses diffusiblen Faktors ist noch nicht abschließend geklärt, vermutlich existieren abhängig von Spezies, Organ und Stimulus unterschiedliche EDHF (Review siehe (Quilley *et al.*, 1997)). In vielen Gefäßbetten weisen die Ergebnisse auf Derivate der Arachidonsäure, Epoxy-Eicosatriensäuren (EET), als EDHF hin, welche durch eine Cytochrom P450-Epoxygenase gebildet werden (Hecker *et al.*, 1994). In Schweine-Koronararterien und Hamster-Skelettmuskelwiderstandsgefäßen wurde das Isoenzym CYP 2C8/9 als EDHF-Synthase identifiziert (Fisslthaler *et al.*, 1999; de-Wit *et al.*, 1999; Bolz *et al.*, 2000).

Glatte Muskelzellen

Das Endothel wird von zirkulär verlaufenden, 80 – 150 µm langen und ca. 8 µm breiten glatten Muskelzellen umgeben. Bei Arterien bilden sie in mehreren Schichten die Gefäßmedia, in Arteriolen liegen sie z.T. nur einschichtig vor. Wie bei quergestreiften Muskelzellen wird der Kontraktionszustand über die zytoplasmatische Konzentration von Kalzium gesteuert, wobei jedoch nicht Troponin, sondern Calmodulin und die Myosinleichtketten-Kinase (MLCK) als Kalzium-Sensoren dienen. Die Myosinleichtketten-Kinase aktiviert durch Phosphorylierung des Myosins dessen ATPase-Aktivität und ermöglicht so die Myosin-Aktin-Interaktion. Dephosphorylierung durch die Myosinphosphatase beendet die ATPase-Aktivität des Myosins wieder.

Wie Endothelzellen sind glatten Muskelzellen untereinander über Gap-Junctions gekoppelt und so prinzipiell in der Lage in radialer (v.a. in Arterien mit mehreren Muskelzellschichten) und longitudinaler Richtung miteinander zu kommunizieren (Little *et al.*, 1995).

Gap-Junctions

Gap-Junctions sind fleckförmige Zellverbindungen, die aus einer dichten Ansammlung von integralen Membranproteinen (Connexone) bestehen. Ein Connexon ist ein Ring aus 6 gleichartigen Protein-Untereinheiten (Connexine) um eine zentrale Pore. Connexone gegenüberliegender Zellmembranen verbinden sich dabei zu einer wasserhaltigen, interzellulären Verbindung mit einem funktionellen Durchmesser von ca. 1,5 nm, durch die relativ unselektiv Ionen und Moleküle bis zu einer Masse von ca. 1000 Dalton diffundieren können (Kumar & Gilula, 1996). Durch ihren niedrigen elektrischen Widerstand erlauben sie die Ausbreitung von Membranpotentialänderungen zwischen Zellen und sorgen so für die elektrische Kopplung von Zellverbänden. Sie sind die molekulare Grundlage für die Bildung von Synzytien, wie dem Herzmuskelgewebe und glattem Muskel vom Single-unit-Typ. Die glatte Muskulatur der Gefäße kann zum Teil ebenfalls als Synzytium betrachtet werden (Beny, 1999).

Mikrozirkulation und aufsteigende Vasodilatation

Die zwischen den kleinen Arterien und Venen liegenden Gefäßabschnitte werden zusammen mit den dazugehörigen Lymphgefäßen als Mikrozirkulation bezeichnet. Nach ihrem Durchmesser lassen sich die Blutgefäße dieses Abschnittes in Arteriolen (40-100 μm), terminale Arteriolen (8-40 μm) und Kapillaren (4-8 μm) einteilen, an welche sich postkapilläre Venolen (8-30 μm) und Venolen (30-50 μm) anschließen.

Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit waren die Arteriolen und terminalen Arteriolen der Skelettmuskulatur. Ihnen kommt bei der Steuerung der Durchblutung eines Gewebes bzw. des Muskels eine besondere Bedeutung zu, da in diesem Abschnitt 45-60 % des arteriellen Gefäßwiderstandes liegen, weshalb sie auch als Widerstandsgefäße bezeichnet werden, und diese Gefäße im, oder nahe am, zu versorgenden Gewebe liegen. Daher können sie bei Stoffwechselveränderungen durch einen Konzentrationsanstieg von Metaboliten und einen Abfall des Sauerstoffpartialdruckes und pH-Wertes direkt beeinflusst werden. Diese Stoffe bzw. Veränderungen können die Blutversorgung eines Skelettmuskelabschnittes somit in Abhängigkeit von dessen Stoffwechselaktivität beeinflussen.

Dabei stellt sich allerdings ein Problem: Der arterielle Gesamtwiderstand eines Gefäßbaumes ergibt sich aus der Summe der hintereinander geschalteten Widerstände seiner verschiedenen Abschnitte (Kirchhoffsche Regeln: $R = R_1 + R_2 + R_3 \dots$), vereinfacht $R_{\text{gesamt}} = R_{\text{vorgeschaltete Gefäße}} + R_{\text{intramuskuläre Arteriolen}}$. Da in den intramuskulären Arteriolen der Mikrozirkulation nur ca. 50% des

Gefäßwiderstandes liegt (Segal & Duling, 1986a), sind sie bei maximaler Dilatation nur in der Lage den Gesamtwiderstand zu halbieren und damit den Blutfluss maximal zu verdoppeln. Da aber wesentlich höhere Zunahmen der Stromstärke gemessen werden, ergibt sich daraus, dass den Arteriolen vorgeschaltete Gefäße, die nicht direkt vom Stoffwechsel des versorgten Gebietes beeinflusst werden, ebenfalls dilatieren müssen, um eine entsprechend hohe Zunahme der Gesamtleitfähigkeit eines Gefäßbaumes zu erreichen.

Segal und Duling haben diesen als aufsteigende Vasodilatation bezeichneten Vorgang eindrücklich am Cremaster- und Gracilismuskel des Hamsters demonstriert (Segal & Duling, 1986a). Der Mikrozirkulation vorgeschaltete kleine Arterien hatten einen Basaltonus und konnten bei verschiedenen Stimulationen im distalen Stromgebiet (Stimulation des motorischen Nervens, Acetylcholin- / Adenosin-Superfusion, 5 min Ischämie) deutlich dilatieren. Sie erhöhten dabei ihre Leitfähigkeit auf das 2- bis 4-fache. Lash berichtete über vergleichbare Ergebnisse am Spinotrapeziusmuskel der Ratte. Dort lag der Widerstand des Muskelstromgebietes zu ca. 40% stromauf des Muskels, 50% in den Arteriolen und zu 10% auf der venösen Seite. Unter funktioneller Hyperämie fiel der Widerstand der arteriellen Gefäße sowohl stromauf als auch im Muskel auf ca. 1/10 des Ruhewiderstandes ab (Lash, 1994).

Wie das Verhalten proximaler und distaler Gefäßabschnitte so koordiniert wird, dass eine aufsteigende Vasodilatation resultiert, ist noch nicht vollständig geklärt. Es wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, die abhängig von Stromgebiet und Kaliber der Arterien bzw. Arteriolen in unterschiedlicher Gewichtung dazu beitragen können.

Flussabhängige Vasodilatation

Die am längsten bekannte Möglichkeit, aufsteigende Vasodilatation zu erklären, wurde 1933 von Schretzenmayr beschrieben, der beobachtete, dass Leitungsarterien bei Erhöhung des Flusses dilatieren. In arteriellen Gefäßen führt die Dilatation nachgeschalteter Stromabschnitte bei erhöhter Arbeit zu einem Anstieg der Blutflussgeschwindigkeit, was eine Erhöhung der Wandschubspannung bedingt, der tangential auf das Endothel wirkenden Scherkraft. Endothelzellen werden dadurch stimuliert, mehr vasodilatierende Autakoide, vor allem NO und Prostaglandine, zu produzieren, welche die glatten Muskelzellen der benachbarten Gefäßmedia relaxieren (Rubanyi *et al.*, 1986; Pohl *et al.*, 1993; Griffith *et al.*, 1987). Dieser Mechanismus spielt nicht nur in Leitungsarterien eine Rolle, sondern auch in den Arteriolen der Mikrozirkulation (de-Wit *et al.*, 1997).

Veno-arterielle Diffusion

Aufsteigende Vasodilatation könnte zum Teil auch durch die Wirkung von Metaboliten zustande kommen, welche durch Venolen abtransportiert werden und dabei zu parallel verlaufenden Arteriolen diffundieren. Hester hat 1990 gezeigt, dass Infusion von Adenosin in eine Venole zu einer deutlichen Dilatation begleitender Arteriolen führt (Hester, 1990). Da aufsteigende Vasodilatation aber auch beobachtet werden kann, wenn keinerlei parallel verlaufende Venen vorhanden sind, kann veno-arterielle Diffusion die aufsteigende Dilatation nicht vollständig erklären.

Fortgeleitete Gefäßreaktionen

Wie präzise der Tonus von Widerstandsgefäßen gesteuert wird, zeigten Berg und Sarelius. Sie haben als kleinste funktionelle Durchblutungseinheit im Hamstercremaster das Kapillarmodul beschrieben. Dies ist eine Gruppe von Kapillaren, deren Durchblutung von einer gemeinsamen terminalen Arteriole gesteuert wird, und umfasst circa eine Fläche von $16.000 \mu\text{m}^2$ (entspricht $126 \times 126 \mu\text{m}$) mit einer Gesamtkapillarlänge von $200 \mu\text{m}$. Gleichartige Kapillareinheiten wurden auch an anderen Muskeln beschrieben (Berg & Sarelius, 1995). Wurde eine kleine Gruppe von Skelettmuskelfasern elektrisch zur Kontraktion gereizt, kam es in dem diese Fasern versorgenden Modul zu einer Flusserrhöhung durch Dilatation der dem Modul vorgeschalteten Arteriolen bis zur dritten Generation stromauf. Benachbarte Module und deren zugehörige Arteriolen zeigten keine Flusszunahme oder Dilatation. Die arterioläre Dilatation konnte nicht durch einen Anstieg der Wandschubspannung erklärt werden und war nicht durch den Natrium-Kanal Blocker Tetrodotoxin blockierbar, während Gap-Junction-entkoppelnde hochmolekulare Sucrose-Lösung (600mosM) die aufsteigende Dilatation in diesen Versuchen unterbrach (Berg *et al.*, 1997).

Die Präzision der Gefäßreaktion und das Ansprechen auf einen Gap-Junction Entkoppler weisen auf einen weiteren in-vivo wirkenden Koordinationsmechanismus zwischen Gefäßabschnitten hin: elektrotonisch fortgeleitete Gefäßreaktionen. Fortgeleitete Gefäßreaktionen / Vasomotorantworten (engl. conducted vasomotor responses) lassen sich experimentell eindrucksvoll demonstrieren, indem vasoaktive Substanzen lokalisiert an ein Gefäß gegeben werden, z.B. mittels einer Mikropipette mit einer Öffnung von nur wenigen Mikrometern. Die folgende Dilatation oder Konstriktion bleibt bei bestimmten Substanzen nicht lokal auf die Applikationsstelle begrenzt, sondern breitet sich schlagartig in beide Richtungen entlang des Gefäßes aus – ohne dass dies durch Konvektion oder Diffusion der Substanz zu erklären wäre.

Der Mechanismus dieser fortgeleiteten Antworten ist nur zum Teil geklärt. Man geht davon aus, dass an der Applikationsstelle eine Membranpotentialänderung entsteht und diese passiv über Gap-Junctions zwischen den Zellen der Gefäßwand fortgeleitet wird, um dann an entfernt gelegenen Stellen direkt oder indirekt den Tonus der glatten Muskelzellen zu beeinflussen (Segal & Duling, 1986b). Dieses Phänomen kann nicht nur wesentlich zur aufsteigenden Vasodilatation beitragen, sondern allgemein von großer Bedeutung für das koordinierte Zusammenspiel von Zellen, Gefäßabschnitten und verschiedenen Gefäßen im Gefäßbaum sein und steht im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

1.3 Bekannte Eigenschaften fortgeleiteter Vasomotorantworten

1970 zeigten Duling und Berne an 20-40 μm -Arteriolen in der Schleimhaut der Hamsterbackentasche (Duling & Berne, 1970), dass sich nach lokaler Gabe von Acetylcholin mittels einer Mikropipette die Vasodilatation über eine Strecke von 1600 μm stromaufwärts und stromabwärts von der Applikationsstelle ausbreitete. Diffusion und Konvektion des Acetylcholins schlossen sie als Ursache aus, da keine vergleichbaren Antworten mehr zu beobachten waren, wenn die Pipette in gleicher Entfernung im Gewebe anstatt am Gefäß platziert wurde. Sie zeigten zudem, dass die Fortleitung von der vasoaktiven Substanz abhängt. Während Acetylcholin in allen untersuchten Spezies und Geweben eine fortgeleitete Antwort erzeugt, ist dies bei anderen Substanzen variabel, oder kommt, z.B. bei Nitroprussid-Natrium, nie vor (Gustafsson & Holstein-Rathlou, 1999).

Segal und Duling konnten zuerst die Unabhängigkeit dieser Fortleitung vom Fluss zeigen, indem sie an der Hamsterbackentasche den Fluss in einer Arteriole durch proximales und distales Abdrücken mit einer stumpfen Mikropipette unterbrachen, was die Fortleitung der Acetylcholin-Antwort jedoch nicht beeinflusste. Die Fortleitungsgeschwindigkeit der Gefäßantwort betrug dabei mindestens 2 mm/s (Segal & Duling, 1986b).

Eine Beteiligung von Nerven wurde durch Unempfindlichkeit der Fortleitung von Acetylcholin-Antworten gegenüber Tetrodotoxin ausgeschlossen, das durch Blockade spannungsabhängiger Natrium-Kanäle die Ausbreitung von Aktionspotentialen in Nervenfasern hemmt (Segal & Duling, 1987; Segal & Duling, 1989).

Dagegen ergaben mehrere Untersuchungen eine Abschwächung oder Unterbrechung der Fortleitung durch Gap-Junction-entkoppelnde Substanzen. Segal und Duling beobachteten an Hamstercremaster-Gefäßen eine Abschwächung von fortgeleiteten Acetylcholin-Antworten nach Applikation von hypertoner Sucrose-Lösung zwischen Stimulations- und Beobachtungsstelle (Segal & Duling, 1987). Dieses Ergebnis konnten sie an der Hamsterbackentasche mit hypertoner Sucrose-Lösung, Octanol und erhöhter CO_2 -Konzentration bestätigen, welche die Fortleitung von Acetylcholin-Dilatationen und Kalium-Konstriktionen abschwächten bzw. unterbrachen (Segal & Duling, 1989).

Die Amplitude fortgeleiteter Vasomotorantworten nimmt mit zunehmender Entfernung von der Stimulationsstelle ab. Dies kann unter Annahme einer passiven Ausbreitung analog zu einem

elektrischen Leiter durch eine Längenkonstante beschrieben werden. Diese entspricht der Strecke, über die ein Signal auf $1/e$, also auf ca. 37 %, abnimmt. Die so anhand der Abnahme der Gefäßreaktion über eine bestimmte Strecke errechnete mechanische Längenkonstante liegt an der Hamsterbackentasche im Bereich von 1,6 – 2,2 mm (Segal *et al.*, 1989; Delashaw & Duling, 1991).

Elektrische Eigenschaften fortgeleiteter Antworten

Segal und Beny gelang es 1992 in-vivo an Arteriolen der Hamsterbackentasche das Membranpotential von Gefäßzellen (Endothelzellen und glatte Muskelzellen wurden nicht unterschieden) zu messen, und den Zusammenhang zwischen elektrischer und Vasomotor-Aktivität zu demonstrieren, indem sie zeigten, dass spontane Vasomotoraktivität und Membranpotentialschwankungen zeitlich synchron verliefen (Segal & Beny, 1992).

Den direkten Zusammenhang zwischen fortgeleiteten Vasomotorantworten und der Ausbreitung von Membranpotentialänderungen demonstrierten Xia und Duling dann 1995 an isolierten Arteriolen der Hamsterbackentasche: Durch Kaliumchlorid ausgelöste Depolarisationen und Konstriktionen konnten an der Applikationsstelle, und mit zunehmender Entfernung abgeschwächt, an entfernten Stellen gemessen werden, wobei die Vasomotorantwort mit dem Grad der Depolarisation korrelierte. Die elektrische und mechanische Längenkonstante waren dabei gleich (1,5 mm). Zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen bestand kein Unterschied im Ruhemembranpotential oder im Verlauf der Membranpotentialänderungen, woraus sie ableiteten, dass beide Zelltypen elektrisch miteinander gekoppelt waren (Xia & Duling, 1995; Xia *et al.*, 1995).

Messungen von Welsh und Segal bestätigten die longitudinale Ausbreitung von Membranpotentialänderungen auch in-vivo. Sie fanden aber, dass sich der Verlauf des Membranpotentials zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen bei Stimulation mit vasoaktiven Substanzen teilweise deutlich unterscheidet (Hamsterbackentasche, 50µm Arteriolen (Welsh & Segal, 1998)). Sie erklärten diese Befunde mit zwar vorhandenen, aber unter in-vivo-Bedingungen elektrisch entkoppelten Gap-Junctions zwischen Endothel und glatter Muskulatur. Dadurch ergeben sich zwei parallele Leitungswege in der Gefäßwand. Abhängig von der Art der Stimulation breiten sich Membranpotentialänderungen dann bevorzugt über eine Zellschicht (z.B. glatte Muskelzellen für Phenylephrin u. Noradrenalin), oder beide Zellschichten aus (Kaliumchlorid, Acetylcholin).

Bevorzugter Leitungsweg

Emerson und Segal stellten 2000 an isolierten 70 μm -Arteriolen des Hamster-Retraktormuskels fest, dass Acetylcholin-Antworten nicht über Arteriolenabschnitte fortgeleitet werden, in denen das Endothel bei erhaltenen glatten Muskelzellen zerstört wurde. Daraus schlossen sie, dass sich Acetylcholin-induzierte Hyperpolarisationen über die Endothelschicht ausbreiten, und diese die Hauptleitungsbahn für fortgeleitete Antworten darstellt (Emerson & Segal, 2000b). Theoretische Überlegungen und ein Vergleich der Zellkopplung zwischen Endothelzellen und zwischen glatten Muskelzellen in Arteriolen der Hamsterbackentasche unterstützen diese Ansicht: Bedingt durch den zirkulären Verlauf glatter Muskelzellen und die longitudinale Anordnung von Endothelzellen, müssten für eine Strecke von einem Millimeter entweder die Gap-Junctions zwischen ca. 140 glatten Muskelzellen oder alternativ nur 6 - 7 Endothelzellen überbrückt werden. Auch wenn Gap-Junctions eine relativ hohe elektrische Leitfähigkeit besitzen, stellen sie im Vergleich zum Zytoplasma der Zellen das Nadelöhr für die Ausbreitung von Membranpotentialänderungen dar. Hinzu kommt, dass Endothelzellen zumindest für Farbstoffe deutlich besser gekoppelt sind als glatte Muskelzellen, was auf eine bessere elektrische Kopplung von Endothelzellen hinweist (Haas & Duling, 1997; Little *et al.*, 1995).

In-vivo-Untersuchungen an der Hamsterbackentasche konnten die Bevorzugung des Endothels als Leitungsweg allerdings nicht bestätigen. Während die Zerstörung glatter Muskelzellen über einen kurzen Arteriolenabschnitt die Fortleitung von Phenylephrin-Antworten unterbrach, wurden Acetylcholin-Antworten sowohl über Stellen mit geschädigtem Endothel, als auch über Stellen mit geschädigter glatter Muskulatur weitergeleitet (Bartlett & Segal, 2000). Die glatte-Muskelzellschicht scheint also sowohl selbstständig (Phenylephrin), als auch gemeinsam mit dem Endothel als Fortleitungsweg dienen zu können.

1.4 Fragestellungen

1.4.1 Arteriöläre Druckmessung

Eine koordinierte Antwort hintereinander gelegener Gefäßabschnitte wird in Bezug auf die Mikrozirkulation vor allem durch den Widerstand in den stromauf gelegenen kleinen Arterien notwendig. Um diesen am Cremastermodell zu untersuchen, wurde der Blutdruck in der Arteria femoralis und in Arteriolen des Cremastermuskels gemessen, um daraus auf den Druckabfall proximal des Messpunktes zu schließen. Dazu wurden Arteriolen mit einem Durchmesser von ca. 50 μm mit einer angeschliffenen Mikropipette punktiert und der Druck im Blutgefäß mit der Servo-Null-Methode gemessen (s.u.).

1.4.2 Flussabhängige Komponente fortgeleiteter Vasomotorantworten

Fortgeleitete Dilatationen auf Acetylcholin lassen sich durch einen flussunabhängigen Mechanismus erklären. Da eine Erhöhung der Wandschubspannung in der Mikrozirkulation des Hamstercremasters aber ebenfalls eine signifikante Vasodilatation auslösen kann (de-Wit *et al.*, 1997), könnte eine flussabhängige Komponente an der Ausbreitung einer Acetylcholin-Antwort zumindest beteiligt sein. Inhibitoren der NO-Synthase und Cyclooxygenase könnten dann eine über NO und Prostacyclin vermittelte flussabhängige Komponente hemmen, und die Vasomotorantwort somit beeinflussen. Um einen solchen Effekt einzuschätzen oder auszuschließen, wurde aus der Blutflussgeschwindigkeit und dem Gefäßdurchmesser der Schergrad der intravasalen Flüssigkeit während fortgeleiteter Antworten errechnet. Daraus lässt sich mit Hilfe der Viskosität direkt auf die Wandschubspannung am Gefäßendothel schließen.

1.4.3 Auswirkungen der Pentobarbital-Narkose

Als Standardnarkose für in-vivo Versuche am Hamster wurde bisher eine intravenöse Dauerinfusion des Barbiturats Pentobarbital verwendet. Da sich gezeigt hat, dass Pentobarbital die EDHF-Komponente der Acetylcholin-Antwort vermindern kann (de-Wit *et al.*, 1999), wurde Pentobarbital durch eine Kombination aus einem Opioid (Fentanyl), Benzodiazepin (Midazolam) und Droperidol ersetzt (Neuroleptanästhesie), und diese zwei Narkose-Arten in Bezug auf die EDHF-Beteiligung an der Acetylcholin-Antwort verglichen.

1.4.4 Rolle endothelialer Autakoide bei fortgeleiteten Acetylcholinantworten

Stimulation eines Gefäßes mit Acetylcholin bewirkt am Applikationsort die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandin I₂ (PGI₂) und eines endothelialen hyperpolarisierenden Faktors (EDHF) und eine sich ausbreitende Vasodilatation. Um die Rolle der einzelnen Autakoide dabei zu untersuchen, wurden ihre Bildung bzw. Wirkung sequentiell gehemmt, und Vasomotorantworten vor und nach Blockade des entsprechenden Autakoids miteinander verglichen.

1.4.5 Ort der EDHF-Wirkung

EDHF scheint eine zentrale Rolle bei fortgeleiteten Acetylcholin-Antworten zu spielen. Der NO-Synthase- und Cyclooxygenase-unabhängige Anteil der Acetylcholin-Dilatation an der Stimulationsstelle beruht vermutlich auf der Öffnung von kalziumabhängigen Kaliumkanälen der glatten Muskelzellen durch endotheliales EDHF (Hashitani & Suzuki, 1997). Unklar ist, wie EDHF die fortgeleitete Vasodilatation bewirkt. Eine sich in der Endothelzellschicht passiv ausbreitende Hyperpolarisation könnte die Bildung von EDHF entlang des Endothels stimulieren, und so fortgeleitete Dilatationen durch vor Ort gebildeten EDHF verursachen. Alternativ könnte die EDHF-Wirkung am Stimulationsort ausreichend sein, um eine fortgeleitete Dilatation auszulösen. Wie EDHF und fortgeleitete Dilatationen ursächlich zusammenhängen ist eine der Hauptfragen dieser Arbeit.

1.4.6 Beeinflussung der Fortleitung durch NO

Die große Bedeutung von fortgeleiteten Vasomotorantworten als Koordinations- und Kommunikationsmechanismus in der Mikrozirkulation legt die Notwendigkeit einer Modulation nahe. Unter pathologischen Bedingungen, z.B. lokaler Entzündung, könnte eine sich unverhältnismäßig ausbreitende Vasodilatation durch Fehlverteilung des Blutstroms nachteilige Folgen haben. Als physiologische Inhibitoren der Gap-Junction-Leitfähigkeit wurden u.a. Entzündungsmediatoren (Hu & Cotgreave, 1997) und NO (Blasits *et al.*, 2000) beschrieben. Diese könnten eine fortgeleitete Dilatation aus einem entzündeten Gebiet mit maximaler Vasodilatation und hoher NO-Produktion bedingt durch die induzierbare NO-Synthase (NOS II) beschränken. Um die Rolle und Regulierbarkeit von Gap-Junctions an unserem Modell zu untersuchen, wurde die Wirkung von exogenem NO auf fortgeleitete Acetylcholin-Dilatationen untersucht.

2 Material und Methode

2.1 Versuchsvorbereitung und Präparation

Die Untersuchungen wurden an männlichen Syrischen Goldhamstern (*Mesocricetus auratus*) mit einem Gewicht zwischen 80 und 160 g und einem Alter von 2 bis 6 Monaten durchgeführt. Die Tiere stammten aus der Versuchstierzucht des Instituts für Physiologie und Pathophysiologie der Universität Mainz bzw. des Institutes für Physiologie der Universität München oder wurden von Charles River Deutschland zugekauft. Die Versuche wurden entsprechend der Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und waren von der Bezirksregierung Rheinhessen-Pfalz bzw. der Regierung von Oberbayern genehmigt.

2.1.1 Narkoseeinleitung, Katheterisierung und Beatmung

Das Versuchstier wurde gewogen und mit einer intraperitonealen Injektion von Pentobarbital-Natrium (37,5 mg/ml in 0,9% NaCl-Lösung, 2-3 ml/kg KG) narkotisiert. Nach Erreichen des Toleranzstadiums nach 10-15 Minuten wurden mit einem Langhaarscherer die vordere Halspartie und beide Hodensäcke rasiert.

Anschließend wurde das Versuchstier zur späteren Beatmung tracheotomiert. Nach einem 1,5 cm langen, medialen Hautschnitt an der ventralen Seite des Halses wurde die Trachea freipräpariert und zwischen zwei Knorpelspangen eingeschnitten. In die eröffnete Luftröhre wurde ein PE-Tubus (Durchmesser 1,5 mm, Länge 20 mm) eingeführt und mit zwei Bindfäden gesichert.

Zur Aufrechterhaltung der Narkose und Überwachung der Vitalfunktionen wurden ein venöser und ein arterieller Zugang in eine Vena jugularis und die gegenüberliegende Arteria carotis gelegt. Dazu wurde das jeweilige Gefäß vorsichtig dargestellt und zwischen zwei Fäden aufgespannt (Abb.2.1). Es wurde mit einer Mikroschere in der Mitte eingeschnitten und durch den Einschnitt ein mit physiologischer (Vene) bzw. heparinisierte physiologischer NaCl-Lösung (50-100 IU/ml, Arterie) gefüllter PE-Katheter (Durchmesser 1 mm) eingebracht, und provisorisch mit einem Faden gesichert. Nach dem Lösen der Haltefäden wurde der Katheter einige Millimeter vorgeschoben und mit den drei Fäden fixiert.

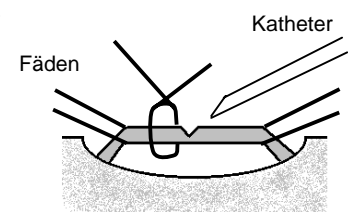


Abb. 2.1: Hals mit Gefäß, seitliche Ansicht

Über den venösen Zugang wurden während des Versuches kontinuierlich die Narkotika infundiert (Perfusor VII, Braun) und durch Beatmung und Nierenfunktion entstandene Flüssigkeitsverluste ausgeglichen. Nach Abschluß dieser Präparation wurde der Hamster über den Tubus kontrolliert beatmet (Frequenz 52-60 /min, Sauerstoff-Stickstoff-Gemisch 30:70; 7025 Rodent Ventilator, Hugo Sachs Elektronik, Freiburg; Dräger Labomix Gasmischgerät).

2.1.2 Aortenmanschette und Femoraliskatheter

Bei Versuchen, in denen Druck in den Arteriolen gemessen wurde, ist die Präparation um einen Femoraliskatheter und eine Aortenmanschette (Jones) erweitert worden. Der Femoraliskatheter (PE, Durchm. 0,61 mm) wurde nach einem von der rechten Leistenbeuge zur Innenseite des Oberschenkels geführten Hautschnitt und stumpfer Präparation des Gefäßes in gleicher Weise wie der Carotiskatheter in die A. femoralis eingeführt.

Um die Aortenmanschette (Abb. 2.2) anzubringen, ist die Abdominalhöhle in der Medianlinie eröffnet worden. Nach Einlage eines kleinen, gepolsterten Winkelstückes zum Abdrängen der intraperitonealen Organe konnte das Retroperitoneum inzidiert und die Aorta vorsichtig und unter weitgehender Schonung der Nerven unterfahren werden. Die u-förmige Manschette wurde unter das Gefäß gelegt und über diesem mittels angebrachter Fäden verschlossen. Danach wurde das Winkelstück entnommen und die Bauchhöhle mit Pflasterstreifen geschlossen.

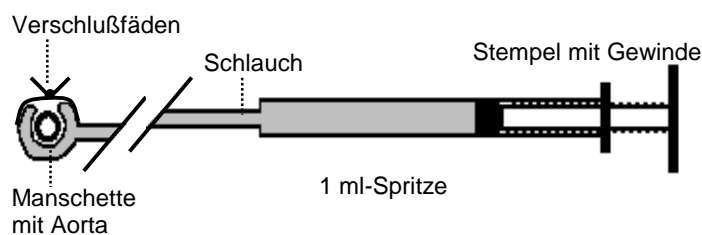


Abb. 2.2 Aortenmanschette.

Die Manschette war über einen flexiblen Schlauch mit einer 1 ml-Spritze verbunden, über die der Druck in der Manschette variiert werden konnte. Zur Erhöhung der Präzision war das Hohlraumssystem mit Öl gefüllt und der Stempel mit einem Gewinde versehen.

2.1.3 Präparation des Musculus cremaster

Zur Untersuchung der Mikrozirkulation wurde der rechte Musculus cremaster nach der Methode von Baez (Baez, 1973) präpariert. Der narkotisierte Hamster wurde auf eine Versuchsplattform aus Plexiglas mit gewärmten Boden (Abb. 2.3) gelagert und das Skrotum mit Krebs-Lösung (s. 2.2.2) superfundiert. Das Skrotum wurde mit einer Mikroschere in der vorderen Mittellinie vom distalen Pol her eröffnet und die darunterliegende Muskelfaszie vorsichtig abpräpariert. Danach konnte der Muskelsack analog zum Hautschnitt, unter weitgehender Schonung von Gefäßarkaden, eröffnet werden. Der nun flächige Muskel wurde mit 6 bis 8 atraumatischen Fäden (Prolene® 6/0, Johnson & Johnson), die mit Einzelknopfnähten am Muskelrand fixiert wurden, über der Glasplatte der Versuchsplattform (Abb. 2.3 und 2.4) aufgespannt. Während der Präparation des Muskels wurden Hoden, Nebenhoden und deren Gefäßversorgung, im besonderen die distale arterielle Anastomose zwischen Nebenhoden- und Cremastergefäßen, belassen (Modifikation nach Hill (Hill *et al.*, 1990)). Hoden, Nebenhoden und anhängendes Fettgewebe wurden lediglich mit zwei weiteren Fäden zur Seite gezogen und mit einer dünnen Plastikfolie abgedeckt, um das Gewebe vor dem Austrocknen zu schützen.

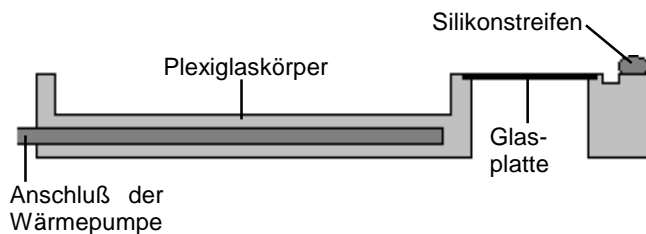


Abb. 2.3 Versuchsplattform (Längsschnitt). Im Boden befand sich ein Hohlraumsystem, das mit warmem Wasser perfundiert wurde. Der Cremastermuskel wurde auf der leicht erhöhten Glasplatte ausgebreitet. Am Kopf- (li.) und Fußende (re.) konnten Mikro-manipulatoren angebracht werden.

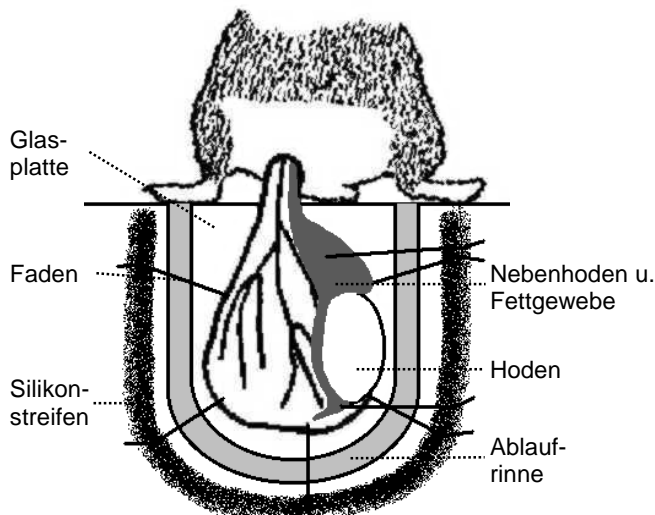


Abb. 2.4 Cremasterpräparation.

Der Muskel wurde mit atraumatischen Fäden, die in einen Silikonstreifen eingestochen wurden, über der Glasplatte locker aufgespannt. Hoden, Nebenhoden und Fettgewebe wurden nicht entfernt, sondern lediglich aus dem Beobachtungsfeld gezogen und mit Plastikfolie vor dem Austrocknen geschützt.

2.1.4 Narkose

Narkoseführung

Über den arteriellen Katheter wurden der systemische arterielle Blutdruck und die Herzfrequenz gemessen. Die Narkosetiefe wurde durch Änderung der Infusionsrate der Narkoselösung anhand dieser Kreislaufgrößen gesteuert und der Blutdruck so in einem Bereich von 80 bis 100 mmHg und die Herzfrequenz bei ca. 200 Schlägen/min gehalten. Die Körpertemperatur des Hamsters wurde mit einer pharyngealen Sonde gemessen und mittels der gewärmten Versuchsplattform und der Wärmestrahlung einer Glühbirne zwischen 37 und 38 °C gehalten. Nach Beendigung des Versuchsprotokolles wurde das Versuchstier durch eine Bolusinjektion von Pentobarbital-Natrium eingeschlafert.

Narkotika

Es wurden zwei verschiedene intravenöse Narkosen verwendet. Zu Beginn der Studie wurde das in den meisten bisherigen Untersuchungen am Hamster benutzte Barbiturat Pentobarbital verwendet. Da Pentobarbital jedoch den EDHF-Anteil von Acetylcholin-Dilationen abschwächen kann (de-Wit *et al.*, 1999)(s. 1.4.3), wurde es für Untersuchungen zur Rolle von EDHF durch eine barbituratfreie Narkose ersetzt, die auf der Kombination eines Opiates mit einem Neuroleptikum und einem Benzodiazepin beruht (Neuroleptnarkose).

- a) Pentobarbitalnarkose: Pentobarbital-Natrium wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml mit 0,2–1,2 ml/h infundiert. Mit dieser Narkose wurden die Versuche zur Rolle der Wandschubspannung, Auswirkung der Blockade der NO-Synthase und Cyclooxygenase und zur Fortleitung von Nitroprussid-, Phenylephrin- und Kaliumchlorid-Antworten durchgeführt.
- b) Neuroleptnarkose: Bei allen weiteren Versuchen wurde eine Kombinationen von Fentanyl, Midazolam und Droperidol verwendet. Die endgültige Zusammensetzung war eine Dauerinfusion (~0,7 ml/h) von Fentanyl und Midazolam (6,9 µg/ml bzw. 1,05 mg/ml in 0,9% NaCl-Lösung), bei der Droperidol (0,75 mg/ml) alle 30-50 min als Bolus (~0,1 ml) gegeben wurde.

2.2 Versuchsaufbau

2.2.1 Mikroskop und Anbauten

Die Plattform mit dem Versuchstier wurde auf einem Metallux 3-Mikroskop von Leitz mit Diskussionsbank und manuell verstellbarem Mikroskoptisch montiert. Es war mit einem 10x Okular und 20x bzw. 32x Objektiv (num. Apertur: 0,32 / 0,4) mit großem Arbeitsabstand ausgestattet. Der Kondensor hatte eine Apertur von 0,35.

Untersuchte Gefäßabschnitte wurden mittels einer Kamera (Model XC-77CE, PCO Computer Optics, Kelheim) aufgenommen und mit einem Videorecorder (AG-5700, Panasonic) auf Band (XD-Pro, Panasonic) aufgezeichnet. Mit einem Videotimer wurden dabei Zeitwerte ins Bild eingeblendet, über die die Einzelsequenzen bei der späteren Auswertung identifiziert werden konnten. Das Kamerabild konnte während des Versuches auf einem Monitor (PVM-1442 QM, Sony) beobachtet werden.

Mikropipetten zur Druckmessung bzw. Mikroapplikation von Substanzen wurden über einen Pipettenhalter (Eppendorf) in Mikromanipulatoren (Light-Weight Manipulator M-152 mit One Dimensional Oil Hydraulic Micromanipulator MMO-220, Narishige) eingespannt und diese am oberen oder unteren Ende der Versuchsplattform fixiert.

Zur Druckmessung wurde das hintere Ende des Pipettenhalters über einen Teflonschlauch mit einem Druckmessgerät (s. 2.3.3) verbunden. Zur Mikroinjektion von Substanzen wurde eine Verbindung zu einem Druckreservoir hergestellt. Über ein elektronisch steuerbares, schnell schließendes Ventil konnten dann Druckimpulse von genau definierter Zeitdauer (10-990 ms) an die Pipette abgegeben werden.

2.2.2 Superfusionssystem

Um die Mikrozirkulation des Cremastermuskels in einem möglichst physiologischen Milieu zu beobachten, wurde er permanent mit angewärmter, Bicarbonat-gepufferter Salzlösung (Krebslösung) superfundiert (Abb. 2.5). Diese wurde mit einem Gemisch von 5 % CO₂ und 95 % Stickstoff begast und hatte folgende Zusammensetzung [mM]: Na⁺ 143, K⁺ 6, Ca²⁺ 2,5, Mg²⁺ 1,2, Cl⁻ 128, HCO₃⁻ 25, SO₄²⁻ 1,2, H₂PO₄⁻ 1,2. So wurden der Sauerstoffpartialdruck in der Lösung bei 30 mmHg, der CO₂-Partialdruck bei 40 mmHg, die Temperatur bei 34°C und der pH-Wert zwischen 7,3 und 7,4 gehalten. Die Flussrate der Krebslösung betrug 8 ml/min. Über einen Nebenzugang konnten der Superfusion mit einer Rollerpumpe pharmakologisch wirksame Substanzen beigemischt werden (s. 2.2.3 und Abb. 2.5).

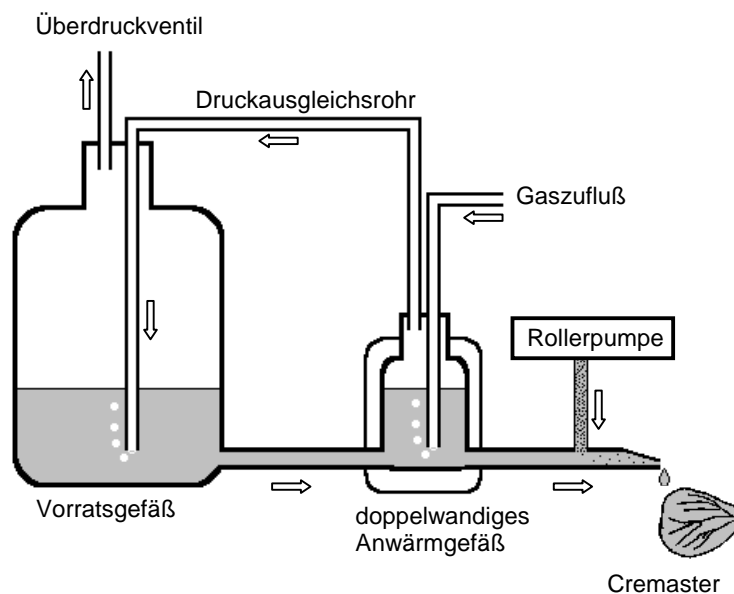


Abb. 2.5 Superfusionssystem.

Krebslösung aus dem Vorratsgefäß floss nach Erwärmung auf 34°C mit einer Flußrate von 8 ml/min auf den Muskel. Über einen kleinen Zugang konnten mit einer Rollerpumpe Substanzen zugegeben werden, die dabei 1:100 verdünnt wurden. Überschüssige Krebslösung floss vom Muskel über einen Ablauf ab.

Die Gasräume der beiden Gefäße standen unter konstantem Druck (80-100 mmHg) eines Gasgemisches (5% CO₂, 95% N₂). Die Flussrate wurde über die Höhe des Druckes gesteuert und war somit vom Füllungsgrad des Vorratsgefäßes unabhängig.

2.2.3 Applikationswege zu untersuchender Substanzen

Superfusion

Substanzen, die auf alle Gefäße des Cremasters wirken sollten, wurden mit der Superfusionslösung appliziert. Dazu wurde eine 100fach höher konzentrierte Stammlösung der zu untersuchenden Substanz über eine Rollerpumpe (Minipuls 2, Gilson, Frankreich) mit 0,08 ml/min der mit 8 ml/min fließenden Superfusion beigemischt (s. Abb. 2.5) und so auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

Mikroinjektion

Substanzen, bei denen eine streng auf eine Gefäßstelle lokalisierte Wirkung erwünscht war, wurden mit einer im Muskelgewebe platzierten Mikropipette (s.u.) perivaskulär (5-20 μm entfernt) injiziert. Eine sehr geringe Menge (<10 nl) der in der Mikropipette enthaltenen Lösung wurde mit einem kurzen Druckstoß (50-900 ms, 1,4 bar) aus der Pipette ausgestoßen. Ein kurzes Auseinanderweichen des umliegenden Gewebes zeigte eine erfolgreiche Ejektion von Flüssigkeitsvolumen aus der Pipettenspitze an.

2.2.4 Mikropipetten

Die verwendeten Mikropipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren mit internem Filament (Aussendurchmesser 1 mm, Innendurchmesser 0,58 mm, Länge 100 mm) mit einem Mikropipettenpuller gezogen (Moving-coil Microelectrode Puller Model 753, Campen Instruments, bzw. Model P-2000 Sutter Instrument Co.). Um die Öffnung der Pipettenspitze auf ca. 2 μm zu vergrößern und die Penetrationseigenschaften zu verbessern, wurden die Pipetten danach auf einem Mikropipetten-Schleiftisch mit rotierender Schleifplatte unter Sichtkontrolle durch ein Auflicht-Mikroskop (Vergrößerung 40-80x) geschliffen. Bei wasserbenetzter Schleifoberfläche und hoher Drehzahl der Schleifplatte waren Schleifzeiten von 2 bis 120 Sekunden pro Pipette die Regel. Die Durchgängigkeit konnte durch den Austritt kleinster Luftbläschen aus der unter Wasser gehaltenen Pipettenspitze kontrolliert werden, wenn mit einer 10 ml-Spritze ein hoher Druck (maximale Daumenkraft) im Pipettenlumen aufgebaut wurde.

Druckmesspipetten wurden zusätzlich mit Sigmacote®-Lösung silikonisiert, um die Thrombozytenaggregation zu hemmen. Zur Messung wurden sie mit 2 molarer NaCl-Lösung (teilweise heparinisiert, ~1 IU/ml) gefüllt.

2.3 Messung und Aufzeichnung der Messwerte

2.3.1 Arterieller Druck und Herzfrequenz

Der in der Arteria carotis gemessene systemische Blutdruck und der arterielle Druck in der Femoralarterie wurden mit Druckwandlern (Statham, Costa Mesa CA, USA) gemessen und sind in mmHg angegeben. Die Herzfrequenz wurde aus den Druckamplituden des Carotisdruckes mit einem Frequenzzähler bestimmt.

2.3.2 Erythrozytenflussgeschwindigkeit und Schergrad

Die Erythrozytenflussgeschwindigkeit (EFG) wurde mit der variierten Signal-Korrelations-Methode von Wayland und Johnson (Wayland & Johnson, 1967) ermittelt. Dazu erfassten zwei Photozellen die von fließenden Erythrozyten verursachten Helligkeitsänderungen auf zwei 15,3 µm hintereinander liegenden Gefäßabschnitten. Aus der zeitlichen Verzögerung des Signalmusters zwischen den Photozellen ließ sich dann mit einem PC-Programm (Herrmann *et al.*, 1987) (ONLINE 2.11) die Flussgeschwindigkeit der Erythrozyten errechnen.

Der Schergrad (SG) entspricht der Steilheit des Strömungsprofils des Blutstromes bei laminarem Fluss und wurde nach der Formel $SG = [8000 \times (EFG / 1,6)] / \text{Durchmesser}$ berechnet. Bei konstanter Viskosität verhält sich die Wandschubspannung, also die Scherkraft, welche auf die Endothelschicht wirkt, proportional zum Schergrad.

2.3.3 Arteriöle Druckmessung

Der Druck in Arteriolen der Mikrozirkulation wurde mit einem Servodruckmesssystem (Model 5A, IPM Instrumentation for Physiology and Medicine Inc.) gemessen. Dazu wurde eine mit 2 molarer NaCl-Lösung gefüllte Mikropipette im Gefäßlumen platziert. Verschiebungen der Grenzfläche zwischen Pipettenlösung und Blutplasma durch die Druckdifferenz zwischen Pipetteninnerem und -äußerem (Blutgefäß) führen dann zu einer Änderung des elektrischen Widerstandes über die Pipette. Dringt Blutplasma mit seiner geringeren Salzkonzentration in die Pipette ein, steigt ihr elektrischer Widerstand an. Umgekehrt führt ein Auslaufen der Salzlösung aus der Pipette zu einem Abfall des Widerstandes. Über einen elektronischen Regelkreis wird der elektrische Widerstand konstant gehalten, indem der Druck in einem mit der Pipette gekoppelten Flüssigkeitsreservoir mittels eines Stempels angepasst wird. Der Druck, der notwendig ist, um die Position der Flüssigkeitsgrenzfläche in der Pipettenspitze konstant zu halten, entspricht dann

dem aktuellen Druck im Gefäß und kann mit einem konventionellen Druckwandler (Statham) im Druckreservoir gemessen werden.

2.3.4 Gefäßdurchmesserbestimmung

Nach dem Versuch wurde der Gefäßdurchmesser vom Videoband mit einem Bildanalysegerät ausgemessen (Video Dimension Analyzer Model 330H IPM, Instrumentation for Physiology and Medicine, Inc.). Die halbautomatische Messung beruhte auf der automatischen Platzierung von zwei Messbalken in der Bildspalte mit der stärksten Änderung der Helligkeitswerte, wobei nur ein kleines Messfeld betrachtet wurde. Dieses musste zuvor auf eine Stelle mit kontrastreicher Gefäßdarstellung gelegt werden. Die Position der Messbalken konnte während der Messung manuell korrigiert werden. Das Gerät lieferte dann eine dem Abstand der Balken proportionale Spannung, welche als Analogsignal mit einem PC (486er) aufgenommen und durch ein Datenaufzeichnungsprogramm (Workbench PC 2.0, Strawberry Tree Inc.) in Mikrometer umgerechnet und mit 2 Hz gespeichert wurde. Die vorherige Kalibration erfolgte mittels eines Objektivmikrometers.

2.3.5 Datenaufzeichnung

Herzfrequenz, Drücke und Erythrozytenflussgeschwindigkeit wurden mit einem Datenaufzeichnungsprogramm (ONLINE) auf einem 486er-PC während der Messphasen kontinuierlich mit 1 Hz auf der Festplatte gespeichert und nachträglich ausgewertet.

2.4 Versuchsprotokolle

2.4.1 Arteriöle Druckmessung

Ziel dieser Versuche war es, den Druckabfall proximal und innerhalb der Mikrozirkulation des Cremasters zu bestimmen, und die Reaktion von Arteriolen der Mikrozirkulation auf Änderungen des arteriellen Blutdruckes zu beobachten. Um den Druck in den Cremastergefäßen variieren zu können, wurde eine aufblasbare Manschette um die Bauchaorta angebracht (s. 2.1.2 und Abb. 2.2). Durch Änderung des Manschettendruckes konnte der Flusswiderstand der Bauchaorta und damit der Blutdruck in der unteren Körperhälfte variiert werden. Der distal der Manschette herrschende Blutdruck wurde kontinuierlich über einen Katheter in der A. femoralis gemessen, so dass genau definierte Druckstufen vorgegeben werden konnten. Dabei wurde mit der Servo-Methode (s. 2.3.3) der Druck in einer Arteriole gemessen und ihr Durchmesser aufgezeichnet (Abb. 2.7).

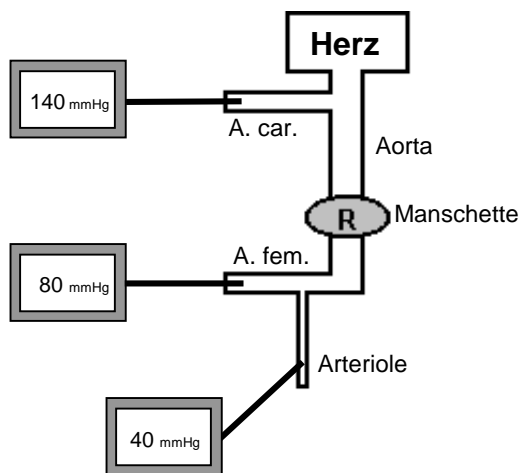


Abb. 2.7 Schema zur arteriölen Druckmessung.

Der arterielle Körperkreislauf war durch die Manschette in eine proximale und eine distale Hälfte geteilt. Der proximale arterielle Druck wurde über den Carotiskatheter gemessen. Der distale arterielle Druck wurde durch die Aortenmanschette kontrolliert und über den Femoraliskatheter gemessen. An der beobachteten Arteriole konnte der Durchmesser aufgezeichnet und der Druck mit einer Mikropipette gemessen werden.

Der Blutdruck des anästhesierten Hamsters lag bei 100 mmHg. Um auch hypertensive Bereiche zu untersuchen, wurde der Druck durch i.v.-Infusion von Noradrenalin (NA, 59,1 μM , $\sim 4,5 \mu\text{l}/\text{min}$) oder Angiotensin II (AT II, 93 μM , 1-10 $\mu\text{l}/\text{min}$) auf ca. 140 mmHg angehoben. Der Cremastermuskel wurde dabei mit den entsprechenden Rezeptorantagonisten (Prazosin 0,1 μM + Yohimbin 0,1 μM + Propanolol 1 μM bei NA, bzw. AT₁-Antagonist HR720 (Jin *et al.*, 1997) 0,5 μM bei AT II) superfundiert, um eine direkt Wirkung des Noradrenalins bzw. Angiotensins auf die beobachteten Gefäße auszuschließen.

Zu Beginn einer Beobachtungsserie wurde der distale Blutdruck durch Aufblasen der Manschette auf 40 bzw. 60 mmHg abgesenkt und mit der Aufzeichnung des arteriolen Durchmessers und Druckes begonnen. Nach ca. 45 Sekunden, wenn nach einer Druckänderung Mikrodruck und Durchmesser der Arteriole stabil waren, wurde der distale Druck um 20 mmHg angehoben, indem der Manschettendruck gesenkt wurde. Durch schrittweise Manschettentlastung konnte ein stufenförmiger Druckverlauf von (40,) 60, 80, 100 und 120 mmHg vorgegeben werden. Bei einigen Gefäßen wurde dieses Druckprofil unter Superfusion mit Nitroprussid-Natrium (10 μ M) wiederholt um das passive Verhalten des Gefäßes bei Druckänderung zu beobachten.

2.4.2 Versuche zu fortgeleiteten Antworten

In Versuchen, in denen die Fortleitung von Gefäßreaktionen (fortgeleitete Vasomotorantworten) untersucht wurde, wurde ein Gefäß während der kurzen Applikation von Substanzen zunächst an der Stimulationsstelle und dann an einem entfernt gelegenen Gefäßabschnitt beobachtet (s. Abb. 2.6). Die entfernten Beobachtungsstellen lagen dabei immer stromaufwärts von der Stimulationsstelle, um einen konvektiven Transport der applizierten Substanz mit dem Blutstrom auszuschließen. Es wurden Arteriolen mit gleichmäßigem Kaliber und ohne größere Abzweigungen im Beobachtungsbereich gewählt.

Die untersuchte Arteriole wurde durch eine kurze (<1 s) Ejektion einer vasoaktiven Substanz aus einer direkt neben dem Gefäß platzierten Mikropipette stimuliert. Die Stimulation wurde mehrmals wiederholt und dabei entweder an der Stimulationsstelle (lokal) oder an einer entfernt gelegenen Stelle das Gefäßverhalten aufgezeichnet. Die Aufzeichnung begann 30 Sekunden vor Stimulation und dauerte 2 Minuten. Jeder Gefäßabschnitt wurde 2 bis 3 mal beobachtet und später eine gemittelte Antwort für jede Stelle errechnet (siehe 2.5.3). Eine solche Serie von Stimulationen und Beobachtungen zur Bestimmung der lokalen und entfernten Antwort unter gleichen Bedingungen wird im folgenden als Beobachtungsserie bezeichnet.

Nach der ersten Beobachtungsserie konnten pharmakologisch wirksame Substanzen an das Gefäß gegeben werden, deren Auswirkungen auf die fortgeleitete Antwort in einer zweiten Beobachtungsserie bestimmt wurde. Am Ende des Versuches wurde der maximale Durchmesser jeder beobachteten Stelle durch simultane Superfusion von Nitroprussid-Natrium ($10 \mu\text{M}$), Adenosin ($100 \mu\text{M}$) und Papaverin ($300 \mu\text{M}$) ermittelt.

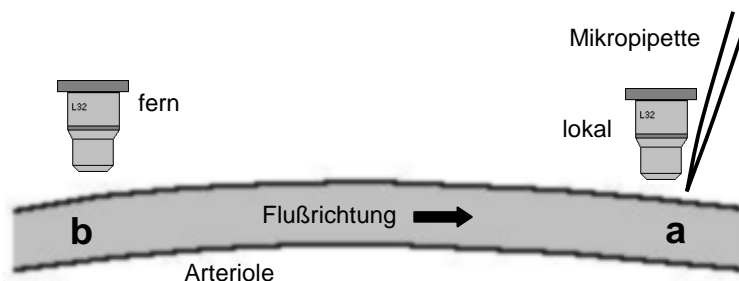


Abb. 2.6 Beobachtung der fortgeleiteten Vasomotorantwort.

Die Gefäßreaktion auf eine Stimulation wurde an der Stimulationsstelle (a) und danach einer fernen, stromaufwärts gelegenen Stelle (b) gemessen. Es konnte jeweils nur eine Stelle beobachtet werden.

2.4.3 Lokalisierte Applikation von Acetylcholin

Als Grundlage aller folgenden Untersuchungen wurden die lokale und entfernte Gefäßreaktion auf Acetylcholin (ACh, 1 mM) untersucht. Um einen Effekt durch den Reiz der Druckejektion an sich auszuschließen, wurde zudem 0,9 % NaCl-Lösung neben einige Arteriolen injiziert.

Konvektion des Acetylcholins mit der Superfusionslösung wurde ausgeschlossen, indem in einigen Versuchen die Pipettenspitze aus ihrer Position im Muskelgewebe neben der Arteriole herausgezogen, und auf dem Muskel über dem Gefäß oder wenige hundert Mikrometer entfernt des Gefäßes im Muskel platziert wurde. Hierbei war in keinem Falle eine Reaktion des Gefäßes zu beobachten.

2.4.4 Lokalisierte Applikation von Nitroprussid, Phenylephrin und Kaliumchlorid

Eine Arteriole wurde mit dem spontan NO freisetzenden NO-Donator Nitroprussid-Natrium (Nitroprussid / SNP, 0,2 mM), dem α_1 -Agonisten Phenylephrin (PE, 1 mM) oder konzentrierter Kaliumchlorid-Lösung (KCl, 3 M) über eine Mikropipette stimuliert und dabei wurden in einer Beobachtungsserie lokale und entfernte Gefäßantworten bestimmt.

Bei der Untersuchung von Nitroprussid und Phenylephrin lag die entfernte Beobachtungsstelle im Mittel $742 \pm 52 \mu\text{m}$ bzw. $746 \pm 76 \mu\text{m}$ stromauf. Bei Kaliumchlorid-Stimulation wurden zwei entfernte Stellen, 670 und 1340 μm stromauf der Stimulationsstelle, nacheinander beobachtet. An einem Gefäß wurde jeweils nur eine Substanz untersucht. Bei fehlender Fortleitung (Nitroprussid und PE) wurde eine Kontrolle der Fortleitung mit Acetylcholin-Stimulation durchgeführt.

2.4.5 Untersuchung von potentiellen Änderungen der Wandschubspannung während fortgeleiteter Dilatationen

Eine Arteriole wurde mit Acetylcholin-Ejektion (1 mM) aus einer Mikropipette stimuliert und die Gefäßantwort in einer Beobachtungsserie aufgezeichnet. Neben dem Gefäßdurchmesser wurde gleichzeitig die Erythrozytenflussgeschwindigkeit (EFG) an der Beobachtungsstelle gemessen (siehe 2.3.2). Um eine störungsfreie EFG-Messung zu erreichen, wurde als entfernte Beobachtungsstelle ein Gefäßabschnitt mit möglichst guter optischer Darstellung gewählt. Dadurch wurde nicht in einer Standardentfernung, sondern in Entfernungen von 700 bis 2000 μm (Mittelwert $1411 \pm 172 \mu\text{m}$) beobachtet. Aus dem Gefäßdurchmesser und der Erythrozytenfluss-

geschwindigkeit wurde später der Schergrad berechnet. Die Versuche wurden unter Pentobarbitalnarkose durchgeführt.

2.4.6 Hemmung der NO-Synthase und Cyclooxygenase

Arteriolen wurde durch Mikroinjektion von Acetylcholin stimuliert. Nach einer Beobachtungsserie unter Kontrollbedingungen wurden der Superfusion der NO-Synthase-Inhibitor N^o-nitro-L-arginin (L-NA 30 μ M) und der Hemmer der Cyclooxygenase Indomethacin (3 μ M) beigegeben. Diese Konzentrationen reichen aus, um in dieser Präparation beide Enzyme effektiv zu hemmen (de-Wit *et al.*, 1993). Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurde die Beobachtungsserie wiederholt. Die entfernten Stellen waren im Mittel 1010 ± 90 μ m stromauf gelegen. Die Versuche wurden unter Pentobarbitalnarkose oder Neuroleptnarkose durchgeführt und getrennt ausgewertet.

2.4.7 Cytochrom P450 2C8/9-Hemmung durch Sulfaphenazol

Das Präparat wurde von Beginn an mit N^o-nitro-L-arginin (L-NA 30 μ M) und Indomethacin (3 μ M) behandelt. Nach einer Beobachtungsserie zur Erhebung der lokalen und entfernten Antworten wurde der Superfusion zusätzlich der Cytochrom P450 2C8/9-Inhibitor Sulfaphenazol (Mancy *et al.*, 1996) (20 μ M) beigegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurde die Beobachtungsserie wiederholt. Die entfernten Stellen lagen dabei 670 μ m stromauf der Stimulationsstelle. Die Versuche wurden unter Neuroleptnarkose durchgeführt.

2.4.8 Lokalisierte Hemmung von K_{Ca}-Kanälen durch Iberiotoxin und Charybdotoxin

Das Präparat wurde von Beginn an mit N^o-nitro-L-arginin (L-NA, 30 μ M) und Indomethacin (3 μ M) behandelt. Nach Untersuchung der NOS- und COX-unabhängigen Acetylcholin-Antwort wurden der K_{Ca}-Blocker Iberiotoxin (10 μ M) und in einer weiteren Serie der K_{Ca}-Blocker Charybdotoxin entweder an der lokalen oder der entfernten Beobachtungsstelle appliziert. Dazu wurden sie mit einer Mikropipette mit mehreren Ejektionen in die Umgebung des Gefäßes injiziert. Danach wurde der so behandelte Abschnitt während mehrerer Acetylcholin-Stimulationen beobachtet. Die entfernte Stelle lag 670 μ m stromauf der Stimulationsstelle. Die Versuche wurden unter Neuroleptnarkose durchgeführt.

2.4.9 Wirkung von exogenem NO auf fortgeleitete ACh-Dilatationen

Vor Beginn des eigentlichen Versuches wurde der Muskel kurz mit Nitroprussid (SNP, 1 μM) superfundiert, was regelmäßig zu einer Vasodilatation führte. Anschließend wurde der Cremaster fortlaufend mit L-NA (30 μM), Indomethacin (3 μM) und 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ, 10 μM), einem Inhibitor der löslichen Guanylatyclase (Olson *et al.*, 1997), behandelt. Wenn nach einer Inkubationszeit von 20 min bei einer weiteren kurzen SNP-Superfusion die cGMP-vermittelte Dilatation aufgehoben war, wurden in einer Beobachtungsserie lokale und entfernte Antworten ermittelt. Danach wurde der Superfusion fortwährend SNP (1 μM) zugegeben und nach weiteren 10 Minuten eine zweite Beobachtungsserie durchgeführt. Die entfernte Antwort wurde an zwei Stellen, 670 und 1340 μm stromaufwärts, gemessen. Die Versuche wurden unter Neuroleptnarkose durchgeführt.

2.5 Datenverarbeitung

2.5.1 Versuchsdatei und Einzelbeobachtung

Nach Gewinnung der Rohdaten wurden Durchmesser- und Flussgeschwindigkeitsdaten überprüft und messmethodenbedingte Artefakte korrigiert. Flussgeschwindigkeitsartefakte traten gelegentlich durch kleine Erschütterungen oder Zuckungen des Gefäßbettes auf und waren leicht als kurze Ausreisser zu erkennen. Durchmesserartefakte entstanden durch Kontrastschwankungen des Videobildes, die zu kurzen Kontaktverlusten zwischen Messbalken und Gefäßrand führten, und waren ebenfalls eindeutig zu erkennen. Drücke und Herzfrequenz wurden direkt übernommen. Diese Daten wurden in ein programmierbares Statistikprogramm (Stata Vers. 6.0, Stata Corp., College Station, Texas) eingelesen und die Einzelbeobachtungen eines Versuches in einer Versuchsdatei zusammengefasst. Eine Einzelbeobachtung bestand aus den Messwerten der Beobachtung einer Stimulation bzw. Intervention und entsprach einer Aufzeichnungszeit von 1,5 bis 20 Minuten.

2.5.2 Zusammenfassung und Normalisierung

Die für eine bestimmte Fragestellung verwertbaren Einzelbeobachtungen verschiedener Versuche wurden aus den Versuchsdateien heraus in einer eigenen Datei zusammengestellt. Dabei wurden Durchmesser, Erythrozytenflussgeschwindigkeit (EFG) und Schergrad (SG) nach den folgenden Formeln berechnet bzw. normalisiert. Bei Versuchen mit Bestimmung des Schergrades (SG) sind EFG, SG und Vasodilatation als prozentuale Änderungen des Ausgangswertes (in Ruhe) angegeben. Ansonsten wurden Vasodilatationen in Prozent der maximal möglichen Dilatation umgerechnet (abgekürzt % Dilatation), um eine Beurteilung der Dilatation unabhängig vom Ausgangsgefäßtonus zu erreichen.

$$\% \text{ Änderung} = (\text{Wert}_{\text{Stim}} / \text{Wert}_{\text{Ruhe}}) \times 100 - 100$$

$$\% \text{ Dilatation} = (D_{\text{Stim}} - D_{\text{Ruhe}}) / (D_{\text{max}} - D_{\text{Ruhe}}) \times 100$$

(D = Durchmesser, Ruhe = vor Stimulation, Stim = nach Stimulation)

Untersuchungen, die an einem Tier am selben Gefäß wiederholt wurden, und bezüglich der Stimulation und Behandlung identisch waren, wurden durch Mittelung der Verlaufskurven von Durchmesser, Erythrozytenflussgeschwindigkeit und Schergrad zusammengefasst. Diese am selben Gefäß durchgeführten Untersuchungen stellen jeweils eine Beobachtung dar.

2.5.3 Statistik und Abbildungen

Tabellen und Abbildungen zeigen arithmetische Mittelwerte der absoluten und normalisierten Werte \pm Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Durchmesseränderungen, Erythrozytenflussgeschwindigkeit und Schergrad sind als gemittelter kontinuierlicher Verlauf und maximale Antwort angegeben. Ergebnisse wurden mit dem Student-t-Test abhängig vom Versuchsablauf als gepaarte oder ungepaarte Werte auf Signifikanz ($p < 0,05$) geprüft (s. Ergebnisse). Zur Datenverarbeitung und statistischen Auswertung wurde das Statistikprogramm Stata benutzt. Abbildungen wurden mit Sigma Plot (SPSS Inc., Vers. 5.0) erstellt.

2.6 Verwendete Chemikalien und Lösungen

<u>Substanz</u>	<u>Quelle</u>
- Acetylcholin:	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen (Sigma)
- Adenosin:	Sigma
- Angiotensin II:	Sigma
- Carbenoxolon:	Sigma
- Droperidol:	Dehydrobenzperidol®, Janssen
- Fentanyl:	Fentanyl-Janssen®, Janssen
- HR720:	Hoechst AG
- Heparin:	Braun AG, Melsungen
- Indomethacin:	Confortid®, Dumex GmbH
- Krebs-Lösung:	Zusammensetzung s. 2.2.2, Salze: Merck AG
- Midazolam:	Dormicum®, Hoffmann-La Roche AG
- N ⁰ -nitro-L-arginin:	Sigma
- Noradrenalin:	Arterenol®, Hoechst AG, Frankfurt
- Nitroprussid-Natrium:	Sigma
- Pentobarbital:	Narcoren ®, Merial GmbH
- Prazosin:	Sigma
- Propanolol:	ICN Biochemicals Inc., Cleveland
- Sulfaphenazol:	Sigma
- Yohimbin:	Sigma
- 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]Quinoxalin-1-one (ODQ):	Sigma

3 Ergebnisse

3.1 Arteriöläre Druckmessung

In dieser Versuchsserie wurde der neben dem Blutdruck in der Arteria carotis und Arteria femoralis der Druck in Arteriolen der Mikrozirkulation des Cremastermuskels gemessen, um den Widerstand der arteriellen und arteriölären Gefäße proximal und innerhalb des Präparates abschätzen zu können.

In Ruhe lag der mittlere arterielle Blutdruck in der A. carotis bei 83 ± 4 mmHg und in der A. femoralis bei 76 ± 5 mmHg. Der Femoralarteriendruck war mit $90,8 \pm 2$ % des Carotisdruckes signifikant kleiner als dieser ($p < 0,05$).

Die untersuchten Arteriolen in der Mikrozirkulation des Cremasters hatten einen mittleren Ruhedurchmesser von 52 ± 5 μm bei einem Druck von 35 ± 3 mmHg (siehe Abb. 3.1). Dies entspricht nur noch $46,4 \pm 4$ % des Femoralarteriendruckes. Etwa die Hälfte des Druckabfalls im arteriellen Schenkel der Blutzirkulation des Cremasters fand also stromaufwärts des Messpunktes statt, vor allem in den kleinen Arterien die zwischen der grossen Beckenarterie (Arteria iliaca) und der Mikrozirkulation liegen. Diese Werte stammen von 18 Tieren.

Um den Tonus der Arteriolen bei Druckänderungen zu untersuchen, wurden ausgehend von 40 bzw. 60 mmHg Drucksprünge von 20 mmHg in der unteren Körperhälfte erzeugt (siehe Abschnitt 2.4.1). Nach Absenkung des Blutdruckes in der unteren Aorta abdominalis vom Ruhedruck auf 60 mmHg betrug der Druck in den Cremasterarteriolen im Mittel 27 ± 4 mmHg. Der Durchmesser lag bei 58 ± 8 μm . Während der stufenweisen Druckerhöhung in der distalen Aorta stieg der arteriöläre Druck mit jedem Drucksprung signifikant an und betrug 39 ± 5 , 52 ± 5 und 69 ± 6 mmHg bei 80, 100 und 120 mmHg in der Femoralarterie. Der Durchmesser blieb mit 58 ± 8 , 59 ± 9 , 55 ± 9 und 61 ± 9 μm bei 60, 80, 100 und 120 mmHg konstant und nahm nicht signifikant zu (siehe Abb. 3.2 und Tab. 1).

Das Verhältnis des Druckes in den Arteriolen zum Druck in der Arteria femoralis betrug bei 60, 80, 100 und 120 mmHg distal der Aortenmanschette im Mittel 45,8 , 49,4 , 52,6 und 59,3 % (siehe Tab. 1). Diese Änderungen waren allerdings weder zwischen benachbarten Druckstufen noch zwischen 60 und 100 bzw. 120 mmHg signifikant. Es lässt sich allenfalls ein gewisser Trend zu höheren Werten mit zunehmendem Druck erkennen.

Bei Superfusion des Präparates mit dem Vasodilatator Nitroprussid (SNP, 10 μ M) war der Durchmesser bei jeder Druckstufe signifikant größer und nahm außerdem mit 68 ± 7 , 74 ± 7 , 77 ± 7 und 89 ± 7 μ m bei 60, 80, 100 und 120 mmHg mit jeder Druckerhöhung auch signifikant zu. Die Arteriolen wurden also passiv aufgedehnt. Der arterioläre Druck war unter Nitroprussid-Superfusion jedoch nicht signifikant verschieden zum unbehandelten Präparat (s. Abb. 3.3 und Tab. 1).

	Ruhe (n=18)	40 mmHg (n=1)	60 mmHg (n=7)	80 mmHg (n=7)	100 mmHg (n=7)	120 mmHg (n=4)
Druck [mmHg]						
A. carotis	83,0 \pm 4,4	-	-	-	-	-
A. femoralis	76,0 \pm 4,7	38,3	58,8 \pm 0,7	78,6 \pm 0,9	97,7 \pm 1,1	116,9 \pm 1,6
Arteriole	34,6 \pm 3,0	13,2	26,9 \pm 3,8	38,7 \pm 4,9	51,4 \pm 5,4	69,3 \pm 5,6
Arteriole/Fem. [%]	46,4 \pm 3,5	34,5	45,8 \pm 6,5	49,4 \pm 6,4	52,6 \pm 5,5	59,3 \pm 4,9
Art. +SNP	-	10,5	25,7 \pm 3,1	36,1 \pm 3,4	48,2 \pm 4,5	67,8 \pm 5,3
Durchmesser						
ohne SNP	51,5 \pm 4,7	54,6	58,2 \pm 8,0	59,2 \pm 8,6	54,9 \pm 9,1	60,7 \pm 8,7
mit SNP	-	59,8	68,1 \pm 6,8	74,2 \pm 6,9	76,8 \pm 7,4	89,1 \pm 7,0

Tab. 1: Drücke in A. carotis, der distal der Aortenmanschette liegenden A. femoralis und einer Cremasterarteriole in Ruhe und bei verschiedenen Druckstufen. Der Arterioldurchmesser ist ohne Behandlung und bei Superfusion mit SNP (10 μ M) angegeben. Die Werte der Druckstufen 60, 80 und 100 sind gepaart zu betrachten. Bei 40 und 120 mmHg war oft keine präzise Messung möglich. Da für 40 mmHg nur eine einzelne Messung vorlag, wurde diese Druckstufe nicht in statistische Tests einbezogen.

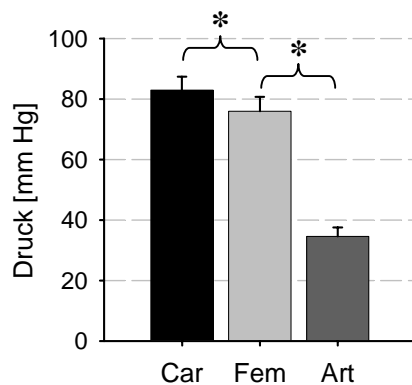
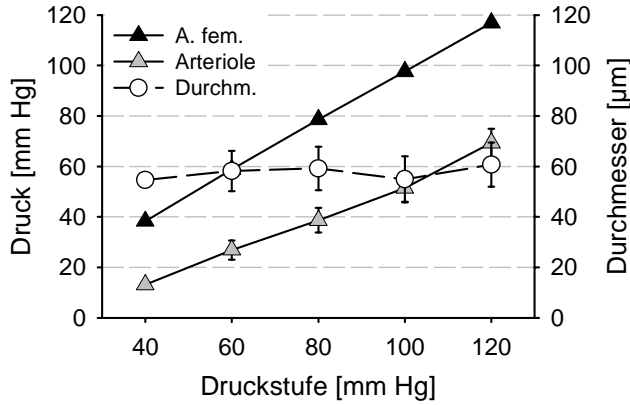


Abb. 3.1: Ruhedruck in A. carotis, A. femoralis und einer Cremasterarteriole (Durchmesser $51,5 \pm 4,7 \mu$ m).

Der Druck in der A. femoralis war signifikant kleiner als in der A. carotis. Dies gilt ebenso für den Druck in der Arteriole im Vergleich zum Druck der A. femoralis ($p < 0,01$, Stern).

a: Druckstufen



b: Verhältnis Arteriole / A. femoralis

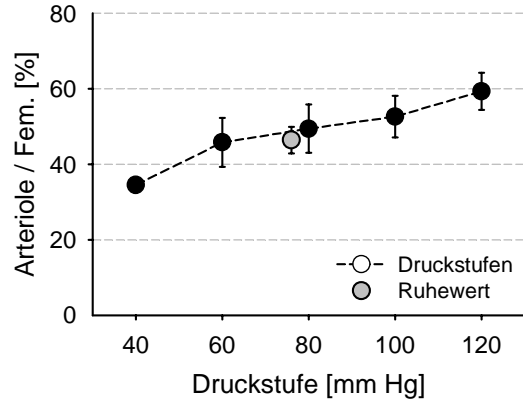


Abb. 3.2:

(a) Druck in A. femoralis und einer Cremasterarteriole und arteriöler Durchmesser bei Druckstufen von 40 bis 120 mmHg. Der Femoralarteriendruck entspricht der vorgegebenen Druckstufe. Der arteriöle Druck nahm mit jedem Drucksprung signifikant zu, während der Durchmesser konstant blieb.

(b) Verhältnis des Druckes in der Arteriole zum Druck der A. femoralis, angegeben in Prozent. Im Gegensatz zu den absoluten arteriölen Drücken war hier der Unterschied zwischen benachbarten Druckstufen und zwischen 60 und 100 bzw. 120 mmHg nicht signifikant. In Ruhe betrug der Druck in der Arteriole $46,4 \pm 3,5$ % des Druckes in der A. femoralis.

c: Druckstufen mit Nitroprussid

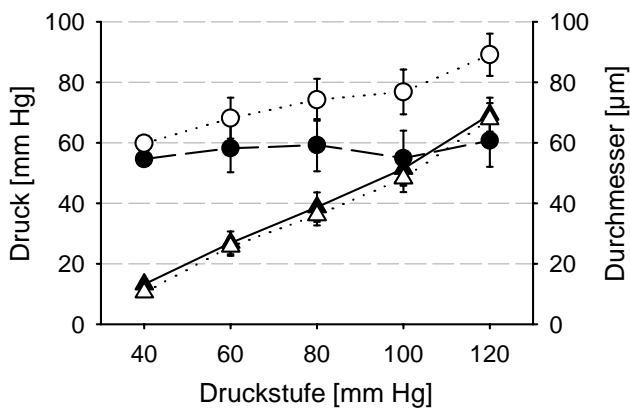


Abb 3.3: Arteriöler Druck und Durchmesser bei verschiedenen Druckstufen ohne Behandlung (schwarz) und bei Superfusion mit SNP (10 μM, weiß). Unter SNP war der Durchmesser bei jeder Druckstufe signifikant größer als ohne SNP und nahm zudem mit Erhöhung des Druckes zu.

▲ Druck, Kontrolle
 ● Durchmesser, Kontrolle
 △ Druck, SNP
 ○ Durchmesser, SNP

3.2 Lokalisierte Applikation von Vasodilatoren

3.2.1 Acetylcholin

Wenn Acetylcholin mittels Mikropipette direkt neben eine Arteriole injiziert wurde, dilatierte das Gefäß an der Stimulationsstelle (lokal), und zudem mit abnehmender Amplitude über mehrere 100 μm stromauf- und stromabwärts. Stellvertretend für die fortgeleitete Antwort wurde eine im Durchschnitt $917 \pm 95 \mu\text{m}$ stromaufwärts gelegene Stelle beobachtet (entfernte Stelle).

An der Applikationsstelle begannen die Gefäße sich 3 Sekunden nach Acetylcholin-Gabe signifikant zu erweitern. Die Arteriolen dilatierten im Mittel in $13 \pm 1 \text{ s}$ von $32 \pm 1 \mu\text{m}$ in Ruhe auf ein Maximum von $49 \pm 2 \mu\text{m}$. Dies entspricht einer Dilatation von $71 \pm 5 \%$ der Dilatationskapazität. Danach nahm der Durchmesser zügig wieder ab und $32 \pm 4 \text{ s}$ nach Stimulation hatte sich die Dilatation an der lokalen Stelle wieder um die Hälfte zurückgebildet.

An den entfernten Stellen begann die Dilatation ebenfalls nach 3 Sekunden, erreichte ihr Maximum aber signifikant früher nach $9 \pm 1 \text{ s}$ ($p < 0,01$). Der Durchmesser nahm hier von $28 \pm 2 \mu\text{m}$ auf $36 \pm 2 \mu\text{m}$ zu, mit einer mittleren Dilatation von $31 \pm 4 \%$ ($8,1 \pm 0,9 \mu\text{m}$). Dies war deutlich weniger als an der Stimulationsstelle ($p < 0,01$). Mit $24 \pm 4 \text{ s}$ bis zur Rückbildung auf die Hälfte der Antwort war die fortgeleitete Dilatation auch signifikant kürzer ($p < 0,05$). Den genauen zeitlichen Verlauf der Antworten gibt Abbildung 3.4 wieder. Die Daten stammen von 10 Gefäßen aus 10 Versuchen und wurden unter Pentobarbitalnarkose erhoben.

Stelle	Ruhedurch. [μm]	Max-Durchm. [μm]	Dilatation [μm]	Dilatation [%]	Maximum nach [s]	50%-Rückb. nach [s]
lokal	$31,5 \pm 1,3$	$48,9 \pm 1,9$	$17,4 \pm 2,2$	$71,1 \pm 4,8$	$12,9 \pm 1,0$	$32,3 \pm 3,9$
fern	$28,1 \pm 1,6$	$36,2 \pm 1,8$	$8,1 \pm 0,9$	$31,0 \pm 4,2$	$8,8 \pm 0,9$	$23,6 \pm 4,1$

Tab. 2: Zusammenfassung der lokalen und fortgeleiteten Dilatation nach Acetylcholin-Stimulation, angegeben in absoluten und normalisierten Werten (Prozent der Dilatationskapazität). Die Ruhedurchmesser an lokalen und entfernten Stelle waren nicht signifikant verschieden ($p > 0,05$).

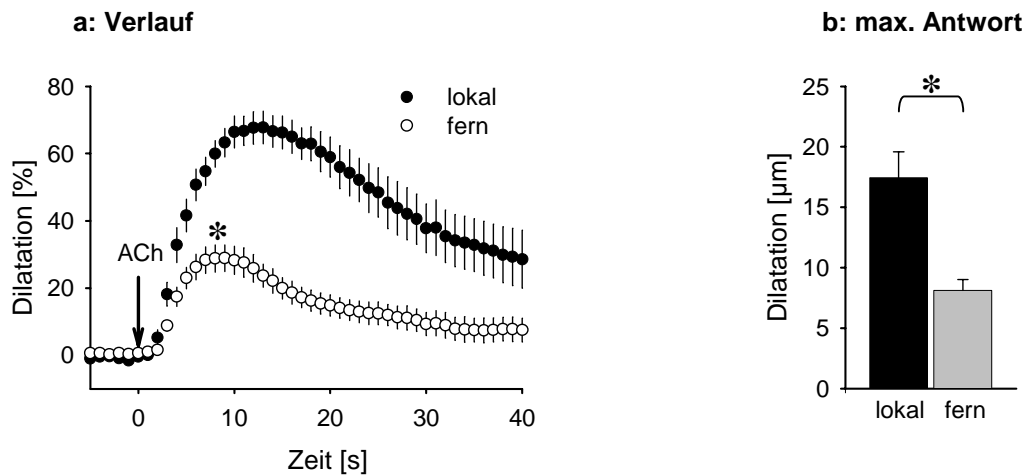


Abb. 3.4: (a) Gemittelter zeitlichen Verlauf der Dilatation an lokalen und entfernten Stellen, angegeben in Prozent der Dilatationskapazität. (b) Maximum der Antwort in absoluten Werten. Die ferne Antwort war signifikant kleiner als die lokale Antwort ($p < 0,01$, Stern). Acetylcholin erzeugte fortgeleitete Vasodilatationen.

3.2.2 Nitroprussid-Natrium

Die lokalisierte Stimulation von Arteriolen mit dem enzymunabhängigen NO-Donator Nitroprussid-Natrium (SNP) führte zu einer starken lokalen Vasodilatation. Ausgehend von einem Durchmesser von $32 \pm 2 \mu\text{m}$ erweiterten sich die Gefäße um $20 \pm 4 \mu\text{m}$ auf $52 \pm 3 \mu\text{m}$. Damit war die lokale Dilatation mindestens ebenso stark wie die der Acetylcholin-Kontrolle an den selben Arteriolen (lokale Dilatation um $18,2 \pm 4 \mu\text{m}$).

Im Gegensatz zu Acetylcholin blieb die Nitroprussid-Dilatation aber auf die unmittelbare Umgebung der Applikationsstelle beschränkt. An den entfernten Beobachtungsstellen, die im Mittel $742 \pm 52 \mu\text{m}$ stromauf der lokalen Stelle lagen, war keine signifikante Dilatation mehr zu beobachten ($1,5 \pm 1,3 \mu\text{m}$, $p = 0,16$, einseitiger t-Test). Acetylcholin führte an den gleichen Gefäßen zu einer fortgeleiteten Dilatation von $10,0 \pm 1 \mu\text{m}$. Den genauen zeitlichen Verlauf des Durchmessers an den lokalen und entfernten Stellen zeigt Abbildung 3.5. Die Daten stammen aus 5 Gefäßen in 5 Versuchen und sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Stelle	Ruhedurchm. [μm]	Maximaldurchm. [μm]	Dilatation [μm]	ACh-Kontrolle [μm]
lokal	$32,0 \pm 2,4$	$51,8 \pm 3,0$	$+ 19,8 \pm 3,6$	$+ 18,2 \pm 4,0$
742 \pm 52 μm	$27,6 \pm 3,9$	$29,1 \pm 3,7$	$+ 1,5 \pm 1,3$	$+ 10,0 \pm 1,7$

Tab. 3: Gefäßantwort auf lokalisierte Applikation von Nitroprussid und Acetylcholin-Kontrolle an den selben Gefäßen (letzte Spalte).

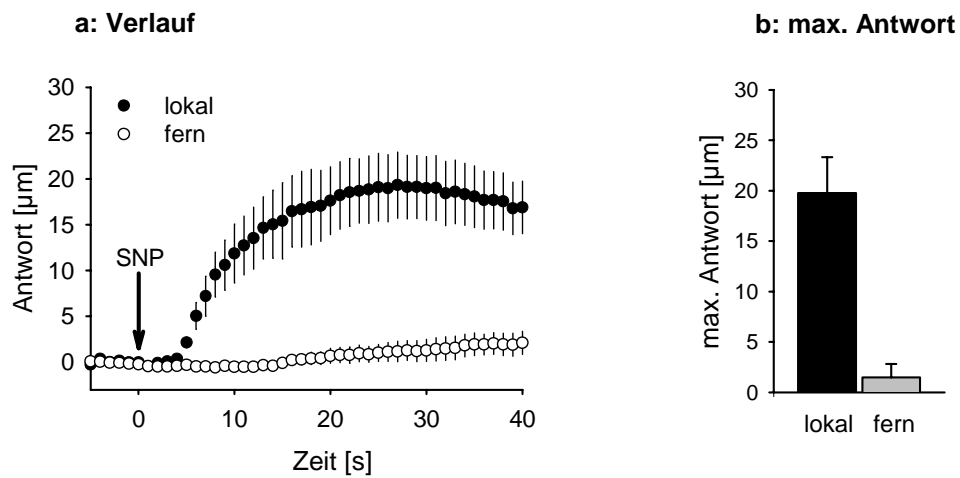


Abb. 3.5: (a) Gemittelter zeitlichen Verlauf der Dilatation an lokalen und entfernten Stellen bei Stimulation mit Nitroprussid (SNP). (b) Maximum der Antworten bei SNP-Stimulation. SNP erzeugte trotz starker lokaler Vasodilatation keine signifikante fortgeleitete Dilatation.

3.3 Lokale Applikation von Vasokonstriktoren

Neben Vasodilatoren wurden auch Vasokonstriktoren in Bezug auf die Fortleitung lokaler Antworten untersucht. Dazu wurden Kaliumchlorid und Phenylephrin in gleicher Weise wie Acetylcholin mittels Mikropipette neben eine Arteriole injiziert.

3.3.1 Kaliumchlorid

Um die Fortleitung einer rezeptorunabhängig ausgelösten Konstriktion zu überprüfen, wurden Arteriolen lokalisiert mit 3 molarer Kaliumchlorid-Lösung (KCl) stimuliert. An der Stimulationsstelle konstringierten die Gefäße nach KCl-Gabe im Mittel um $14 \pm 3 \mu\text{m}$, ausgehend von einem Ruhedurchmesser von $47 \pm 6 \mu\text{m}$. Die Konstriktionen breiteten sich sehr gut entlang des Gefäßes aus und waren auch an entfernten Stellen zu beobachten. So betrug die Vasokonstriktion 670 μm entfernt der Stimulationsstelle im Mittel $12 \pm 2 \mu\text{m}$ und war nicht signifikant kleiner als die lokale Reaktion ($p=0,19$). 1340 μm entfernt war ebenfalls noch eine signifikante Konstriktion ($7 \pm 1 \mu\text{m}$) zu beobachten, die allerdings kleiner war als die Konstriktion an der 670 μm entfernten Stelle und der Stimulationsstelle ($p<0,05$). Aus diesen Daten lässt sich die mechanische Längskonstante berechnen, die angibt nach welcher Strecke ein passiv fortgeleitetes Ereignis auf $1/e$ (ca. 37 %) abgefallen ist. Sie betrug für die Fortleitung der KCl-Konstriktionen $2019 \pm 619 \mu\text{m}$. Im Vergleich zu den Acetylcholin- und Phenylephrin-Antworten war die Konstriktion nach einem KCl-Bolus relativ kurz. Die Zeit bis zur Rückbildung der Antwort um 50 % betrug lokal und an der fernen Stellen ca. 12 Sekunden, wobei sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Beobachtungsstellen ergab (lokal $12 \pm 1 \text{ s}$, 670 μm stromaufwärts $12 \pm 0,9 \text{ s}$, 1340 μm stromauf $11,4 \pm 0,5 \text{ s}$).

Die Daten stammen aus 5 Gefäßen aus 4 Versuchen und sind in Abbildung 3.6 und Tabelle 4 zusammenfassend dargestellt.

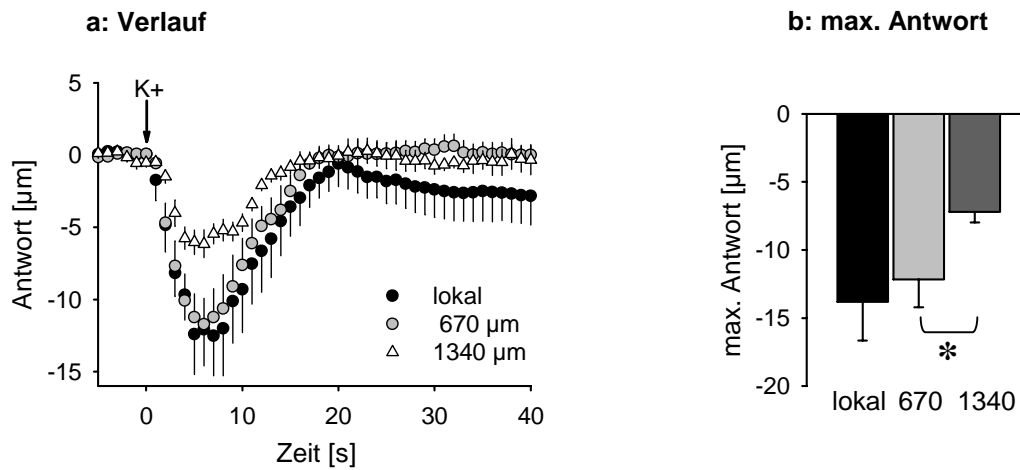


Abb. 3.6: (a) Gemittelter zeitlichen Verlauf der Antwort an lokaler und entfernten Stellen. (b) Antwortmaximum an lokaler, 670 μm und 1340 μm entfernten Stellen in absoluten Werten. Kaliumchlorid erzeugte eine signifikante fortgeleitete Vasomotorantwort. Der Unterschied zwischen lokaler Konstriktion und Konstriktion bei 670 μm war nicht signifikant, während die Antwort von 670 auf 1340 μm signifikant kleiner wurde ($p=0,186$ bzw. $0,029$).

3.3.2 Phenylephrin

Als Auslöser einer rezeptorabhängig ausgelösten Vasokonstriktion wurde der α_1 -Agonist Phenylephrin (PE) untersucht. An der Stimulationsstelle erzeugte Phenylephrin eine starke Vasokonstriktion, der Gefäßdurchmesser nahm von $40 \pm 5 \mu\text{m}$ in Ruhe um $25 \pm 4 \mu\text{m}$ auf $14 \pm 1 \mu\text{m}$ ab. An den entfernten Beobachtungsstellen, die durchschnittlich $746 \pm 76 \mu\text{m}$ stromaufwärts der Stimulationsstelle lagen, änderte sich der Durchmesser dagegen nur um $-0,3 \pm 0,4 \mu\text{m}$. Diese Änderung war nicht signifikant ($p=0,26$).

Phenylephrin erzeugte somit im Gegensatz zu Kaliumchlorid keine entfernte Gefäßreaktion, obwohl die Konstriktion an der Stimulationsstelle deutlich stärker war als bei KCl-Stimulation (KCl: $13,8 \pm 3 \mu\text{m}$). Um die Intaktheit der Gefäße zu überprüfen, wurde nach Phenylephrin die Fortleitung von Acetylcholin-Antworten getestet. Diese wurden in allen Fällen fortgeleitet. Phenylephrin war also nicht in der Lage, fortgeleitete Antworten auszulösen, obwohl es starke lokale Konstriktionen auslöste und die Gefäße zur Fortleitung in der Lage waren.

Die Dauer der lokalen Konstriktion war mit $37,4 \pm 4 \text{ s}$ bis zur Rückbildung auf 50 % nicht signifikant verschieden von der Dauer der durch Acetylcholin ausgelösten Dilatation ($32,3 \pm 4 \text{ s}$), aber signifikant länger als KCl-Konstriktionen ($12 \pm 1 \text{ s}$). Die Daten stammen von 5 Gefäßen aus 4 Versuchen und sind in Abbildung 3.7 und Tabelle 4 zusammengefasst.

Stimulus	Stelle [μm]	Ruhedurchm. [μm]	Minimaldurchmesser [μm]	Antwort [μm]	Dauer bis 50% [s]	ACh-Antwort [μm]
PE	lokal	$39,7 \pm 4,8$	$14,4 \pm 1,2$	$- 25,3 \pm 4,4$	$37,4 \pm 3,5$	$+ 20,6 \pm 1,3$
	746 ± 76	$34,0 \pm 3,2$	$33,7 \pm 3,5$	$- 0,3 \pm 0,4$	-	$+ 9,8 \pm 0,8$
KCl	lokal	$47,0 \pm 5,6$	$33,1 \pm 5,3$	$- 13,8 \pm 2,8$	$12 \pm 1,0$	-
	670	$44,9 \pm 7,3$	$32,7 \pm 8,0$	$- 12,2 \pm 2,0$	$12 \pm 0,9$	-
	1340	$43,3 \pm 7,1$	$36,1 \pm 7,5$	$- 7,2 \pm 0,8$	$11,4 \pm 0,5$	-

Tab. 4: Gefäßantwort auf lokalisierte Applikation von Phenylephrin (PE) und 3 M Kaliumchlorid-Lösung (KCl). ‚Dauer bis 50%‘ entspricht der Zeit, bis die Antwort wieder auf 50 % der Maximalantwort abgenommen hatte. Für Phenylephrin wurde eine Acetylcholin-Kontrolle an den selben Gefäßen durchgeführt (ACh-Antwort).

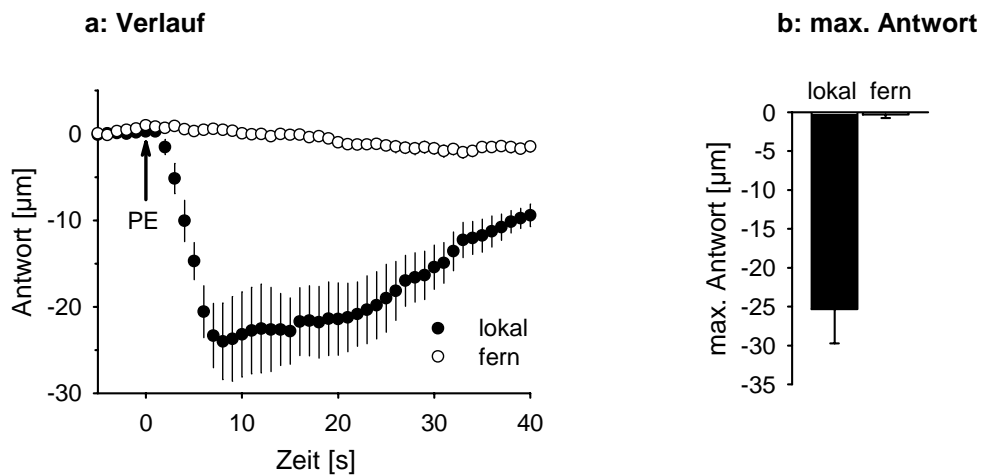


Abb. 3.7: (a) Gemittelter zeitlicher Verlauf der Antwort an lokalen und fernen Stellen, angegeben in μm . (b) Maximum der Antwort.

An den entfernten Beobachtungsstellen war keine signifikante Vasokonstriktion zu beobachten. Phenylephrin-induzierte Vasokonstriktionen wurden nicht entlang des Gefäßes fortgeleitet.

3.3.3 Kontrolle mit Mikroinjektion von NaCl-Lösung

Um auszuschließen, dass der mechanische Reiz der Ejektion aus der Mikropipette einen Einfluss auf den Gefäßdurchmesser hatte, wurde 0,9 % NaCl-Lösung neben eine Arteriole injiziert. Der Ausstoß von Flüssigkeitsvolumen konnte dabei durch ein kurzes Auseinanderweichen des Gewebes verifiziert werden.

Der Ruhedurchmesser der untersuchten Arteriolen betrug $30 \pm 4 \mu\text{m}$, der Extremdurchmesser nach Stimulation $31 \pm 4 \mu\text{m}$, mit einer mittleren Antwort von $+0,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$. Die Flüssigkeitsapplikation an sich hatte also keinen Einfluss auf den Gefäßdurchmesser. Es wurden 3 Gefäße in 2 Versuchen untersucht.

3.4 Potentielle Änderungen des Schergrades während fortgeleiteter Vasodilatationen

Während der Dilatation nach Acetylcholingabe ließ sich oft mit bloßem Auge feststellen, dass die Flussgeschwindigkeit des Blutes an der Stimulationsstelle stark abnahm, an den entfernten Stellen jedoch für einen kurzen Moment anstieg. Dies könnte möglicherweise an den entfernten Stellen zu einem Anstieg der Wandschubspannung führen, welcher per se eine Vasodilatation auslösen kann. Um diese Möglichkeit besser einzuschätzen, wurden die Flussgeschwindigkeit und der Durchmesser an beiden Stellen nacheinander kontinuierlich gemessen, um daraus die Änderung des Schergrades während fortgeleiteter Antworten auf Acetylcholin zu bestimmen. Unter der Annahme gleichbleibender Viskosität des Blutes ändert sich die Wandschubspannung linear mit dem Schergrad.

Lokal führte die Stimulation mit Acetylcholin auch in dieser Serie zu einer deutlichen Vasodilatation. Der Durchmesser nahm von $29 \pm 3 \mu\text{m}$ in Ruhe auf einen Maximalwert von $52 \pm 4 \mu\text{m}$ zu, mit einer mittleren Dilatation von $23 \pm 3 \mu\text{m}$. Gleichzeitig kam es zu einer Abnahme der Erythrozytenflussgeschwindigkeit (EFG) von $3,7 \pm 0,5$ auf $1,6 \pm 0,3 \text{ mm/s}$, was einer mittleren Abnahme von $44 \pm 5 \%$ entspricht. Beides bewirkte gleichsinnig einen Abfall des Schergrades um $64 \pm 5 \%$, von 650 ± 98 auf $164 \pm 32 /\text{s}$.

An der entfernten Beobachtungsstelle, $1411 \pm 172 \mu\text{m}$ stromaufwärts, war eine fortgeleitete Vasodilatation zu beobachten. Der Durchmesser nahm von $29 \pm 2 \mu\text{m}$ auf $38 \pm 3 \mu\text{m}$ zu. Die mittlere Dilatation betrug $9 \pm 1 \mu\text{m}$. Gleichzeitig erhöhte sich hier die Flussgeschwindigkeit kurzzeitig von $4,1 \pm 0,7$ auf $5,2 \pm 0,8 \text{ mm/s}$ mit einer mittleren Zunahme von $1,1 \pm 0,2 \text{ mm/s}$ oder $16 \pm 5 \%$. Die Durchmesserzunahme, die simultan mit dem Anstieg der Flussgeschwindigkeit erfolgte, führte dazu, dass der Schergrad initial konstant blieb. Im weiteren Verlauf sank der Schergrad bei wieder abnehmender Flussgeschwindigkeit und weiter zunehmendem Durchmesser sogar ab. Im Maximum der Acetylcholin-Antwort sank der Schergrad signifikant um $16 \pm 4 \%$, von $725 \pm 106 /\text{s}$ in Ruhe auf einen Minimalwert von $539 \pm 79 /\text{s}$ (siehe Abb. 3.8). Die Daten stammen von 8 Gefäßen aus 8 Experimenten und sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

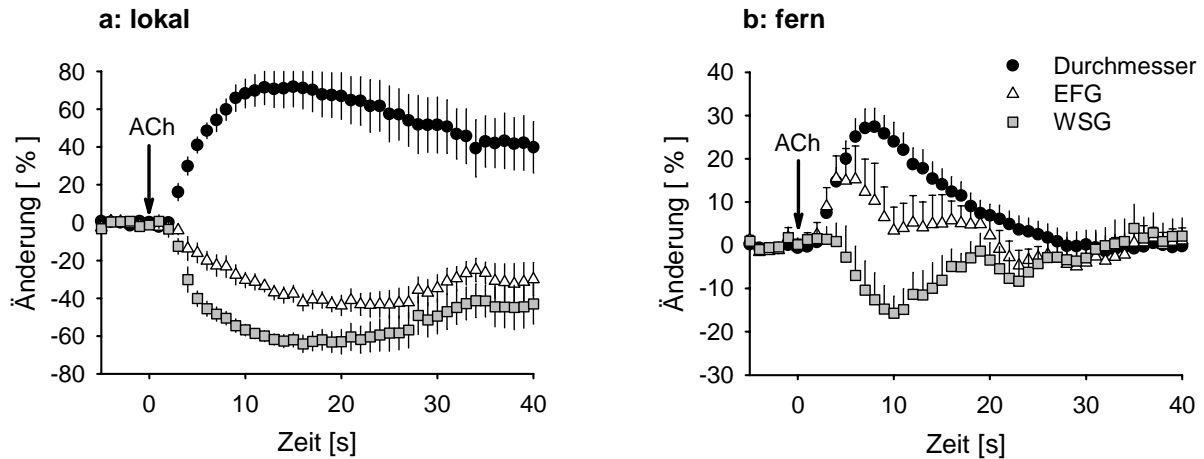


Abb. 3.8: Zeitlicher Verlauf von Durchmesser, Erythrozytenflussgeschwindigkeit (EFG) und Schergrad (WSG). Ein Punkt entspricht dem Wert einer Sekunde und ist als prozentuale Änderung des Ruhewertes angegeben.

(a) Lokal erzeugte Acetylcholin eine Dilatation und Abnahme der Flussgeschwindigkeit. Der Schergrad nahm dadurch deutlich ab.

(b) Entfernt der Stimulationsstelle ($1411 \pm 172 \mu\text{m}$ stromaufwärts) war eine fortgeleitete Dilatation und ein kurzzeitiger Anstieg der Flussgeschwindigkeit zu beobachten. Der Schergrad stieg aber zu keinem Zeitpunkt an sondern nahm während des Maximums der Dilatation signifikant ab ($p < 0,01$).

Stelle	Größe	Ruhewert	Extremwert	max. Antwort (absolut)	max. Antwort [%]
lokal	Durchm	$29,4 \pm 2,9 \mu\text{m}$	$52,1 \pm 4,0 \mu\text{m}$	$+ 22,7 \pm 2,9 \mu\text{m}$	$+ 71,8 \pm 10,6$
	EFG	$3,7 \pm 0,5 \text{ mm/s}$	$1,6 \pm 0,3 \text{ mm/s}$	$- 2,1 \pm 0,4 \text{ mm/s}$	$- 43,8 \pm 5,4$
	SG	$650 \pm 98 \text{ /s}$	$164 \pm 32,1 \text{ /s}$	$- 486 \pm 83 \text{ /s}$	$- 64,1 \pm 4,6$
fern	Durchm	$28,9 \pm 1,7 \mu\text{m}$	$37,7 \pm 2,7 \mu\text{m}$	$+ 8,8 \pm 1,3 \mu\text{m}$	$+ 27,4 \pm 4,3$
	EFG	$4,1 \pm 0,7 \text{ mm/s}$	$5,2 \pm 0,8 \text{ mm/s}$	$+ 1,1 \pm 0,2 \text{ mm/s}$	$+ 15,5 \pm 5,2$
	SG	$725 \pm 106 \text{ /s}$	$539 \pm 78,5 \text{ /s}$	$- 186 \pm 55,3 \text{ /s}$	$- 15,8 \pm 4,0$

Tab. 5: Zusammenfassung von Gefäßdurchmesser (Durchm), Erythrozytenflussgeschwindigkeit (EFG) und Schergrad (SG) an lokalen und entfernten Stellen nach Stimulation mit Acetylcholin. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ruhewerten an der Stimulationsstelle und den entfernten Beobachtungsstellen ($p=0,83$ für Durchm, $p=0,41$ für EFG, $p=0,49$ für SG).

3.5 Hemmung der NO-Synthase und Cyclooxygenase

Um zu analysieren welche Rolle die einzelnen endothelialen Autakoide bei fortgeleiteten Dilatationen auf Acetylcholin spielen, wurden die NO-Synthase (NOS) und die Cyclooxygenase (COX) gehemmt. Dazu wurde der Superfusion der NOS-Inhibitor N^ω-nitro-L-arginin (L-NA, 30 μM) und der COX-Inhibitor Indomethacin (Indo, 3 μM) beigegeben. Diese Versuche wurden unter Pentobarbitalnarkose und unter Neuroleptnarkose durchgeführt und getrennt ausgewertet, um die Auswirkungen verschiedener Narkotika zu untersuchen.

3.5.1 Pentobarbitalnarkose

Ohne Enzymblockade nahm der lokale Durchmesser nach Stimulation mit Acetylcholin von $31 \pm 2 \mu\text{m}$ auf $48 \pm 2 \mu\text{m}$ zu, mit einer mittleren Dilatation von $17 \pm 3 \mu\text{m}$ oder $71 \pm 4 \%$ der Dilatationskapazität. Die Dilatation an der entfernten Position betrug $6,8 \pm 0,6 \mu\text{m}$ ($26 \pm 4 \%$).

Nach 20-minütiger Superfusion des Cremasters mit L-NA und Indomethacin betrug die lokale Dilatation noch $13 \pm 2 \mu\text{m}$ oder $43 \pm 5 \%$ und hatte damit signifikant abgenommen ($p < 0,01$). Die fortgeleitete Dilatation war mit $4,7 \pm 1 \mu\text{m}$ oder $15,5 \pm 4 \%$ ebenfalls signifikant kleiner ($p < 0,05$) als ohne L-NA und Indomethacin. Die NOS- und COX-Hemmung führte zudem zu einer signifikanten Abnahme des Ruhedurchmessers von $27,7 \pm 1,6 \mu\text{m}$ auf $23,8 \pm 1,4 \mu\text{m}$ ($p < 0,05$). Der Ruhedurchmesser wurde an den entfernten Stellen gemessen, um Einflüsse durch die Platzierung der Stimulationspipette auszuschließen. Die entfernte Stelle lag im Mittel $1010 \pm 90 \mu\text{m}$ stromaufwärts von der Stimulationsstelle.

Die Daten stammen von 6 Gefäßen aus 6 Versuchen und sind in Abbildung 3.9 und Tabelle 6 zusammengefasst.

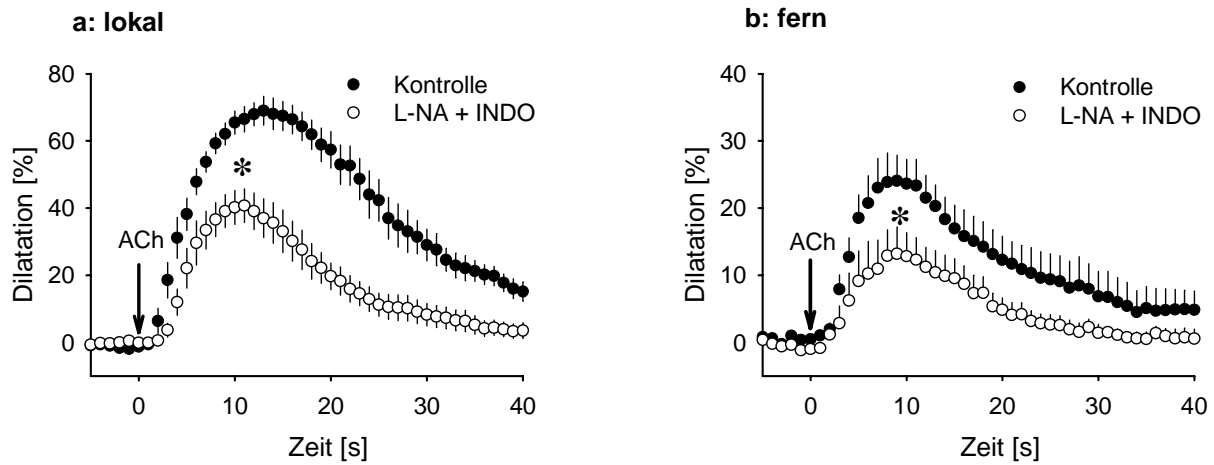


Abb. 3.9: Verlauf der lokalen und entfernten Dilatation auf Acetylcholin ohne Behandlung (Kontrolle) und bei Superfusion mit L-NA und Indomethacin in Prozent der Dilatationskapazität. Hemmung der NOS und COX führte zu einer signifikanten Abschwächung der lokalen (a) und der entfernten (b) Dilatation (Stern).

Stelle	Behandlung	Ruhedurchm. [μm]	Extremdurchm. [μm]	Dilatation [μm]	Dilatation [%]
lokal	-	31,1 \pm 1,9	48,0 \pm 2,1	17,0 \pm 2,7	71,3 \pm 4,2
	L-NA + Indo	25,2 \pm 1,6	37,8 \pm 3,0	12,6 \pm 1,6	43,2 \pm 5,0
fern (1010 μm)	-	27,7 \pm 1,6	34,5 \pm 1,6	6,8 \pm 0,6	25,8 \pm 3,7
	L-NA + Indo	23,8 \pm 1,4	28,5 \pm 0,7	4,7 \pm 1,0	15,5 \pm 4,0

Tab. 6: Zusammenfassung der lokalen und fortgeleiteten Dilatation auf Acetylcholin ohne Behandlung und unter Superfusion mit L-NA und Indomethacin. Die maximale Antwort ist in absoluten Werten und normalisiert (Prozent der Dilatationskapazität) angegeben.

3.5.2 Neuroleptnarkose

In einer weitere Serie wurde anstatt von Pentobarbital eine Kombination von Fentanyl, Midazolam und Droperidol zur Narkose verwendet, um mögliche Nebeneffekte des Barbiturates auf die NO- und COX-unabhängige Acetylcholin-Antwort zu untersuchen.

Unter Kontrollbedingungen, ohne Enzyminhibition, führte Acetylcholin lokal zu einer Dilatation von $19 \pm 2 \mu\text{m}$ auf $29 \pm 0,4 \mu\text{m}$, mit einer mittleren Antwort von $+10 \pm 1 \mu\text{m}$. Das entspricht $72 \pm 8 \%$ der Dilatationskapazität und war nicht signifikant verschieden von der lokalen Antwort unter Narkose mit Pentobarbital. $670 \mu\text{m}$ stromaufwärts der Stimulationsstelle dilatierte das Gefäß um $6,4 \pm 0,7 \mu\text{m}$ oder $40 \pm 5 \%$.

Nach Superfusion mit L-NA und Indomethacin betrug die lokale Dilatation noch $9 \pm 1 \mu\text{m}$ oder $60 \pm 3 \%$. Entfernt nahm der Gefäßdurchmesser bei Stimulation um $6,9 \pm 2 \mu\text{m}$ ($36 \pm 7 \%$) zu. Somit nahm weder lokal noch entfernt das Maximum der Antwort signifikant ab ($p=0,081$ lokal, $p=0,15$ fern). Bei der Analyse des zeitlichen Verlaufes fällt eine Verkürzung der lokalen Antwort nach L-NA- und Indomethacin-Superfusion auf. Dies lässt sich am Integral der ersten 30 Sekunden der Antwort ablesen, welches lokal von 1749 ± 214 auf $884 \pm 158 \%$ ·s signifikant abnahm ($p=0,025$). An der fernen Stelle war keine signifikante Abnahme zu beobachten (von 493 ± 172 auf $310 \pm 209 \%$ ·s, $p=0,092$). Die Daten stammen von 4 Gefäßen aus 4 Versuchen und sind in Abbildung 3.10 und Tabelle 7 zusammengefasst.

Stelle	Behandlung	Ruhedurch. [μm]	max.Durch. [μm]	Dilatation [μm]	Dilatation [%]	30s-Integral [%·s]
lokal	-	$19,4 \pm 1,7$	$29,2 \pm 0,4$	$9,8 \pm 1,4$	$71,6 \pm 7,7$	1749 ± 214
	L-NA+Indo	$18,6 \pm 1,9$	$27,3 \pm 1,0$	$8,7 \pm 1,0$	$60,0 \pm 2,5$	884 ± 158
fern ($670 \mu\text{m}$)	-	$19,6 \pm 1,7$	$26,0 \pm 2,4$	$6,4 \pm 0,7$	$40,4 \pm 5,3$	493 ± 172
	L-NA+Indo	$16,6 \pm 2,1$	$23,4 \pm 2,9$	$6,9 \pm 2,0$	$35,9 \pm 7,4$	310 ± 209

Tab. 7: Lokale und fortgeleitete Dilatation nach Acetylcholin-Stimulation ohne Behandlung und in Anwesenheit von L-NA und Indomethacin. Die maximale Antwort ist in absoluten und normalisierten Werten (Prozent der Dilatationskapazität) angegeben.

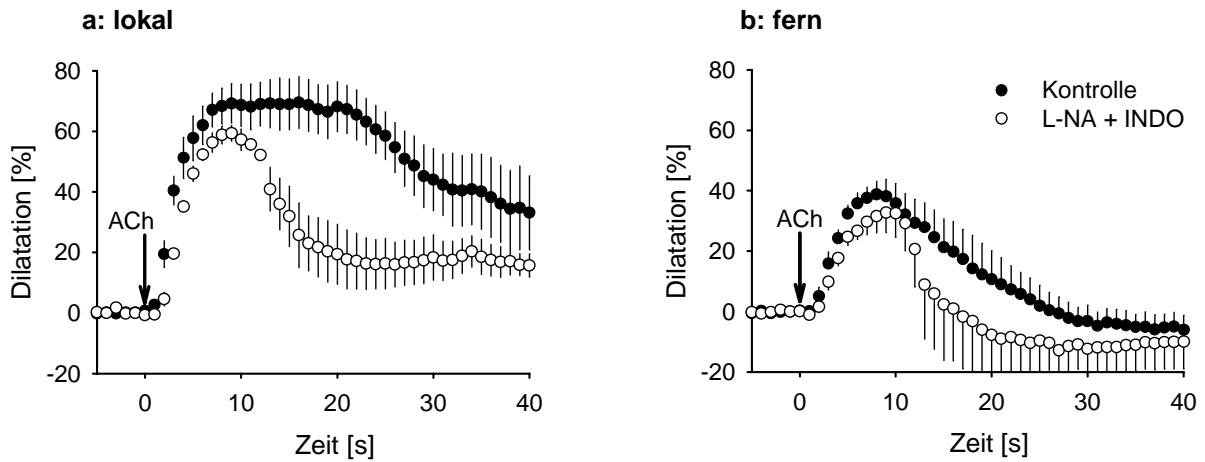


Abb. 3.10: Verlauf der lokalen (a) und entfernten (b) Acetylcholin-Antwort ohne Behandlung (Kontrolle) und bei Superfusion mit L-NA und Indomethacin, angegeben in Prozent der Dilatationskapazität. Durch Blockade der NOS und COX wurde das Maximum der lokalen und der entfernten Dilatation nicht signifikant abgeschwächt. Die lokale Antwort war jedoch deutlich verkürzt, was sich im 30s-Integral zeigt (siehe Abbildung 3.11).

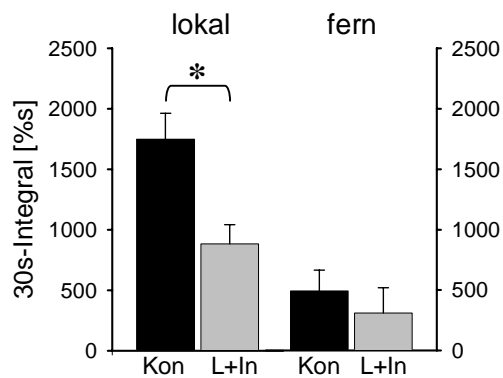


Abb. 3.11: Integral der ersten 30 s der lokalen und entfernten Acetylcholin-Antworten. Durch Blockade der NOS und COX nahm das 30s-Integral der Antwort an der lokalen Stelle signifikant ab, während es an der entfernten Stelle nicht verändert war.

3.6 Cytochrom P450 2C8/9-Hemmung durch Sulfaphenazol

Um den Anteil von EDHF an den Mediatoren der Acetylcholin-Antwort zu bestimmen, wurde die vermutliche EDHF-Synthase Cytochrom P450 2C8/9 mit Sulfaphenazol gehemmt. Die NO-Synthase und Cyclooxygenase waren während des gesamten Versuches mit L-NA und Indomethacin blockiert.

Nach Zugabe von Sulfaphenazol (20 μM) zur Superfusion und 20-minütiger Inkubationszeit waren die ersten Vasodilatationen noch nicht abgeschwächt. Nach ca. 2 Stimulationen nahm die Reaktion auf Acetylcholin aber schlagartig ab. Eine Verdoppelung der Inkubationszeit oder Erhöhung der Sulfaphenazolkonzentration änderte dieses Verhalten nicht. Die Antworten unter Sulfaphenazol wurden deshalb in zwei Gruppen, Sulfa_{früh} und Sulfa_{spät}, eingeteilt, wobei die Früh-Gruppe die noch nicht vollständig abgeschwächten Antworten und die Spät-Gruppe die abgeschwächten Antworten enthält, die auch nach weiteren Stimulationen stabil blieben. Die entfernten Antworten bestehen nur aus Spät-Antworten, da zur Beobachtung der fernen Stellen erst übergegangen wurde, nachdem sich die lokale Antwort stabilisiert hatte.

Vor Sulfaphenazol dilatierte die Arteriole an der Stimulationsstelle von 25 ± 2 auf 44 ± 4 μm , die mittlere Dilatation betrug 20 ± 3 μm oder 69 ± 10 %. An der entfernten Beobachtungsstelle (670 μm stromaufwärts) betrug die Dilatation 9 ± 1 μm (26 ± 4 %).

Unter Sulfaphenazol nahm die lokale Dilatation nach Acetylcholin-Stimulation zuerst nur leicht ab (Sulfa_{früh}) und betrug noch 12 ± 5 μm oder 55 ± 16 %. Zur vollständiger Entfaltung der Sulfaphenazolwirkung waren durchschnittlich $1,8 \pm 0,7$ Stimulationen notwendig. Danach betrug die Dilatation (Sulfa_{spät}) nur noch $6,5 \pm 2$ μm oder 23 ± 5 % und war damit signifikant kleiner als ohne Sulfaphenazol ($p < 0,01$). Die Dilatation an der entfernten Stelle hatte auf $2,2 \pm 0,8$ μm ($6,4 \pm 2,2$ %) abgenommen, was ebenfalls signifikant war ($p < 0,01$).

Der Ruhedurchmesser in Anwesenheit von L-NA und Indomethacin änderte sich bei Zugabe von Sulfaphenazol nicht ($23,1 \pm 2$ vs. $23,4 \pm 2$ μm). In dieser Versuchsserie wurden Fentanyl, Droperidol und Midazolam zur Narkose verwendet. Die Daten stammen von 5 Gefäßen aus 5 Versuchen und sind in Tabelle 8 und den Abbildungen 3.12 und 3.13 zusammengefasst.

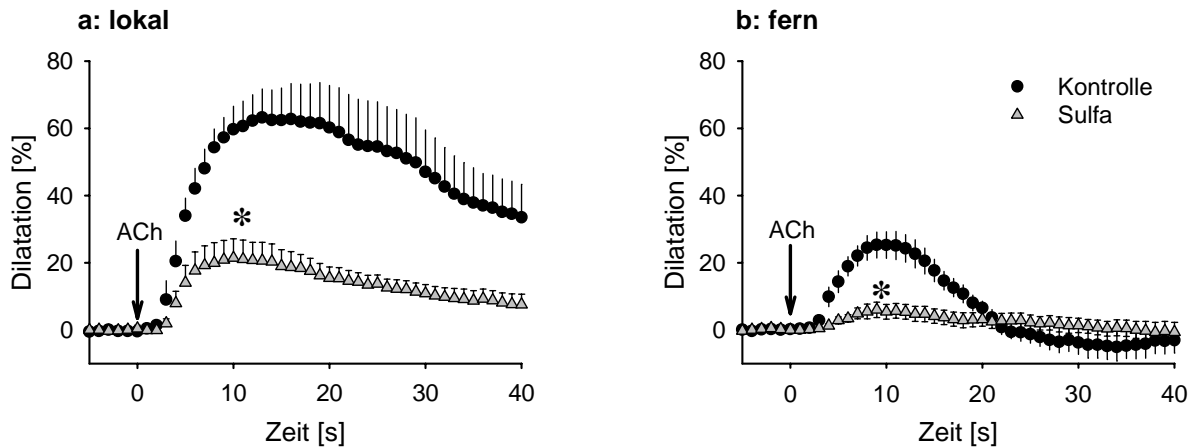


Abb. 3.12: Verlauf der Acetylcholin-Antworten an lokaler (a) und 670 μm entfernter Stelle (b) in Anwesenheit von L-NA und Indomethacin (Kontrolle), verglichen mit Antworten bei zusätzlicher Superfusion mit Sulfaphenazol (Sulfa). Durch Sulfaphenazol wurden lokale und fortgeleitete Dilatationen signifikant abgeschwächt ($p < 0,01$, Stern)

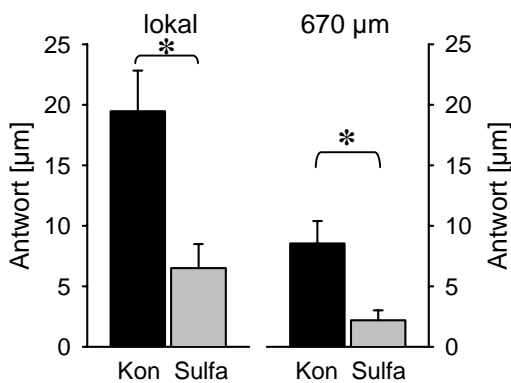


Abb. 3.13: Maximum der Acetylcholin-Antworten an der lokalen und entfernten Stelle bei Superfusion mit L-NA und Indo (Kontrolle), verglichen mit Antworten bei zusätzlicher Superfusion mit Sulfaphenazol (Sulfa). Sulfaphenazol schwächte die lokale und fortgeleitete Dilatation signifikant ab (jeweils $p < 0,01$, Stern).

Stelle	Behandlung	Ruhedurchm. [μm]	Extremdurch. [μm]	max. Antwort [μm]	max. Antwort [%]
lokal	Kontrolle	24,8 \pm 2,1	44,4 \pm 3,8	+ 19,5 \pm 3,4	+ 68,6 \pm 9,6
	+ Sulfa _{früh}	31,1 \pm 2,9	43,2 \pm 2,7	+ 12,0 \pm 4,7	+ 54,5 \pm 16,2
	+ Sulfa _{spät}	26,5 \pm 3,2	33,0 \pm 2,0	+ 6,5 \pm 2,0	+ 22,8 \pm 5,3
670 μm	Kontrolle	23,1 \pm 2,1	31,7 \pm 1,6	+ 8,5 \pm 1,3	+ 26,0 \pm 4,0
	+ Sulfa _{spät}	23,4 \pm 1,7	25,6 \pm 0,9	+ 2,2 \pm 0,8	+ 6,4 \pm 2,2

Tab. 8: Zusammenfassung der lokalen und fortgeleiteten (670 μm) Vasodilatation auf Acetylcholin-Stimulation unter Superfusion mit L-NA und Indo (Kontrolle), verglichen mit Antworten bei zusätzlicher Superfusion mit Sulfaphenazol (Sulfa). Die maximale Antwort ist in absoluten und normalisierten Werten (Prozent der Dilatationskapazität) angegeben. Sulfa_{früh} entspricht den ersten 1,8 \pm 0,7 Stimulationen nach Sulfaphenazol-Inkubation.

3.7 Lokalisierte Hemmung von K_{Ca} -Kanälen durch Iberitotoxin und Charybdotoxin

Durch die sequentielle Blockade der NO-Synthase, Cyclooxygenase und der vermutlichen EDHF-Synthase Cytochrom P450 2C8/9 zeigte sich, welche zentrale Rolle EDHF bei der Gefäßantwort auf lokalisierte Mikrobolus-Applikation von Acetylcholin spielt. Sowohl die lokale Vasodilatation, als auch die fortgeleiteten Antworten waren stark von Cytochrom P450-Produkt(en) und nur wenig von NO und Cyclooxygenaseprodukten abhängig. Eine EDHF-Produktion und -wirkung an der Stimulationsstelle ist somit anzunehmen.

Die bisherigen Ergebnisse lassen allerdings offen, ob EDHF auch an den entfernten Stellen gebildet wird und dort eine direkte Wirkung entfaltet. An den entfernten Stellen besteht keine direkte Acetylcholin-Wirkung, EDHF könnte dort aber dennoch notwendig sein, um ein elektrotonisch fortgeleitetes Signal in eine Vasomotorantwort umzusetzen. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die EDHF-Wirkung über eine Blockade der kalziumabhängigen Kaliumkanäle unterbunden. Dazu wurde das auf large-conductance Kaliumkanäle wirkende Iberitotoxin (IbTX) und in einer weiteren Versuchsreihe das intermediate (IK_{Ca}) und large-conductance (BK_{Ca}) Kaliumkanäle blockierende Charybdotoxin (ChTX) verwendet. Die Kanalblocker wurden entweder nur an der Applikationsstelle oder nur an der fernen Beobachtungsstelle mit einer Mikropipette mit mehreren Ejektionen neben die Arteriole injiziert. Auf diese Weise sollte beurteilt werden, ob an der jeweiligen Stelle kalziumabhängige Kaliumkanäle aktiviert werden. Die NO-Synthase und Cyclooxygenase wurden während des gesamten Versuches durch Superfusion von L-NA (30 μ M) und Indomethacin (3 μ M) gehemmt.

An der Stimulationsstelle betrug die Acetylcholin-Dilatation 55 ± 8 %, die Arteriole erweiterte sich von 22 ± 4 μ m auf 35 ± 4 μ m. Nach mehrfacher Injektion von Iberitotoxin um die Stimulationsstelle war keine signifikante lokale Vasodilatation mehr zu beobachten. Der Gefäß dilatierte nur noch um 5 ± 2 % von 27 ± 4 μ m auf 28 ± 5 μ m.

An der entfernten Beobachtungsstelle betrug die Dilatation der Arteriole ohne Iberiotoxin 36 ± 10 % (von 17 ± 2 μm auf 25 ± 3 μm). Wurde Iberiotoxin um die entfernte Stelle injiziert, dilatierete sie noch um 29 ± 8 % (17 ± 2 μm auf 23 ± 2 μm). Dieser Unterschied war nicht signifikant, die entfernte Antwort wurde also nicht abgeschwächt ($p > 0,05$). Die Daten zu Iberiotoxin stammen für die lokale und entfernte Stelle von jeweils 5 Gefäßen aus insgesamt 7 Versuchen. Da die lokale und entfernte Stelle nicht am selben Gefäß untersucht werden konnten, wurden die Daten als nicht gepaart betrachtet.

Die Wirkung von Charybdotoxin wurde analog zu der von Iberiotoxin untersucht, d.h. es wurde entweder nur an der Stimulationsstelle (lokal) oder nur an der entfernten Beobachtungsstelle appliziert. Unter L-NA und Indomethacin dilatierete die Arteriole nach Acetylcholin-Applikation um 46 ± 9 %, von 15 ± 3 μm auf einen Durchmesser von 27 ± 2 μm . Injektion von Charybdotoxin um die lokale Stelle verringerte die lokale Antwort signifikant. Das Gefäß dilatierete nur noch um 19 ± 5 % (von 18 ± 2 auf 22 ± 3 μm). Die fortgeleitete Antwort war nach Charybdotoxin-Applikation an der Stimulationsstelle ebenfalls signifikant abgeschwächt, sie fiel von 29 ± 4 % auf 10 ± 5 % ($p < 0,05$).

Wurde Charybdotoxin dagegen nur um die entfernte Beobachtungsstelle injiziert, hatte dies weder Auswirkungen auf die lokale (45 ± 4 % ohne ChTX vs. 47 ± 8 % mit ChTX) noch auf die entfernte Dilatation. Die Arteriole dilatierete an den entfernten Beobachtungsstellen unter Anwesenheit von L-NA und Indomethacin um 33 ± 4 %, von 13 ± 1 auf 20 ± 2 μm , und nach zusätzlicher Injektion von Charybdotoxin um 30 ± 6 % von 20 ± 2 auf 26 ± 2 μm . Um sicher zu stellen, dass Charybdotoxin die K_{Ca} -Kanäle an der entfernten Stelle wirksam blockierte, wurde Acetylcholin auch direkt an der fernen Beobachtungsstelle appliziert. Die Antwort auf die direkte Applikation von Acetylcholin war nach ChTX-Gabe signifikant abgeschwächt (51 ± 8 % vs. 24 ± 5 %). Die K_{Ca} -Kanäle waren an den entfernten Stellen also wirkungsvoll blockiert, die fortgeleiteten Antworten wurden dadurch aber nicht abgeschwächt.

Die Ergebnisse der Iberiotoxin- und Charybdotoxin-Untersuchungen sind in Tabelle 9 und den Abbildungen 3.14, 3.15 und 3.16 zusammengefasst.

Stelle	Behandlung	Ruhedurchm. [μm]	Maximaldurchm. [μm]	Dilatation [%]
lokal	Kon	22 ± 4	35 ± 4	55 ± 8
	IbTX lokal	27 ± 4	28 ± 5	5 ± 2
670 μm	Kon	17 ± 2	25 ± 3	36 ± 10
	IbTX 670 μm	17 ± 2	23 ± 2	29 ± 8
lokal	Kon	15 ± 3	27 ± 2	46 ± 9
	ChTX lokal	18 ± 2	22 ± 3	19 ± 5
670 μm	Kon	13 ± 1	20 ± 2	29 ± 4
	ChTX lokal	13 ± 2	15 ± 2	10 ± 5
670 μm	Kon	13 ± 1	20 ± 2	33 ± 4
	ChTX 670 μm	20 ± 2	26 ± 2	30 ± 6

Tab. 9: Lokale und fortgeleitete Dilatation auf lokale Acetylcholin-Stimulation in Anwesenheit von L-NA und Indomethacin (Kontrolle / Kon), verglichen mit Antworten nach zusätzlicher Mikroinjektion von Iberiotoxin (IbTX) bzw. Charybdotoxin (ChTX).

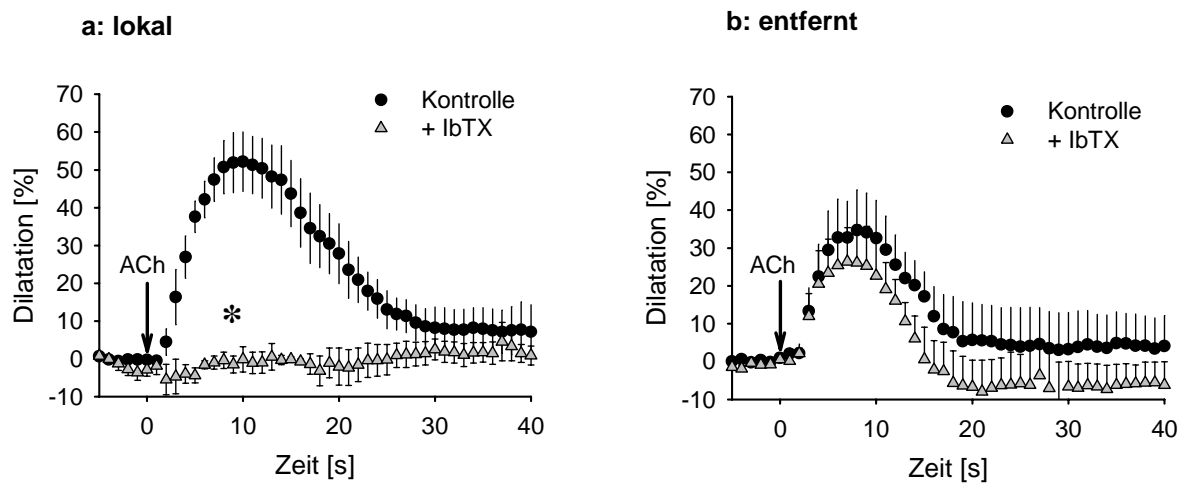


Abb. 3.14: Verlauf der lokalen und entfernten (670 μm) Acetylcholin-Antworten unter Superfusion mit L-NA und Indo (Kontrolle), verglichen mit Antworten nach zusätzlicher Mikroinjektion von Iberiotoxin (IbTX) an der jeweiligen beobachteten Stelle. Angegeben in Prozent der Dilatationskapazität. Die lokale Antwort (a) wurde durch IbTX blockiert. Es war keine signifikante Dilatation mehr zu beobachten. An der entfernten Stelle (b) war die Dilatation nach IbTX-Injektion nicht signifikant abgeschwächt.

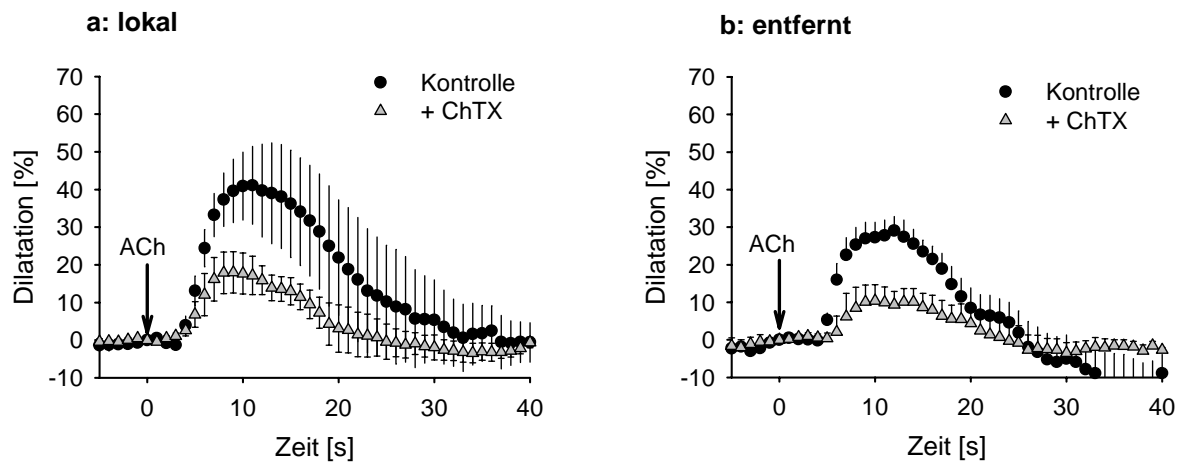


Abb. 3.15: Applikation von Charybdotoxin um die Stimulationsstelle. (a) Die lokale Antwort wurde durch die direkte ChTX-Wirkung signifikant abgeschwächt, folglich wurden hier K_{Ca} -Kanäle aktiviert. (b) Die Blockade von K_{Ca} -Kanälen an der Stimulationsstelle schwächte ebenfalls die Antwort an den entfernten Beobachtungsstellen ab.

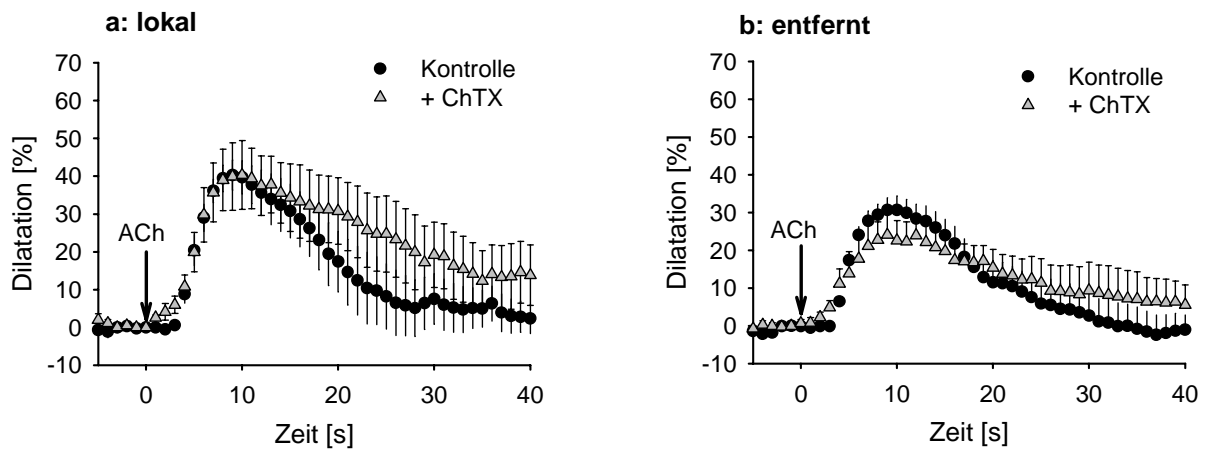


Abb. 3.16: Applikation von Charybdotoxin um die entfernte Beobachtungsstelle. Die Dilatation an der entfernten Beobachtungsstelle wurde durch das Charybdotoxin nicht abgeschwächt (b), sie war folglich nicht von der Öffnung von K_{Ca} -Kanälen an dieser Stelle abhängig. An der lokalen Stelle hatte das entfernt applizierte ChTX wie erwartet keine Wirkung.

3.8 Wirkung von NO auf die Fortleitung von Acetylcholin-Antworten

Um Befunden nachzugehen, dass NO die Zell-Zell-Kopplung durch Gap-Junctions beeinflussen kann (Blasits *et al.*, 2000; Roh *et al.*, 2002), wurde die Wirkung von NO auf die Fortleitung von Acetylcholin-Reaktionen untersucht. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die NO-vermittelte Vasodilatation zu verhindern, wurde der hierzu notwendige Signalweg über die lösliche Guanylatcyclase durch H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) blockiert. Dies hatte allerdings den Nachteil, dass nur cGMP-unabhängige Effekte auf die Gap-Junction-Kopplung beobachtet werden konnten.

Unter L-NA (30 μM), Indomethacin (3 μM) und ODQ (10 μM) lag der lokale Ruhedurchmesser bei $31 \pm 3 \mu\text{m}$. Stimulation mit Acetylcholin bewirkte an der Stimulationstelle eine Dilatation von $13 \pm 2 \mu\text{m}$ ($64 \pm 14 \%$). 670 μm stromaufwärts erweiterten sich die Arteriolen $9 \pm 1 \mu\text{m}$ ($38 \pm 3 \%$), 1340 μm stromauf und $7 \pm 2 \mu\text{m}$ ($32 \pm 7 \%$).

Nach Zugabe von SNP (1 μM) zur Superfusion kam es aufgrund des ODQs zu keiner signifikanten Änderung des Ruhedurchmessers ($26,6 \pm 5$ vs. $24,8 \pm 5 \mu\text{m}$). Die Acetylcholin-Antworten veränderten sich weder lokal ($+14 \pm 4 \mu\text{m}$ / $+61 \pm 16 \%$), noch in 670 μm ($+10 \pm 2 \mu\text{m}$ / $+38 \pm 7 \%$) oder in 1340 μm Entfernung ($+8 \pm 2 \mu\text{m}$ / $+36 \pm 8 \%$) signifikant. Dies gilt ebenso für das 15 s-Integral der Antworten (siehe Tab. 9).

Zur Narkose wurde Fentanyl, Droperidol und Midazolam benutzt. Die Daten stammen von 4 Gefäßen in 4 Versuchen und sind in den Abbildungen 3.17, 3.18 und Tabelle 10 zusammengefasst.

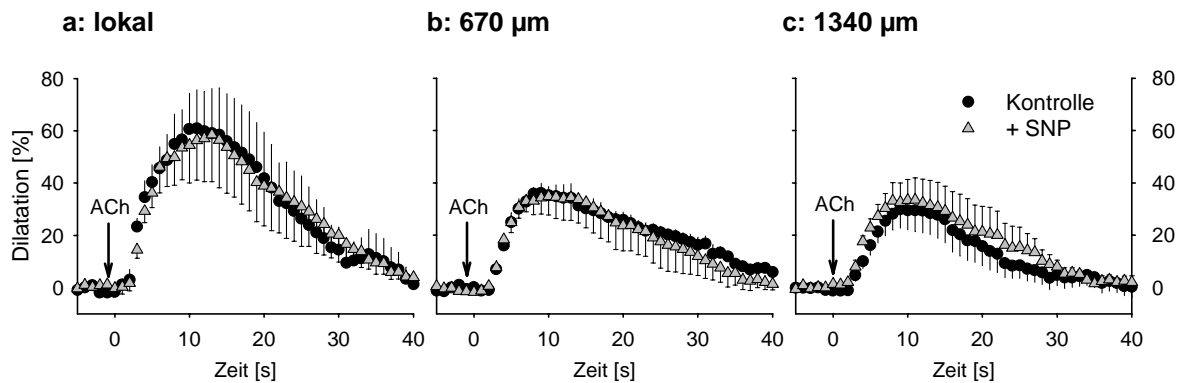


Abb. 3.17: Zeitlicher Verlauf der Vasomotorantworten nach Acetylcholin-Stimulation an lokaler und entfernten Stellen in Anwesenheit von L-NA, Indomethacin und ODQ (Kontrolle), verglichen mit den Antworten bei zusätzlicher Superfusion mit 1 µM Nitroprussid (SNP). Weder lokal noch an den entfernten Stellen änderte sich die Antwort.

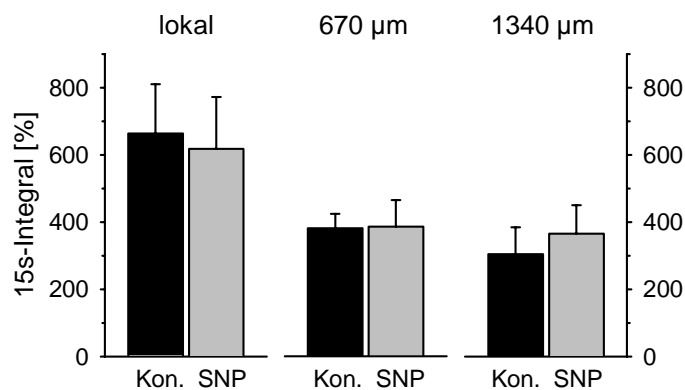


Abb. 3.18: Integral der ersten 15 s der Acetylcholin-Antwort, errechnet aus den normalisierten Werten. Die Werte unter L-NA, Indomethacin und ODQ sind schwarz, die Werte bei zusätzlicher Superfusion mit Nitroprussid (SNP) grau dargestellt. Nitroprussid führte weder lokal noch an den fernen Stellen zu einer signifikanten Veränderung der Vasomotorantworten.

Behandlung	Stelle	Ruhedurch. [µm]	Extremdurch. [µm]	max. Antwort [µm]	max. Antwort [%]	15s-Integral [%s]
Kontrolle	lokal	30,7 ±3,1	44,0 ±2,6	+ 13,3 ±2,2	+ 63,7 ±14,4	663 ±147
	670 µm	26,6 ±4,6	36,0 ±4,1	+ 9,4 ±1,1	+ 38,1 ± 3,1	381 ±44
	1340 µm	27,3 ±3,9	34,4 ±3,3	+ 7,1 ±1,6	+ 31,5 ± 7,3	304 ±80
+ SNP	lokal	29,7 ±4,0	43,7 ±3,3	+ 14,0 ±3,8	+ 61,1 ±16,2	618 ±154
	670 µm	24,8 ±4,8	34,9 ±3,8	+ 10,2 ±1,9	+ 38,4 ± 7,0	386 ±79
	1340 µm	25,9 ±3,7	34,4 ±2,1	+ 8,4 ±1,7	+ 35,7 ± 7,9	366 ±85

Tab. 10: Lokale und fortgeleitete Dilatation auf Acetylcholin-Stimulation unter Superfusion mit L-NA, Indomethacin und ODQ (Kontrolle), verglichen mit Antworten bei zusätzlicher Superfusion mit SNP. Die maximale Antwort ist in absoluten und normalisierten Werten (%-Dilatationskapazität) angegeben. Das Integral der Antwort der ersten 15s wurde aus den normalisierten Werten errechnet.

4 Diskussion

Arteriöläre Druckmessung

Die arteriöläre Druckmessung im Cremaster zeigte im gesamten untersuchten Druckbereich einen signifikanten Druckabfall zwischen den großen Leitungsarterien und der Mikrozirkulation. Der Druck in den großen Cremasterarteriolen lag deutlich unter dem systemischen Druck und betrug in Ruhe mit 46 % etwa die Hälfte des Druckes in der Femoralarterie. Hill kam zu vergleichbaren Ergebnissen am Cremaster der Ratte, wobei es keinen signifikanten Unterschied machte, ob der Cremaster intakt blieb, oder wie für diese Studie flächig präpariert wurde (53% (intakt) bzw. 48% (flächig präpariert) (Hill *et al.*, 1990)). Dies spricht für eine hohe Intaktheit der Muskelzirkulation nach der Präparation. Ein vergleichbarer proximaler Druckabfall wurde auch an der Hamsterbackentasche (Davis *et al.*, 1986) und in vielen anderen Gefäßbetten gemessen (kurze Übersicht in (Meininger *et al.*, 1987)) und bestätigt insgesamt die vorliegenden Ergebnisse.

Der Hamstercremaster ist demnach aufgrund des hohen Widerstandes der proximal der Mikrozirkulation gelegenen kleinen Arterien ebenso auf eine aufsteigende Vasodilatation angewiesen wie andere Stromgebiete. Dass die Fortleitung von Vasomotorantworten entlang von Gefäßen zur aufsteigenden Vasodilatation beitragen kann, wurde von Berg am Hamstercremaster eindrücklich demonstriert (s. Einleitung, (Berg *et al.*, 1997)).

Ausschluss von Konvektion und Diffusion als Auslöser entfernter Gefäßantworten

Zur Untersuchung fortgeleiteter Antworten wurde u.a. Acetylcholin lokalisiert als Mikrobolus an eine Arteriole appliziert. Dies erzeugte eine starke und schnell einsetzende Vasodilatation, die nicht auf die Applikationsstelle beschränkt blieb, sondern schlagartig das ganze Gefäß über eine Länge von mehreren hundert Mikrometern erfasste. Diese Fortleitung bzw. die Dilatation an den entfernten Stellen konnte nicht durch Konvektion oder Diffusion des Acetylcholins bedingt sein. Es wurden nur Mikrovolumina im Bereich unter 10 nl appliziert, die bei einer Flussrate der Superfusion von 134.000 nl/s (= 8 ml/min) und einer Entfernung zwischen Stimulations- und entfernter Beobachtungsstelle von mindestens 670 µm zu stark verdünnt wurden, um eine direkte Wirkung zu haben. Die Acetylcholin-Menge einer Stimulation war so gering und die Stimulation so lokalisiert, dass nur dann eine Wirkung zu beobachten war, wenn die Lösung ins Muskelparenchym direkt (5-20 µm) neben die Arteriole injiziert wurde.

Bei Platzierung der Pipettenspitze auf dem Muskel direkt über der Arteriole, statt im Gewebe, war schon keine lokale Reaktion mehr zu beobachten. Dies war auch nicht der Fall, wenn Acetylcholin 100 μm neben der Arteriole in das Muskelgewebe injiziert wurde. Des Weiteren lag die zeitliche Verzögerung zwischen dem Beginn der Reaktion an lokaler und entfernten Stellen unter einer Sekunde, was ebenfalls eine Diffusion der Stimulationssubstanz ausschließt. Weiterhin waren die entfernten Beobachtungsstellen immer stromaufwärts gelegen, so dass Acetylcholin nicht per Konvektion mit dem Blutstrom an die entfernten Beobachtungsstellen gelangen konnte. Um einen Transport mit entgegengesetzt verlaufenden Venen auszuschließen, wurden Arteriolen ohne begleitende Vene zur Untersuchung ausgewählt. Die Beobachtung, dass die ferne Antwort ihr Maximum vor der lokalen Antwort erreicht hatte, spricht ebenfalls gegen Diffusion und Konvektion. Zudem war bei Gabe von Nitroprussid trotz der vergleichbar starken lokalen Dilatation keine entfernte Antwort zu beobachten. Diffusion und Konvektion der Stimulationssubstanz können daher als Ursache der entfernten Antworten ausgeschlossen werden. Die Injektion von physiologischer NaCl-Lösung neben eine Arteriole hatte keine Wirkung auf den Gefäßdurchmesser und ergab somit keinen Hinweis auf mechanische Wirkungen der Applikationsmethode per se. Zusammengefasst war nach lokaler Stimulation der Arteriolen mit Acetylcholin eine sich entlang des Gefäßes ausbreitende Dilatation zu beobachten, die nicht durch direkte Acetylcholinwirkung an diesen entfernten Stellen bedingt war.

Fortleitungsmechanismus

Prinzipiell hätte flussvermittelte Vasodilatation, die durch einen Anstieg der Wandschubspannung am Endothel ausgelöst wird (Rubanyi *et al.*, 1986; Pohl *et al.*, 1993; Griffith *et al.*, 1987), zu den beobachteten entfernten Antworten beitragen können. Infolge der starken lokalen Dilatation nahm die Flussgeschwindigkeit an der lokalen Stelle zwar immer ab, an den entfernten Beobachtungsstellen war allerdings oft ein kurzer Anstieg zu beobachten. Dies könnte zu einem Anstieg der Wandschubspannung führen. Die Berechnung des Schergrades aus der Flussgeschwindigkeit und dem Gefäßdurchmesser lieferte dafür aber keinen Anhaltspunkt. Durch die schnelle Fortleitung der Dilatation wurde der initiale Anstieg der Flussgeschwindigkeit kompensiert und damit ein Ansteigen des Schergrades verhindert.

Eine Beteiligung von vasomotorischen Nerven an der Fortleitung wäre ebenfalls denkbar. Immunhistochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass Skelettmuskel-Arteriolen des Hamsters von sympathischen Nervenfasern und eventuell einigen sensorischen Nervenfasern innerviert werden (Grasby *et al.*, 1999). Jedoch wurde von mehreren Autoren die Unempfindlichkeit der Ausbreitung von Dilatationen gegen Tetrodotoxin, einen Blocker spannungsabhängiger Natriumkanäle, demonstriert, was gegen einen nervalen Ausbreitungsweg spricht (Hamstercremaster (Berg *et al.*, 1997), Hamster-Retraktormuskel (Emerson & Segal, 2001), Hamsterbackentasche (Segal & Duling, 1987; Segal & Duling, 1989), isolierte Arteriolen aus der Hamsterbackentasche (Xia & Duling, 1995)). Zudem ist der vasokonstriktorische Beitrag sympathischer Nervenfasern zum Ruhetonus in diesem Modell sehr gering. In einer Untersuchung von de Wit führte die Blockade der α -Adrenozeptoren nur zu einer Vasodilatation von circa 4% (de-Wit *et al.*, 1998). Die entfernten Dilatationen können auch aus diesem Grund nicht durch eine Hemmung der sympathischen Noradrenalinausschüttung erklärt werden. Untersuchungen mit Tetrodotoxin zum Ausschluss einer nervalen Beteiligung wurden daher nicht wiederholt.

Dagegen gilt eine passive, elektrotonische Ausbreitung von Membranpotentialänderungen entlang der Zellen der Gefäßwand über interzelluläre Gap-Junctions als Mechanismus der Fortleitung etabliert. Ein solcher Weg wurde prinzipiell schon 1978 von Hirst beschrieben (Hirst & Neild, 1978) und im Zusammenhang mit fortgeleiteten Vasomotorantworten durch Untersuchungen mit Gap-Junction-entkoppelnden Substanzen und durch Membranpotentialmessungen in-vitro und in-vivo bestätigt (Segal & Duling, 1989; Xia & Duling, 1995; Xia *et al.*, 1995; Welsh & Segal, 1998; Emerson & Segal, 2000b; Emerson & Segal, 2000a) (siehe Einleitung).

Kaliumchlorid- und Phenylephrin-Stimulation

Die zentrale Rolle des Membranpotentials bei fortgeleiteten Antworten zeigte sich auch bei Stimulation mit Kaliumchlorid (KCl). Lokal mit KCl induzierte Vasokonstriktionen breiteten sich sehr gut entlang der Arteriolen aus. Die von den Vasomotorantworten abgeleitete mechanische Längenkonstante lag mit ca. 2 mm im Bereich der von Xia und Duling für KCl an isolierten Hamsterbackentaschen-Arteriolen gemessenen Längenkonstante von 1,5 mm (Xia & Duling, 1995). Da die KCl-Wirkung nicht auf pharmakomechanischer Kopplung, sondern allein auf der Depolarisation der Zellmembran und elektromechanischer Kopplung beruht, bestätigt dies die ursächliche Beteiligung von Membranpotentialänderungen an der Ausbreitung von Gefäßreaktionen.

Die Wirkung des α_1 -Agonisten Phenylephrin (PE) auf Arteriolen beruht dagegen in erster Linie auf IP_3 -vermittelter intrazellulärer Kalziumerhöhung in glatten Muskelzellen. Daneben kann Phenylephrin die Kalziumsensitivität des kontraktilen Apparates erhöhen und glatte Muskelzellen depolarisieren. Phenylephrin erzeugte erwartungsgemäß eine starke lokale Vasokonstriktion, diese blieb aber sehr lokalisiert und wurde nicht fortgeleitet. Während α_1 -Rezeptor-Stimulation mit Norepinephrin am Hamster-Retraktormuskel ebenfalls nur lokalisierte Konstriktionen auslöste (Segal *et al.*, 1999), wurden Phenylephrin-Antworten an der Hamsterbackentasche dagegen fortgeleitet (Delashaw & Duling, 1991). Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse und die in manchen Versuchsmodellen ausbleibende Fortleitung bei starker lokaler Konstriktion bietet eine Untersuchung von Xia und Duling an isolierten Hamsterbackentaschen-Arteriolen. Hier wurden Konstriktionen nach lokaler PE-Gabe nur in 5 von 38 Fällen fortgeleitet. Membranpotential-Messungen mit einer intrazellulären Mikroelektrode zeigten, dass PE die Gefäßzellen in den meisten Fällen nicht oder nur unzureichend depolarisierte. Lokale Antworten wurden nur fortgeleitet, wenn das Membranpotential an der lokalen Stelle ausreichend lange einen Schwellenwert von circa -45 mV überschritt (Xia & Duling, 1995). Die Fortleitung einer Vasokonstriktion nach lokalisierter α_1 -Stimulation scheint also ähnlich wie bei Kaliumchlorid auf der Entstehung und Weiterleitung einer Membrandepolarisation zu beruhen. Diese ist aber variabel ausgeprägt, was widersprüchliche Befunde in unterschiedlichen Versuchsmodellen erklärt.

Aus der fehlenden Fortleitung auf PE lässt sich weiterhin ableiten, dass longitudinale Diffusion von Kalzium oder IP_3 entlang der glatten-Muskelzellschicht keine wesentliche Rolle bei der Ausbreitung von Vasomotorantworten spielt. Da PE vor allem über eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels durch IP_3 in den glatten Muskelzellen eine Konstriktion auslöst, wäre ansonsten eine Ausbreitung dieser Vasokonstriktion zu erwarten gewesen. In Endothelzellen wurde die Möglichkeit der Fortleitung durch longitudinale Kalziumdiffusion von Dora und Duling ausgeschlossen, indem sie isolierte Hamsterbackentaschen-Arteriolen von innen mit dem kalziumsensitiven Farbstoff Fluo 3 und dem membranpotentialsensitiven Farbstoff di-8-ANEPPS beluden. Während sich die Depolarisation nach lokaler Gabe von Kaliumchlorid und die Hyperpolarisation nach Gabe von Acetylcholin entlang der Endothelschicht ausbreitete, blieb der Kalziumanstieg in den Endothelzellen nach Stimulation mit Acetylcholin auf die Applikationsstelle beschränkt (Dora *et al.*, 2003). Auch aus theoretischen Überlegungen scheint longitudinale Diffusion von Kalzium und / oder anderen Second-messengern unwahrscheinlich, da die Diffusionszeit über eine Strecke von mehreren hundert Mikrometern im Bereich von Minuten läge. Die sekundenschnelle Ausbreitung von Vasomotorreaktionen lässt sich dadurch nicht erklären.

Nitroprussid-Stimulation

Wie sich bei Applikation des spontan NO freisetzenden Vasodilatators Nitroprussid-Natrium zeigte, scheint auch NO in erster Linie über pharmakomechanische Kopplung auf den Gefäßtonus zu wirken. Nitroprussid erzeugte zwar eine ebenso starke lokale Dilatation wie Acetylcholin, war aber nicht in der Lage eine fortgeleitete Reaktion auszulösen. Dies deckt sich mit Untersuchungen an der Hamsterbackentasche (Delashaw & Duling, 1991; Doyle & Duling, 1997) und Ergebnissen von Kurjiaka und Segal am Hamstercremaster (Kurjiaka & Segal, 1995). Das lässt darauf schließen, dass NO ähnlich wie Phenylephrin in-vivo nur geringen Einfluss auf das Membranpotential der Gefäßzellen hat. Direkte Messungen an glatten Muskelzellen und Endothelzellen ergaben dazu widersprüchliche Ergebnisse. Während Tare an Meerschweinchen-Uterusarterienringen und einer Vielzahl anderer Gefäße eine NO-abhängige Hyperpolarisation glatter Muskelzellen fand (Tare *et al.*, 1990), konnten Cheung und MacKay an Rattenschwanzarterien und Komori an Hundemesenterialarterien keine Hyperpolarisation glatter Muskelzellen nach Gabe von NO feststellen (Cheung & MacKay, 1985; Komori *et al.*, 1988). Auch Endothelzellen von isolierten Hamsterbackentaschen-Arteriolen zeigten bei Gabe von Nitroprussid keine signifikante Membranpotentialänderung (Dora *et al.*, 2003).

Die NO-abhängige Hyperpolarisation scheint demnach ebenfalls variabel ausgeprägt zu sein und von Stromgebiet und Spezies abzuhängen. Der Befund, dass NO-Donatoren keine fortgeleiteten Antworten erzeugen, spricht aber für eine untergeordnete Rolle des Membranpotentials bei der Wirkung von NO in der Mikrozirkulation.

Blockade der NO-Synthase und Cyclooxygenase unter Neuroleptnarkose

Wie nach der fehlenden Fortleitung auf Nitroprussid vermutet, zeigte sich bei Blockade der NO- und Prostaglandinsynthese unter Neuroleptnarkose keine signifikante Bedeutung von NO oder Prostaglandinen (PG) für die fortgeleiteten Antworten an den entfernten Beobachtungsstellen.

Zudem war aber auch die lokale Dilatation relativ resistent gegenüber L-NA und Indomethacin. Unter Neurolept-Narkose führte die Hemmung der NO- und PG-Synthese nur zu einer Verkürzung der lokalen Antwort, sie hatte aber keinen signifikanten Einfluss auf den Maximalwert der Dilatation. Dies steht zunächst in gewissem Widerspruch zu bisherigen Untersuchungen am Hamstercremaster, in denen Acetylcholin für 2-3 min mit der Superfusion appliziert und die Gefäßantwort nach 1 min bestimmt wurde. Hier war ein weitaus größerer Teil der direkten Acetylcholin-Wirkung von NO und Prostaglandinen vermittelt (de-Wit *et al.*, 1993). Die vorliegenden Ergebnissen lassen allerdings erkennen, dass der größte NO- und PG-Anteil im 2. Teil der Antwort liegt. Bei längerer Anwesenheit des Acetylcholins und Bestimmung der Dilatation nach Erreichen einer Plateauphase wäre somit ein größerer Anteil von NO und PG an der Dilatation abzusehen gewesen. Doyle beschrieb diesen Effekt anhand von längerdauernden Acetylcholin-Applikationen (2 min) an isolierten Hamsterbackentaschen-Arteriolen. Hier war eine zweiphasige Dilatation zu beobachten, wobei der initiale Peak NO-unabhängig war, während die darauffolgende Plateauphase zunehmend von NO vermittelt wurde (Doyle & Duling, 1997). Bei Bolusgabe werden also initial verstärkt wirkende Mechanismen bzw. Autakoide besonders hervorgehoben. Zudem wurde bei früheren Studien in der Regel Pentobarbital als Narkotikum verwendet, was hemmende Effekte auf die Bildung von EDHF haben kann (siehe unten). Diese Phänomene können zusammengenommen zu unterschiedlicher Einschätzung des NO- und Prostaglandinanteils an Acetylcholin-Antworten führen.

Während somit an der lokalen Stelle NO und Prostaglandine an der Aufrechterhaltung der Dilatation beteiligt waren, gab es keinen Hinweis auf eine NO- oder PG-Produktion an den entfernten Stellen oder eine wesentliche Bedeutung bei der Erzeugung der Fortleitung an sich. Dies spricht für die Beteiligung mindestens eines weiteren Mechanismus oder Mediators, der sowohl für die erste Phase der Dilatation an der lokalen Stelle, als auch die für Fortleitung der Antworten verantwortlich ist. Hierfür kommt vor allem die in einer Vielzahl von Gefäßen beschriebene Hyperpolarisation durch den endothelialen hyperpolarisierenden Faktor (EDHF) in Frage.

Blockade der NO-Synthase und Cyclooxygenase unter Pentobarbitalnarkose

Bei Narkose mit Pentobarbital führte Superfusion von L-NA und Indomethacin zu einer Abschwächung der gesamten lokalen Antwort, einschließlich des initialen Peaks. Der NO- und Prostacyclin-Anteil an der Dilatation war höher als bei Neuroleptnarkose, und schon in der ersten Hälfte der Antwort signifikant ausgeprägt. Dennoch waren circa 60 % der Dilatation NO- und Prostacyclin-unabhängig. Vergleichbare Befunde hatte Rivers mit dem Muskarinrezeptoragonisten Metacholin an der Hamsterbackentasche unter Narkose mit Pentobarbital erhoben, wobei dort der NO-Anteil der Dilatation bei 65 % lag (Rivers, 1997). Der Unterschied zur Neuroleptnarkose ist vermutlich durch eine verringerte Beteiligung des dritten Mediators EDHF bedingt. Lischke et al. beschrieben 1995 eine Abschwächung der NO- und Prostaglandin-unabhängigen Acetylcholin-Dilatation an isolierten Carotisarterien von Hasen bei Superfusion mit den Barbituraten Thiopental und Methohexital (Lischke *et al.*, 1995). Einen vergleichbaren Effekt fand de Wit an Hautmuskelgefäßen des Hamsters für Pentobarbital. Die L-NA- und Indomethacin-resistente Dilatation auf Superfusion mit Acetylcholin wurde bei Einleitung einer Pentobarbital-Narkose im Vergleich zum wachen Tier schwächer, während Nitroprussid-Dilatationen nicht durch Pentobarbital abgeschwächt wurden. Die Einleitung einer Narkose mit Urethan hatte dagegen keinen Effekt auf die L-NA- und Indomethacin-resistente Dilatation, während der Cytochrom P450-Inhibitor 17-Octadecynoic acid (ODYA) oder der K_{Ca} -Kanallocker Charybdotoxin diese Antwort blockierten. Untersuchungen mit kalzium- und membranpotentialsensitiven Farbstoffen an isolierten Arterien des Hamstergracilismuskels bestätigten diese Befunde: Pentobarbital verminderte die glattmuskuläre Hyperpolarisation und Kalziumabnahme nach Gabe von Acetylcholin und hatte damit den selben Effekt wie die Gabe der K_{Ca} -Kanallocker Charybdotoxin und Tetraethylammonium (TEA) (de-Wit *et al.*, 1999).

Pentobarbital scheint somit durch eine Hemmung des für die EDHF-Bildung verantwortlichen Cytochrom P450-Enzyms den EDHF-Anteil der Acetylcholin-Antworten abzuschwächen. Daher wurde es durch eine für die Untersuchung von EDHF-vermittelten Effekten besser geeignete barbituratfreie Narkoseform ersetzt (Neuroleptnarkose).

Cytochrom P450 2C8/9 als EDHF-Synthase

Nachdem sich in den Befunden zur NOS- und COX-Hemmung unter Barbituratnarkose schon die Bedeutung eines Cytochrom P450-Enzyms (CYP) für die Vermittlung der NO- und PG-unabhängigen Acetylcholin-Antwort angedeutet hatte, wurde versucht den Syntheseweg des EDHF durch spezifische Blockade der vermutlichen EDHF-Synthase Cytochrom P450 2C8/9-Epoxygenase (CYP 2C8/9) mit dem CYP 2C8/9-selektiven Inhibitor Sulfaphenazol zu hemmen. Arachidonsäureprodukte von Cytochrom P450-Enzymen wurden an Koronararterien und -arteriolen von Schweinen, Rindern, Hunden und Ratten als sehr potente Vasodilatoren beschrieben, deren Wirkungsweise der von endogenem EDHF entspricht. Zeitgleich mit der Beschreibung des Isoenzym CYP 2C8/9 als EDHF-Synthase und von 11,12-Epoxy-Eicosatriensäure (11,12-EET) als EDHF in Schweine-Koronararterien (Fisslthaler *et al.*, 1999) hatte Bolz CYP 2C8/9 sehr elegant auch in Widerstandsgefäßen des Hamsters als EDHF-Synthase identifiziert. Dazu wurde das Endothel isolierter Hamstergracilismuskel-Arterien mit Antisense-DNA gegen die mRNA von CYP 2C8/9 transfiziert und so dessen Expression gehemmt. Dies führte zu einer deutlichen Abschwächung aller EDHF-vermittelten Effekte, während EDHF-unabhängige Wirkungen von vasoaktiven Substanzen unbeeinflusst blieben (Bolz *et al.*, 2000).

Die starke Abschwächung der NO- und PG-unabhängigen Acetylcholin-Dilatation an der lokalen Stelle nach Superfusion von Sulfaphenazol zeigt, dass CYP 2C8/9 auch in der Mikrozirkulation des Hamstercremasters an der EDHF-Synthese beteiligt ist. Die ebenfalls starke Abschwächung der entfernten, fortgeleiteten Dilatationen weist zudem darauf hin, dass EDHF neben der direkten vasodilatierenden Wirkung an der Stimulationsstelle auch für die entfernten Antworten verantwortlich ist. Aus diesen Ergebnissen lässt sich jedoch nicht ableiten, ob EDHF die Fortleitung ausschließlich durch Wirkung an der Stimulationsstelle auslöst, oder auch an den entfernten Stellen an der Umsetzung der dorthin fortgeleiteten Membranpotentialänderungen in eine Vasodilatation beteiligt ist, d.h. an den entfernten Stellen gebildet wird und dort direkt wirkt.

Lokalisierte Blockade von K_{Ca} -Kanälen

Um der Frage nach dem Ort der EDHF-Wirkung nachzugehen, wurde die Aktivierung von K_{Ca} -Kanälen durch lokalisierte Injektion von Kanalblockern entweder nur an der Stimulationsstelle oder nur an der entfernten Beobachtungsstelle gehemmt. K_{Ca} -Kanäle werden entsprechend ihrer Leitfähigkeit in 3 Subtypen, SK_{Ca} - (small conductance), IK_{Ca} - (intermediate conductance) und BK_{Ca} -Kanal (= LK_{Ca} , big oder large conductance) unterteilt. In der vorliegenden Untersuchung wurden das BK_{Ca} -spezifische Iberitoxin und das IK_{Ca} - und BK_{Ca} -spezifische Charybdotoxin (Cai *et al.*, 1998) für die Kanalblockade verwendet. Die NO-Synthase und Cyclooxygenase waren hierbei durch L-NA und Indomethacin in der Superfusion gehemmt.

Die lokale Acetylcholin-Antwort wurde durch Injektion der K_{Ca} -Kanalblocker an der lokalen Stelle vollständig unterdrückt (IbTX) bzw. deutlich abgeschwächt (ChTX). Dies hatte zudem eine Abschwächung der fortgeleiteten Antworten zur Folge, obwohl die entfernten Stellen nicht mit den Kanalblockern behandelt waren. Die Aktivierung von BK_{Ca} -Kanälen war dementsprechend nicht nur für die lokale Dilatation von Bedeutung, sondern auch für die Erzeugung der Fortleitung. Die BK_{Ca} -abhängige Hyperpolarisation an der Stimulationsstelle stellt also das initiale Ereignis dar, welches für die Ausbreitung der Vasodilatation notwendig ist.

Dass Iberitoxin die lokale Dilatation im Gegensatz zu Charybdotoxin nicht nur deutlich abschwächte, sondern völlig blockierte, könnte auf einer effektiveren Kanalblockade durch Iberitoxin beruhen, da es 10x besser an BK_{Ca} -Kanäle bindet als Charybdotoxin und nur sehr langsam wieder von den Kanälen abdiffundiert (Candia *et al.*, 1992).

Wurden IbTX und ChTX ausschließlich an den entfernten Beobachtungsstellen appliziert, hatten sie keine Wirkung auf die dortige Dilatation. Im Gegensatz zur Stimulationsstelle fand an den entfernten Stellen also keine Aktivierung von IK_{Ca} - oder BK_{Ca} -Kanälen statt, um die glatten Muskelzellen zu relaxieren. Eine an den entfernten Beobachtungsstellen stattfindende Bildung von EDHF, NO oder Prostaglandinen, die theoretisch durch eine entlang des Gefäßes fortgeleitete Hyperpolarisation des Endothels ausgelöst werden könnte, erscheint daher unwahrscheinlich.

Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Befunde also, dass eine lokalisiert applizierte, kleine Menge von Acetylcholin an der Stelle, an der es direkt wirkt, durch die Stimulation endothelialer EET-, NO- und evt. Prostacyclin-Bildung die Relaxation der glatten Muskelzellen und damit eine Vasodilatation bewirkt. Die 1. Hälfte der Dilatation wird dabei überwiegend von einem Cytochrom P450 2C8/9-Produkt, möglicherweise 11,12-EET, und die Aktivierung von BK_{Ca}-Kanälen vermittelt. Dies führt über einen erhöhten Kaliumausstrom zu einer Hyperpolarisation und Relaxation der glatten Muskelzellen und Dilatation des Gefäßes. Die Aktivierung von BK_{Ca}-Kanälen an der Stimulationsstelle ist ferner notwendig, um eine sich ausbreitende Gefäßdilatation zu erzeugen. Die lokal entstandene Hyperpolarisation wird entlang der Gefäßwand zu entfernten Gefäßabschnitten fortgeleitet, ohne dass dort aufgrund der Hyperpolarisation vermehrt endotheliale Autakoide gebildet werden. Die entfernten Dilatationen scheinen somit rein auf der sich passiv entlang der Zellen der Gefäßwand ausbreitenden Hyperpolarisation zu beruhen. Die Mechanismen der weiteren elektromechanischen Kopplung wurden in dieser Arbeit nicht weiter untersucht, wahrscheinlich ist jedoch ein Abfall des zytoplasmatischen Kalziumspiegels der glatten Muskelzellen durch eine verringerte Öffnungswahrscheinlichkeit spannungsabhängiger Kalziumkanäle vom L-Typ und / oder T-Typ (Jackson, 2000; Gustafsson *et al.*, 2001; VanBavel *et al.*, 2002). Eine Veränderung des Membranpotentials kann den Kontraktionszustand glatter Muskelzellen zudem auch über eine vom zytoplasmatischen Kalziumspiegel unabhängige Wirkung auf die intrazelluläre Kalziumfreisetzung (Ganitkevich & Isenberg, 1993; Yamagishi *et al.*, 1992; Kukuljan *et al.*, 1994) und eine Kalzium-Desensitivierung bzw. -Sensitivierung des kontraktilen Apparates beeinflussen (Okada *et al.*, 1993).

Die komplette Blockade der lokalen Antwort nach Injektion von Iberiotoxin spricht zudem für eine effektive NOS- und COX-Blockade durch die verwendeten L-NA- und Indomethacin-Konzentrationen. Die unvollständige Blockade der Dilatation bei Gabe von Sulfaphenazol ist somit vermutlich weniger auf unvollständige NOS- oder COX-Hemmung, als auf unvollständige Hemmung des CYP 2C8/9 zurückzuführen. Dies könnte auf die im Vergleich zur sehr starken CYP 2C9-Hemmung schwächeren Wirkung von Sulfaphenazol auf CYP 2C8 zurückzuführen sein (Mancy *et al.*, 1996).

Wirkung von exogenem NO auf die Fortleitung von Acetylcholin-Dilatationen

Da NO bei fast allen wichtigen Vorgängen in der Mikrozirkulation, wie der Regulation des Ruhetonus, der Antwort auf pharmakologische und physiologische Stimulation oder unter pathologischen Bedingungen wie Entzündung, eine zentrale Rolle spielt, wurde ein möglicher Einfluss von NO auf die Gap-Junction-Leitfähigkeit anhand der Fortleitung von Acetylcholin-Dilatationen untersucht. NO-Effekte auf Gap Junctions wurden zuvor u.a. an Retinazellen in Kultur (Lu & McMahon, 1997) und isolierten Deiter-Stützzellen aus dem Innenohr (Blasits *et al.*, 2000) demonstriert, wobei NO hier die elektrische Kopplung cGMP-abhängig hemmte. Untersuchungen zur Farbstoffkopplung von Endothelzellen in unserer Arbeitsgruppe hatten darauf hingedeutet, dass NO die Zellkopplung auch cGMP-unabhängig, unter Hemmung der löslichen Guanylatzyklase durch ODQ, vermindern kann (Kameritsch *et al.*, 2003). Eine andere Studie an glatten Muskelzellen aus dem Uterus ergab bei Inkubation mit dem NO-Donator SNAP eine verminderte Expression des Gap-Junction-Proteins Connexin43, welches auch in Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen an der Bildung von Gap Junctions beteiligt ist. Hier war die Wirkung ebenfalls cGMP-unabhängig, und wurde durch einen cAMP-Anstieg vermittelt. Die NO-Wirkung auf die funktionelle Zellkopplung wurde dabei jedoch nicht untersucht (Roh *et al.*, 2002).

Aufgrund der Länge des Versuchsprotokolls wurde in dieser Studie nur die akute Wirkung von NO nach einer Inkubationszeit von mindestens 10 min betrachtet. Da Blasits bei seinen Untersuchungen an Deiterzellen nach 8-9 min eine deutliche Abnahme der Zellkopplung beobachten konnte, lag dies in einem Zeitraum, nachdem man eine akute Wirkung hätte erwarten können. Die eingesetzte Konzentration des NO-Donators SNP von 1 μM war ausreichend, um in Abwesenheit von ODQ zu einer deutlichen Vasodilatation zu führen. Die NO-Konzentration lag somit mindestens im oberen in-vivo vorkommenden Bereich, eventuell deutlich darüber.

Nach einer Stimulationsserie zur Erhebung der Kontrollantworten führte die Superfusion von Nitroprussid bedingt durch die Anwesenheit von ODQ zu keiner Änderung des arteriölen Durchmessers. Die vasodilatierende Wirkung von NO war also cGMP-vermittelt. ODQ und NO hatten auch keine Wirkung auf die lokalen Antworten. Die entfernten Dilatationen waren allerdings ebenfalls unverändert, wie der Verlauf der Vasomotorantworten an den entfernten Stellen zeigt (s. Abb. 3.17). Daher ergab sich kein Anhalt dafür, dass NO durch eine akute Veränderung der Zellkopplung die Ausbreitung einer Hyperpolarisation vermindert oder verbessert hätte. In Anbetracht einer kürzlich publizierten Studie von Hoffmann (Hoffmann *et*

al., 2003) ist die fehlende Wirkung von NO auf die Fortleitung der Acetylcholin-Antworten möglicherweise durch die cGMP-Abhängigkeit des NO-Effekts auf die Gap-Junction-Kopplung zu erklären. In ihrer Studie wurden frisch isolierte menschliche Umbilicalvenen-Endothelzellen (HUVEC) mit verschiedenen Farbstoffen beladen und darauffolgend flusszytometrisch die Farbstoffkopplung in Anwesenheit eines NO-Donators (SNAP) untersucht. NO verbesserte die Kopplung zwischen den Endothelzellen hierbei deutlich und in konzentrationsabhängiger Weise. Diese Wirkung wurde durch einen cGMP-abhängigen sekundären Anstieg von cAMP und der darauffolgenden Aktivierung der Proteinkinase A vermittelt, was zu einem verstärkten Einbau intrazellulär bereitliegender Connexin-Moleküle in die Plasmamembran führte. Die vorliegenden Ergebnisse weisen somit ausschließlich darauf hin, dass NO keine akute und von einem cGMP-Anstieg unabhängige Wirkung auf die Zellkopplung von Gefäßzellen hat. Eine sich nach Stunden funktionell auswirkende Abnahme der Connexin-Expression oder eine von einem cGMP-Anstieg abhängige kurzfristige Erhöhung der Connexon-Dichte, die in den zitierten Arbeiten für die NO-Wirkung verantwortlich waren, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht beurteilt werden.

Die Nebenbeobachtung, dass unter Superfusion von L-NA, Indomethacin und ODQ unverändert starke Acetylcholin-Antworten vorhanden waren, ist ein weiterer Beleg dafür, dass die Dilatation in Anwesenheit von L-NA und Indomethacin nicht auf eine unvollständige Blockade der NO-Synthase zurückzuführen ist, da in diesem Falle eine deutliche Hemmung durch ODQ zu erwarten gewesen wäre. Die Fortleitung in Anwesenheit von ODQ zeigt zudem, dass Diffusion von cGMP zwischen glatten Muskelzellen keine nennenswerte Bedeutung für die Ausbreitung von Vasodilatationen hat.

Zusammenfassend betrachtet stellt die Fähigkeit des Endothels, den Gefäßtonus durch EDHF über viele hundert Mikrometer zu beeinflussen eine Ergänzung der nur lokal auf den Gefäßwiderstand wirkenden Mechanismen dar. Fortgeleitete Dilatationen integrieren das Verhalten einzelner Gefäßabschnitte innerhalb der Mikrozirkulation und spielen zudem eine wesentliche Rolle bei der Anpassung des Tonus stromauf der Mikrozirkulation liegender kleiner Arterien an die Bedürfnisse der von ihnen versorgten Gewebe durch aufsteigende Vasodilatation. Die Bedeutung von EDHF liegt somit nicht nur in der Ergänzung anderer endothelialer Autakoide als lokal wirkender Vasodilatator, sondern hat darüber hinaus vor allem in der Mikrozirkulation eine wesentliche Rolle in der Steuerung der Durchblutung, die durch andere Autakoide nicht ohne weiteres übernommen werden kann.

5 Zusammenfassung

Gefäßzellen und Gefäßabschnitte in Arteriolen der Mikrozirkulation reagieren auf endotheliale Autakoide, Gewebismetabolite und transmurale Druckänderungen nicht als isolierte Einheiten, sondern in koordinierter Art und Weise, was u.a. auf der Ausbreitung von Membranpotentialänderungen über Gap-Junctions entlang der glatten Muskelzellschicht und dem Endothel beruht. Dies ermöglicht die Koordination des Gefäßtonus in parallel und hintereinander liegenden Gefäßabschnitten, was zur aufsteigenden Vasodilatation und der Zunahme der Skelettmuskeldurchblutung bei Arbeit beiträgt. Diese von Nerven unabhängige intra- und intervaskuläre Kommunikation zeigt sich auch bei lokalisierter Stimulation mit bestimmten vasoaktiven Substanzen durch eine sich weit über den Ort der direkten Wirkung schlagartig ausbreitende Gefäßreaktion (conducted vasomotor response).

Um die Auslöser von fortgeleiteten Gefäßreaktionen zu untersuchen, wurden Arteriolen des Cremastermuskels in anästhesierten Goldhamstern mittels einer Mikropipette mit einem Mikrobolus (<10 nl) der Vasokonstriktoren Kaliumchlorid (KCl) und Phenylephrin (PE) bzw. der Vasodilatoren Nitroprussid-Natrium (SNP) und Acetylcholin (ACh) stimuliert und lokale und an entfernte Stellen weitergeleitete Durchmesseränderungen gemessen. Die Beteiligung endothelialer Autakoide an diesen Antworten nach ACh-Stimulation wurde untersucht, indem deren Synthese oder Wirkung durch Inhibitoren der NO-Synthase (NOS), Cyclooxygenase (COX), der vermutlichen EDHF-Synthase Cytochrom P450 2C8/9 (CYP 2C8/9) oder Blockade kalziumabhängiger Kaliumkanäle (K_{Ca}) gehemmt wurde. Desweiteren wurde der Druck in Cremasterarteriolen gemessen, um den Anteil des proximal vom Cremastermuskel liegenden Gefäßwiderstandes einschätzen zu können.

Der arterioläre Druck in der Mikrozirkulation lag bei einem systemischen Blutdruck von 83 ± 4 mmHg bei 35 ± 3 mmHg und betrug 46 ± 4 % des Femoralarteriendruckes. Somit lag etwa die Hälfte des arteriellen Gesamtwiderstandes proximal der Messposition in der Mikrozirkulation, was auf die Notwendigkeit einer aufsteigenden Vasodilatation zur Blutflusserhöhung und eine mögliche physiologische Bedeutung fortgeleiteter Vasomotorreaktionen hinweist. Lokale Depolarisation durch KCl-Applikation führte an der Stimulationsstelle (lokal) zu einer Konstriktion von 47 ± 6 auf 33 ± 5 μm (-14 ± 3 μm). In einer Entfernung von 1340 μm war eine Konstriktion um 7 ± 1 μm zu beobachten. Im Gegensatz zu dieser sich ausbreitenden Antwort blieben Konstriktionen nach PE lokalisiert. Da KCl allein durch Membrandepolarisation und elektromechanische Kopplung wirkt, während PE in erster Linie

über pharmokomechanische Kopplung das Gefäß verengt, weist dies auf die ursächliche Bedeutung von Membranpotentialänderungen für die Weiterleitung von Vasomotorantworten hin.

Lokalisierte ausgelöste Dilatationen nach ACh wurden ebenfalls entlang der Arteriolen fortgeleitet (lokal $17 \pm 2 \mu\text{m}$, $920 \mu\text{m}$ stromaufwärts $8 \pm 1 \mu\text{m}$). Die entfernte Dilatation wurde nicht durch eine Flusssteigerung ausgelöst, da der aus Flussgeschwindigkeit und Durchmesser berechnete Schergrad im Gefäß zu keinem Zeitpunkt anstieg. Konvektion oder Diffusion von ACh wurden ebenso ausgeschlossen. Die Hemmung der NOS und COX (N^{ω} -nitro-L-arginin, Indomethacin) verkürzte zwar die lokale Antwort, hatte aber keine Wirkung auf die weitergeleitete Dilatation. NO und Prostaglandine waren an der Auslösung einer fortgeleiteten Dilatation also nicht beteiligt. Zusätzliche Blockade des kürzlich in Hamstergefäßen als EDHF-Synthase beschriebenen CYP 2C8/9 durch Sulfaphenazol schwächte die lokale und entfernte Antwort dagegen stark ab. Die Bildung des endothelialen hyperpolarisierenden Faktors (EDHF) scheint somit eine wichtige Voraussetzung für die Ausbreitung von ACh-Antworten zu sein.

Auf die Stimulationsstelle begrenzte Blockade von K_{Ca} -Kanälen durch Mikroinjektion von Iberiotoxin (IbTX) oder Charybdotoxin (ChTX) hob sowohl die lokale als auch die entfernte Antwort auf bzw. schwächte sie stark ab. Wurden IbTX oder ChTX dagegen nur an der entfernten Beobachtungsstelle appliziert, hatte dies keine Wirkung auf die dorthin weitergeleitete Dilatation. Dies zeigt, dass EDHF nur an der ACh-Stimulationsstelle wirksam wurde. Die dort durch Öffnung von K_{Ca} -Kanälen erzeugte Hyperpolarisation war einerseits für die lokale Dilatation verantwortlich und andererseits ausreichend, um sich auszubreiten und durch Hyperpolarisation glatter Muskelzellen entlang des Gefäßes die entfernte Dilatation zu erzeugen. Die Öffnung von K_{Ca} -Kanälen und die Wirkung von EDHF entlang des Gefäßes war hierfür nicht notwendig. Um eine modulierende Wirkung von NO auf die Zellkopplung von Gefäßzellen und eine Beeinflussung der Fortleitung zu untersuchen, wurde unter Hemmung der löslichen Guanylatzyklase der Effekt des NO-Donators SNP auf die Weiterleitung von ACh-Dilatationen untersucht. Hier ergab sich kein Hinweis auf eine akute, cGMP-unabhängige NO-Wirkung auf die Fortleitung in unserem Versuchsmodell.

Zusammenfassend demonstriert diese Untersuchung, dass das Endothel durch Bildung eines K_{Ca} -aktivierenden Faktors (EDHF) durch CYP 2C8/9 den Gefäßtonus nicht nur am Ort einer Stimulation modulieren kann, sondern, bedingt durch die Weiterleitung einer lokal erzeugten Hyperpolarisation, auch zu einer koordinierten Antwort ganzer Gefäßabschnitte beiträgt.

6 Literatur

Baez, S. (1973). An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc.Res.* **5**, 384-394.

Bartlett, I. S. & Segal, S. S. (2000). Resolution of smooth muscle and endothelial pathways for conduction along hamster cheek pouch arterioles. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* **278**, H604-H612.

Beny, J. L. (1999). Information Networks in the Arterial Wall. *News Physiol Sci.* **14**, 68-73.

Berg, B. R., Cohen, K. D., & Sarelius, I. H. (1997). Direct coupling between blood flow and metabolism at the capillary level in striated muscle. *Am.J.Physiol.* **272**, H2693-H2700.

Berg, B. R. & Sarelius, I. H. (1995). Functional capillary organization in striated muscle. *Am.J.Physiol.* **268**, H1215-H1222.

Blasits, S., Maune, S., & Santos-Sacchi, J. (2000). Nitric oxide uncouples gap junctions of supporting Deiters cells from Corti's organ. *Pflugers Arch.* **440**, 710-712.

Bolz, S. S., 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 dilation in isolated resistance arteries. *FASEB J.* **14**, 255-260.

Busse, R., Luckhoff, A., & Mulsch, A. (1991). Cellular mechanisms controlling EDRF/NO formation in endothelial cells. *Basic.Res.Cardiol.* **86 Suppl 2**, 7-16.

Cai, S., Garneau, L., & Sauve, R. (1998). Single-channel characterization of the pharmacological properties of the K(Ca2+) channel of intermediate conductance in bovine aortic endothelial cells. *J.Membr.Biol.* **163**, 147-158.

Candia, S., Garcia, M. L., & Latorre, R. (1992). Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca(2+)-activated K+ channel. *Biophys.J.* **63**, 583-590.

Cheung, D. W. & MacKay, M. J. (1985). The effects of sodium nitroprusside and 8-bromo-cyclic GMP on electrical and mechanical activities of the rat tail artery. *Br.J.Pharmacol.* **86**, 117-124.

Davies, P. F., Olesen, S. P., Clapham, D. E., Morrel, E. M., & Schoen, F. J. (1988). Endothelial communication. State of the art lecture. *Hypertension* **11**, 563-572.

Davis, M. J., Ferrer, P. N., & Gore, R. W. (1986). Vascular anatomy and hydrostatic pressure profile in the hamster cheek pouch. *Am.J.Physiol* **250**, H291-H303.

de-Wit, C., Bolz, S. S., Kaas, J., & Pohl, U. (1998). Myogenic effects enhance norepinephrine constriction: inhibition by nitric oxide and felodipine. *Kidney Int.Suppl.* **67**, S122-S126.

- de-Wit, C., Esser, N., Lehr, H. A., Bolz, S. S., & Pohl, U. (1999). Pentobarbital-sensitive EDHF mediates ACh-induced arteriolar dilation in the hamster microcirculation. *Am.J.Physiol.* **276**, H1527-H1534.
- de-Wit, C., Schafer, C., von-Bismarck, P., Bolz, S. S., & Pohl, U. (1997). Elevation of plasma viscosity induces sustained NO-mediated dilation in the hamster cremaster microcirculation in vivo. *Pflügers Arch.* **434**, 354-361.
- de-Wit, C., von-Bismarck, P., & Pohl, U. (1993). Mediator role of prostaglandins in acetylcholine-induced vasodilation and control of resting vascular diameter in the hamster cremaster microcirculation in vivo. *J.Vasc.Res.* **30**, 272-278.
- Delashaw, J. B. & Duling, B. R. (1991). Heterogeneity in conducted arteriolar vasomotor response is agonist dependent. *Am.J.Physiol.* **260**, H1276-H1282.
- Dora, K. A., Xia, J., & Duling, B. R. (2003). Endothelial cell signaling during conducted vasomotor responses. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **285**, H119-H126.
- Doyle, M. P. & Duling, B. R. (1997). Acetylcholine induces conducted vasodilation by nitric oxide-dependent and -independent mechanisms. *Am.J.Physiol.* **272**, H1364-H1371.
- Duling, B. R. & Berne, R. M. (1970). Propagated vasodilation in the microcirculation of the hamster cheek pouch. *Circ.Res.* **26**, 163-170.
- Emerson, G. G. & Segal, S. S. (2000a). Electrical coupling between endothelial cells and smooth muscle cells in hamster feed arteries: role in vasomotor control [see comments]. *Circ.Res.* **87**, 474-479.
- Emerson, G. G. & Segal, S. S. (2000b). Endothelial cell pathway for conduction of hyperpolarization and vasodilation along hamster feed artery. *Circ.Res.* **86**, 94-100.
- Emerson, G. G. & Segal, S. S. (2001). Electrical activation of endothelium evokes vasodilation and hyperpolarization along hamster feed arteries. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **280**, H160-H167.
- Fisslthaler, B., Popp, R., Kiss, L., Potente, M., Harder, D. R., Fleming, I., & Busse, R. (1999). Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* **401**, 493-497.
- Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-376.
- Ganitkevich, V. Y. & Isenberg, G. (1993). Membrane potential modulates inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca²⁺ transients in guinea-pig coronary myocytes. *J.Physiol* **470**, 35-44.
- Grasby, D. J., Morris, J. L., & Segal, S. S. (1999). Heterogeneity of vascular innervation in hamster cheek pouch and retractor muscle. *J.Vasc.Res.* **36**, 465-476.
- Griffith, T. M. (2004). Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? *Br.J.Pharmacol.* **141**, 881-903.

- Griffith, T. M., Edwards, D. H., Davies, R. L., Harrison, T. J., & Evans, K. T. (1987). EDRF coordinates the behaviour of vascular resistance vessels. *Nature* **329**, 442-445.
- Gustafsson, F., Andreassen, D., Salomonsson, M., Jensen, B. L., & Holstein-Rathlou, N. (2001). Conducted vasoconstriction in rat mesenteric arterioles: role for dihydropyridine-insensitive Ca(2+) channels. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **280**, H582-H590.
- Gustafsson, F. & Holstein-Rathlou, N. (1999). Conducted vasomotor responses in arterioles: characteristics, mechanisms and physiological significance. *Acta Physiol Scand.* **167**, 11-21.
- Haas, T. L. & Duling, B. R. (1997). Morphology favors an endothelial cell pathway for longitudinal conduction within arterioles. *Microvasc.Res.* **53**, 113-120.
- Hashitani, H. & Suzuki, H. (1997). K+ channels which contribute to the acetylcholine-induced hyperpolarization in smooth muscle of the guinea-pig submucosal arteriole. *J.Physiol.Lond.* **501**, 319-329.
- Hecker, M., Bara, A. T., 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)**, 407-414.
- Herrmann, K. S., Renneberg, A., & Kreuzer, H. (1987). Precision velocimetry with digital cross-correlation for flow measurements during thrombus growth. *Microvasc.Res.* **34**, 13-28.
- Hester, R. L. (1990). Venular-arteriolar diffusion of adenosine in hamster cremaster microcirculation. *Am.J.Physiol* **258**, H1918-H1924.
- Hill, M. A., Simpson, B. E., & Meininger, G. A. (1990). Altered cremaster muscle hemodynamics due to disruption of the deferential feed vessels. *Microvasc.Res.* **39**, 349-363.
- Hirst, G. D. & Neild, T. O. (1978). An analysis of excitatory junctional potentials recorded from arterioles. *J.Physiol.Lond.* **280**, 87-104.
- Hoffmann, A., Gloe, T., Pohl, U., & Zahler, S. (2003). Nitric oxide enhances de novo formation of endothelial gap junctions. *Cardiovasc.Res.* **60**, 421-430.
- Hu, J. & Cotgreave, I. A. (1997). Differential regulation of gap junctions by proinflammatory mediators in vitro. *J.Clin.Invest* **99**, 2312-2316.
- Jackson, W. F. (2000). Ion channels and vascular tone. *Hypertension* **35**, 173-178.
- Jin, D., Song, K., Oka, Y., Takai, S., Shiota, N., & Miyazaki, M. (1997). *Jpn.J.Pharmacol.* **75**, 259-266.
- Kameritsch, P., Hoffmann, A., & Pohl, U. (2003). Opposing effects of nitric oxide on different connexins expressed in the vascular system. *Cell Commun.Adhes.* **10**, 305-309.

- Komori, K., Lorenz, R. R., & Vanhoutte, P. M. (1988). Nitric oxide, ACh, and electrical and mechanical properties of canine arterial smooth muscle. *Am.J.Physiol* **255**, H207-H212.
- Kukuljan, M., Rojas, E., Catt, K. J., & Stojilkovic, S. S. (1994). Membrane potential regulates inositol 1,4,5-trisphosphate-controlled cytoplasmic Ca²⁺ oscillations in pituitary gonadotrophs. *J.Biol.Chem.* **269**, 4860-4865.
- Kumar, N. M. & Gilula, N. B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell* **84**, 381-388.
- Kurjiaka, D. T. & Segal, S. S. (1995). Conducted vasodilation elevates flow in arteriole networks of hamster striated muscle. *Am.J.Physiol.* **269**, H1723-H1728.
- Lash, J. M. (1994). Contribution of arterial feed vessels to skeletal muscle functional hyperemia. *J.Appl.Physiol* **76**, 1512-1519.
- Lischke, V., Busse, R., & Hecker, M. (1995). Selective inhibition by barbiturates of the synthesis of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the rabbit carotid artery. *Br.J.Pharmacol.* **115**, 969-974.
- Little, T. L., Xia, J., & Duling, B. R. (1995). Dye tracers define differential endothelial and smooth muscle coupling patterns within the arteriolar wall. *Circ.Res.* **76**, 498-504.
- Lu, C. & McMahon, D. G. (1997). Modulation of hybrid bass retinal gap junctional channel gating by nitric oxide. *J.Physiol.Lond.* **499**, 689-699.
- Mancy, A., Dijols, S., Poli, S., Guengerich, P., & Mansuy, D. (1996). Interaction of sulfaphenazole derivatives with human liver cytochromes P450 2C: molecular origin of the specific inhibitory effects of sulfaphenazole on CYP 2C9 and consequences for the substrate binding site topology of CYP 2C9. *Biochemistry* **35**, 16205-16212.
- Meininger, G. A., Fehr, K. L., & Yates, M. B. (1987). Anatomic and hemodynamic characteristics of the blood vessels feeding the cremaster skeletal muscle in the rat. *Microvasc.Res.* **33**, 81-97.
- Okada, Y., Yanagisawa, T., & Taira, N. (1993). BRL 38227 (levcromakalim)-induced hyperpolarization reduces the sensitivity to Ca²⁺ of contractile elements in canine coronary artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **347**, 438-444.
- Olson, L. J., Knych-ET, J., Herzig, T. C., & Drewett, J. G. (1997). Selective guanylyl cyclase inhibitor reverses nitric oxide-induced vasorelaxation. *Hypertension* **29**, 254-261.
- Palmer, R. M., Ashton, D. S., & Moncada, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**, 664-666.
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G., & Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526.
- Pohl, U., Wagner, K., & de-Wit, C. (1993). Endothelium-derived nitric oxide in the control of tissue perfusion and oxygen supply: physiological and pathophysiological implications. *Eur.Heart J.* **14 Suppl I**, 93-98.

- Quilley, J., Fulton, D., & McGiff, J. C. (1997). Hyperpolarizing factors. *Biochem.Pharmacol.* **54**, 1059-1070.
- Rivers, R. (1997). Conducted arteriolar dilations persist in the presence of nitroarginine. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **30**, 309-312.
- Roh, C. R., Heo, J. H., Yang, S. H., & Bae, D. S. (2002). Regulation of connexin 43 by nitric oxide in primary uterine myocytes from term pregnant women. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **187**, 434-440.
- Rubanyi, G. M., Romero, J. C., & Vanhoutte, P. M. (1986). Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am.J.Physiol.* **250**, H1145-H1149.
- Schlossmann, J., Feil, R., & Hofmann, F. (2003). Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann.Med.* **35**, 21-27.
- Segal, S. S. & Beny, J. L. (1992). Intracellular recording and dye transfer in arterioles during blood flow control. *Am.J.Physiol.* **263**, H1-H7.
- Segal, S. S., Damon, D. N., & Duling, B. R. (1989). Propagation of vasomotor responses coordinates arteriolar resistances. *Am.J.Physiol.* **256**, H832-H837.
- Segal, S. S. & Duling, B. R. (1986a). Communication between feed arteries and microvessels in hamster striated muscle: segmental vascular responses are functionally coordinated. *Circ.Res.* **59**, 283-290.
- Segal, S. S. & Duling, B. R. (1986b). Flow control among microvessels coordinated by intercellular conduction. *Science* **234**, 868-870.
- Segal, S. S. & Duling, B. R. (1987). Propagation of vasodilation in resistance vessels of the hamster: development and review of a working hypothesis. *Circ.Res.* **61**, II20-II25.
- Segal, S. S. & Duling, B. R. (1989). Conduction of vasomotor responses in arterioles: a role for cell-to-cell coupling? *Am.J.Physiol.* **256**, H838-H845.
- Segal, S. S. & Kurjiaka, D. T. (1995). Coordination of blood flow control in the resistance vasculature of skeletal muscle. *Med.Sci.Sports Exerc.* **27**, 1158-1164.
- Segal, S. S., Welsh, D. G., & Kurjiaka, D. T. (1999). Spread of vasodilatation and vasoconstriction along feed arteries and arterioles of hamster skeletal muscle. *J.Physiol.Lond.* **516**, 283-291.
- Shaul, P. W., Farrar, M. A., & Magness, R. R. (1992). Prostacyclin synthesis and stimulation of cyclic AMP production in ovine fetal vasculature: heterogeneity in pulmonary and systemic arteries. *Dev.Pharmacol.Ther.* **18**, 89-99.
- Smyth, E. M. & FitzGerald, G. A. (2002). Human prostacyclin receptor. *Vitam.Horm.* **65**, 149-165.

Tare, M., Parkinson, H. C., Coleman, H. A., Neild, T. O., & Dusting, G. J. (1990). Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. *Nature* **346**, 69-71.

VanBavel, E., Sorop, O., Andreasen, D., Pfaffendorf, M., & Jensen, B. L. (2002). Role of T-type calcium channels in myogenic tone of skeletal muscle resistance arteries. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **283**, H2239-H2243.

Wayland, H. & Johnson, P. C. (1967). Erythrocyte velocity measurement in microvessels by a two-slit photometric method. *J.Appl.Physiol.* **22**, 333-337.

Welsh, D. G. & Segal, S. S. (1998). Endothelial and smooth muscle cell conduction in arterioles controlling blood flow. *Am.J.Physiol.* **274**, H178-H186.

Xia, J. & Duling, B. R. (1995). Electromechanical coupling and the conducted vasomotor response. *Am.J.Physiol.* **269**, H2022-H2030.

Xia, J., Little, T. L., & Duling, B. R. (1995). Cellular pathways of the conducted electrical response in arterioles of hamster cheek pouch in vitro. *Am.J.Physiol.* **269**, H2031-H2038.

Yamagishi, T., Yanagisawa, T., & Taira, N. (1992). K⁺ channel openers, cromakalim and Ki4032, inhibit agonist-induced Ca²⁺ release in canine coronary artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **346**, 691-700.

7 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Bernd Höpfl
Geburtsort / -jahr: Heilbronn a.N., 1973
e-mail-Adresse: hoepfl@physio.uni-luebeck.de

Schulbildung, Studium

Abitur 1993

Studium der Medizin

- Universität Mainz: Vorklinik und 1. klinischer Abschnitt 1995-98
- Technische Universität München: 2. klin. Abschnitt und PJ 1998-2001
- Universität von Toronto, Kanada: Teil des Praktischen Jahres (PJ) 2001
- Ärztliche Prüfung: Nov. 2001

Arzt im Praktikum

Pre-Registration House Officer in Chirurgie, Innerer Medizin und Notfallmedizin (A&E). Lehrkrankenhäuser der Universitäten Glasgow und Newcastle, Großbritannien Feb. 2002 – Aug. 2003

Ärztliche Approbation, Regierung von Oberbayern, München Aug. 2003

Assistenzstellen

Wissenschaftlicher Angestellter, Institut für Physiologie der Universität Lübeck Okt. 2003

Veröffentlichungen:**Originalarbeiten**

- Hoepfl B, Rodenwaldt B, Pohl U, de-Wit C. EDHF, but not NO or prostaglandins, is critical to evoke a conducted dilation upon ACh in hamster arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H996-H1004, 2002

Posterpräsentationen und Abstracts

- Höpfl B, de Wit C, Bolz SS, Pohl U. Shear stress and nitric oxide do not contribute to ACh-induced conducted vasodilation in the hamster cremaster microcirculation. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mikrozirkulation, Tübingen Okt. 1998. *J.Vasc.Res.* 36: 179, 1999
- Höpfl B, de Wit C, Bolz SS, Pohl U. Conducted vasodilation is independent of shear stress and does not rely on the production of NO and prostaglandins. 78. Jahreskongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Bonn März 1999. *European Journal of Physiology (Pflugers Archiv)* 437, Suppl.5: R160, 1999
- de Wit C, Höpfl B, Bolz SS, Pohl U. Fortgeleitete Vasodilatationen in der Mikrozirkulation sind unabhängig von der Wandschubspannung (WSS) und der Bildung von NO und Prostaglandinen. 65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim April 1999. *Z.Kardiol.* 88 (Suppl. 1): 114, 1999
- Höpfl B, Bolz SS, de Wit C, Pohl U. Conducted dilations initiated by acetylcholine (ACh) are not dependent on endothelial autacoid formation. 79. Jahreskongreß der DPG, Ulm März 2000, *European Journal of Physiology (Pflugers Archiv)* 439, Suppl.6: R397, 2000
- de Wit C, Höpfl B, Bolz SS, Pohl U. Formation of EDHF, but not NO, at the stimulation site is necessary to induce a conducted dilation by acetylcholin (ACh). Scientific Sessions 2000, American Heart Association, New Orleans. *Circulation* 102 (Suppl.2): II-303, 2000

8 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Ulrich Pohl und dem Betreuer meiner Doktorarbeit PD Dr. med. Cor de Wit für die Überlassung des Themas meiner Dissertation und die Anleitung und Betreuung während der experimentellen Arbeit bedanken.

Professor Pohls Anregungen und Kritik während der experimentellen Phase haben sehr zur späteren Qualität der Arbeit beigetragen. Zudem haben sich die Erfahrungen, die ich bei regelmäßigen Journal-Clubs und der Teilnahme an Kongressen sammeln konnte, auch in anderen Bereichen als sehr nützlich erwiesen. Extrem hilfreich war die sehr gute Zusammenarbeit bei der Korrektur des Manuskripts, die es ermöglicht hat, die Dissertation rechtzeitig zu einem kurzfristigen Abgabetermin einzureichen.

PD de Wit hat durch die gründliche Einarbeitung in die experimentellen Methoden den Grundstein für den experimentellen Erfolg gelegt. Er hat mir durch die bereitwillige Weitergabe unzähliger Tipps und Tricks im Labor und am PC sehr geholfen, mich durch das komplexe Dickicht der vielen kleinen Probleme zu schlagen, das es bis zur Fertigstellung zu überwinden galt. Zudem bin ich für das züge Korrekturlesen des Manuskripts sehr dankbar, wodurch es gelang die Arbeit schnell in eine einreichbare Form zu bringen.

Besonders möchte ich mich auch bei Kollegen, Freunden und meiner Familie bedanken, die mich in etwas frustraneren Phasen mit Süßigkeiten, Zuspruch und praktischen Vorschlägen unterstützt haben. Frau Dr. med. vet. Barbara Rodenwaldt hat mit ihrem Input zu den Charybdotoxin-Experimenten maßgeblich zur erfolgreichen Veröffentlichung der Ergebnisse im AJP beigetragen, und war, was nicht weniger von Bedeutung ist, oft der ausschlaggebende Sonnenstrahl, der es mir ermöglichte, länger in den dunklen Gewölben des Elfenbeinturms mit den Hürden zu ringen, die einem die Natur in den Weg stellt, bevor sie einen Blick in ihr Inneres erlaubt.