

Aus dem Institut für Physiologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann

**Unterschiedliche Mechanismen der
arteriolären Dilatation in der Maus: NO
aktiviert die Proteinkinase G, Acetylcholin
öffnet K_{Ca} -Kanäle**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Michael Köppen
aus
München
Lübeck 2006

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Cor de Wit
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Norbert Guldner

Tag der mündlichen Prüfung: 25.09.2006

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 25.09.2006

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Material	17
2.1.1	Versuchstiere	17
2.1.2	Substanzen	17
2.1.3	Lösungen	18
2.1.4	Weitere Materialien	19
2.2	Methoden	19
2.2.1	Präparation der Versuchstiere	19
2.2.2	Intravitalmikroskopie	21
2.2.3	Versuchsprotokoll bei der Intravitalmikroskopie	23
2.2.4	Makrohämodynamische Messung	25
2.3	Datenauswertung	26
2.3.1	Statistik und Berechnung	26
2.3.2	Verwendete Software	27
3.	ERGEBNISSE	28
3.1	Mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz in wachen Tieren	28
3.2	Applikation von Stickstoffmonoxid (NO)	29
3.2.1	Wirkung von NO auf den arteriellen Blutdruck	29
3.2.2	Wirkung von NO auf arterioläre Durchmesser	31
3.3	Effekt des endothelabhängigen Dilatators Acetylcholin (ACh)	33
3.3.1	Wirkung von Acetylcholin auf den arteriolären Druck	33
3.3.2	Effekt von Acetylcholin auf arterioläre Durchmesser	35
3.3.3	Effekte von Prostglandinsynthesehemmung auf die Acetylcholin -induzierte Dilatation	36
3.4	Hemmung der Cytochrom-P450-Monooxygenase	39
3.5	Effekte der Hemmung von Ca²⁺-abhängigen Kalium-Kanälen	42
3.5.1	Effekt des BK _{Ca} -Blockers Iberiotoxin	42
3.5.2	Effekt des SK _{Ca} -Blockers Apamin	43

4.	DISKUSSION	45
4.1	Basale hämodynamische Parameter: Mittlerer arterieller Druck und Herzfrequenz	45
4.2	Bedeutung der cGKI für die NO-induzierte Vasodilatation	47
4.3	Bedeutung des NO/cGMP/cGKI-Weges bei der endothel-abhängigen Dilatation	50
4.4	Derivate der Cytochrom-P450-Monooxygenase als möglicher EDHF	53
4.5	Beteiligung von Ca²⁺-abhängigen Kaliumkanälen bei der EDHF-Dilatation	54
4.6	Pathophysiologische Relevanz der BK_{Ca}-vermittelten EDHF-abhängigen Vasodilatation	57
5.	ZUSAMMENFASSUNG	59
6.	LITERATURVERZEICHNIS	61
7.	ANHANG	70
8.	PUBLIKATIONEN	71
9.	DANKSAGUNG	73
10.	LEBENS LAUF	74

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
ADO	Adenosin
ADP	Adenosin-Diphosphat
AMP	Adenosin-Monophosphat
Aqua. dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-Trisphosphat
BK _{Ca}	Ca ²⁺ -abhängiger Kaliumkanal großer (big) Leitfähigkeit
cAMP	cyclisches Adenosin-5'-Monophosphat
cGMP	cyclisches Guanosin-5'-Monophosphat
Ca ²⁺	Calciumion
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CYP-P450	Cytochrom-P450-Monooxygenase
Cx	Connexin
DEA-NO	2-(N,N-diethylamino)-diazennolat-2-oxid, nicht-enzymatischer NO-Donor
DAG	Diacylglycerin
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EET	Epoxyeicosatriensäure
EDHF	Endothelium derived hyperpolarizing factor
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
eNOS ^{-/-}	Mäuse, defizient für die endotheliale NO-Synthase
GTP	Guanosin-Triphosphat
H ⁺	Wasserstoffion
HCO ₃ ⁻	Bicarbonat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hz	Hertz
Ibtx	Iberiotoxin
IK _{Ca}	Ca ²⁺ -abhängiger Kaliumkanal mittlerer (intermediate) Leitfähigkeit
iNOS	induzierbare NO-Synthase

IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K _{ATP}	ATP-abhängiger Kaliumkanal
K _{Ca}	Ca ²⁺ -abhängiger Kaliumkanal
K _{IR}	einwärts gleichrichtender Kaliumkanal
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
K _V	spannungsabhängiger Kaliumkanal
L-NA	N ^o -nitro-L-Arginin, NO-Synthaseinhibitor
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
Mg ²⁺	Magnesiumion
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
n	Anzahl der Beobachtungen
N ₂	Stickstoff
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
ODYA	17-Octadecynolsäure, Inhibitor der Cytochrom-P450 Monooxygenase
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion (
PGI ₂	Prostazyklin
PLC	Phospholipase C
sGC	lösliche (soluble) Guanylatzyklase
SK _{Ca}	Ca ²⁺ -abhängiger Kaliumkanal niedriger (small) Leitfähigkeit
Sulfa	Sulfaphenazol, Inhibitor der Cytochrom-P450- Monooxygenase
SNAP	S-Nitroso-N-Acetyl-D/L-Penicillamin, NO-Donor
SNP	Nitroprussid-Natrium, NO-Donor
VSCM	Glatte Gefäßmuskelzelle

1. Einleitung

1.1 Physiologischer Hintergrund

Ein funktionierendes Blutkreislaufsystem ist unentbehrlich für komplexe Organismen. Angetrieben durch das Herz dient es der Beförderung von Sauerstoff (O_2), Substraten und Signalstoffen zu den Geweben und transportiert Kohlenstoffdioxid (CO_2) und Stoffwechselmetabolite ab. Auch nimmt es durch die Verteilung von Antikörpern und Immunzellen eine entscheidende Rolle bei der Immunabwehr ein, dient dem Transport von Hormonen und ist zentral bei der Wärmeregulation.

Das Herz ist nur in bestimmten Grenzen in der Lage, das von ihm geförderte Volumen zu variieren. Eine gleichzeitige maximale Perfusion aller Organe ist nicht möglich. Daher muß eine Regulation der Durchblutung der einzelnen Organsysteme erfolgen. Ist diese im Rahmen von Krankheitsprozessen gestört, wie z.B. im septischen oder anaphylaktischen Schock, kann der Blutdruck nicht mehr aufrechterhalten werden und der Kreislaufsystem versagt.

Die Regulation der Durchblutung wird durch Engstellung (Vasokonstriktion) bzw. Weitstellung (Vasodilatation) der Gefäße zu den einzelnen Organsystemen vorgenommen. Diese Steuerung beruht zum einen auf zentralen und zum anderen auf peripheren Mechanismen: Zentral wird über das vegetative Nervensystem und einer Vielzahl von Hormonen die Herzleistung, das Blutvolumen und der periphere Widerstand beeinflusst. Diese zentralen Regulationssysteme sind zum einen primär darauf ausgerichtet, einen adäquaten Blutdruck aufrecht zu erhalten. Daher beziehen diese regulierenden Mechanismen eine afferente Information über den aktuellen arteriellen Druck aus den Barorezeptoren. Nur wenn im arteriellen System ein ausreichender Perfusionsdruck herrscht, können periphere Mechanismen die lokale Durchblutung der Organe entsprechend dem jeweiligen Bedarf regulieren. Die periphere Durchblutungsregulation geschieht ausschließlich auf der Ebene der Gefäße und hier vor allem in den zuführenden Arterien und Arteriolen. Peripher kann zum einen die Gefäßweite und die Durchblutung durch die sogenannte Autoregulation, die auf der myogenen Reaktivität der glatten Gefäßmuskelzellen beruht, beeinflusst werden. Zum anderen wird der Tonus der Arteriolen in der Mikrozirkulation durch endotheliale Autakoide und Gewebismetabolite gesteuert.

Unter dem Begriff endotheliale Autakoide werden alle vom Endothel synthetisierten Metabolite zusammengefasst, die in der unmittelbaren Umgebung ihrer Bildung Einfluß auf den glatten Muskel und dadurch auf den Gefäßdurchmesser nehmen.

Der Blutfluss (I) in einem Stromgebiet wird nach dem Ohmschen Gesetz $I = U / R$ durch die *treibende Druckdifferenz* ΔP (U) zwischen der venösen und arteriellen Seite und dem *Strömungswiderstand* R (peripherer Widerstand) bestimmt. Letzterer setzt sich wiederum aus der Summe der einzelnen Widerstände in den Gefäßabschnitten zusammen (Kirchhoffsche Regel). Unter der Annahme, dass ein Blutgefäß ein starres Rohr sei, in dem eine stationäre, laminare Strömung einer homogenen Flüssigkeit herrscht, steigt der Widerstand im Gefäßabschnitt in linearer Abhängigkeit von der Viskosität des Blutes (η) und der Gefäßlänge (l). Umgekehrt sinkt der Widerstand mit Erweiterung des Gefäßinnendurchmessers (r) in der vierten Potenz ab (Hagen-Poiseuille-Gesetz):

$$R = \frac{8 * \eta * l}{\pi * r^4}$$

Diese Abhängigkeit erklärt, warum der größte Teil des Strömungswiderstandes im Kreislauf im Bereich der Arteriolen lokalisiert ist und dass bereits kleine Änderungen des Durchmessers in diesen Gefäßen beträchtliche Änderungen des Widerstandes und damit der Durchblutung zur Folge haben. Deshalb bezeichnet man die kleinen Arterien und Arteriolen auch als Widerstandsgefäße. Die bedarfsadaptierte Perfusion muss also über diese Gefäße reguliert werden.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich vor allem mit der Bedeutung lokaler Steuerungsmechanismen für den Gefäßdurchmessers. Im Zentrum der Untersuchung standen die endothelialen Faktoren, die die Vasodilatation in den kleinen Arteriolen beeinflussen. Insbesondere ist Gegenstand der Untersuchung welche Signaltransduktionswege dabei funktionell bedeutsam sind. Die Untersuchungen wurden am Musculus cremaster der Maus mittels Intravitalmikroskopie vorgenommen. Diese Untersuchungstechnik ermöglicht die direkte Beobachtung der Widerstandsgefäße, d.h. der Arteriolen mit einem Durchmesser von 5 – 100 μm *in vivo*.

1.2 Mikrozirkulation

Der Begriff Mikrozirkulation ist weit gefasst und schließt Arteriolen, Venolen, sowie das Drainagesystem der Lymphgefäße ein. Die Arteriolen sind der Bestandteil der Mikrozirkulation, die den größten Einfluss auf die Regulation der Durchblutung ausüben. Die Arteriolen des Skelettmuskels sind besonders geeignet, um die aktive Durchblutungsregulation in der Mikrozirkulation zu untersuchen. Der Aktivitätszustand des Skelettmuskels variiert stark, und damit schwankt die Stoffwechselaktivität in einem sehr breiten Bereich. Dies benötigt eine sehr veränderliche Durchblutung. So kann im aktiven Muskel der Blutfluss auf das 10- bis 50-fache des Ruhewerts ansteigen (Segal und Kurjiaka 1995).

1.2.1 Anatomischer Aufbau der Arteriolen

Das Kreislaufsystem setzt sich aus dem Herz und dem arteriellen und venösen Gefäßsystem zusammen. Im arteriellen Schenkel des Kreislaufsystems verzweigen sich die Arterien dichotonisch und werden ab einer Größe von 0,1 mm Arteriolen genannt.

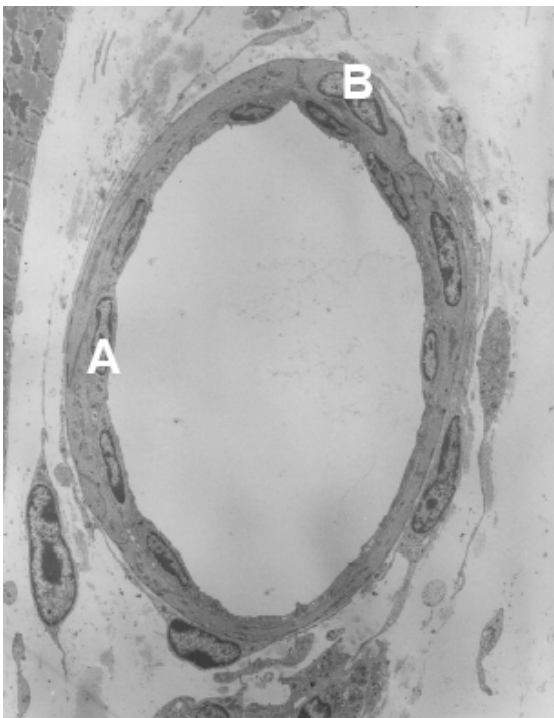


Abbildung 1.1 Querschnitt durch eine Arteriole

Dargestellt ist ein Querschnitt durch eine Arteriole aus dem Herzen des Menschen. Das lückenlose Endothel (**A**) ist von einer einzelligen Schicht ebenso lückenloser glatter Muskelzellen (**B**) unterlagert. (Bild zur Verfügung gestellt von B.F. Becker, Institut für Physiologie der LMU)

Die innerste Schicht der Arteriolen bildet die Tunica intima, die sich ihrerseits in das Endothel und das Subendothel unterteilt. Sie wird durch die Lamina elastica interna begrenzt, an die sich die Tunica media mit den glatten Muskelzellen anschließt. Durch die Tunica adventitia wird das Gefäß im umliegenden Gewebe verbunden und verankert.

Endothel

Das Endothel besteht aus einer einfachen Lage spindelförmiger, flacher ca. 80-150 µm langen und 7 µm breiten Endothelzellen, die in Längsrichtung des Gefäßes ausgerichtet sind (Haas und Duling 1997). Sie finden sich an der Innenseite aller Gefäße und auch des Herzens. Als Grenzschicht zwischen strömendem Blut und der Gefäßwand übt das Endothel eine Reihe von Funktionen aus. Es ist an der Kontrolle der Hämostase, am Stoffaustausch zwischen Intra- und Extravasalraum und am Ablauf chronischer und akuter Entzündungen beteiligt. Darüber hinaus übt es durch Modulation der effektiven Konzentration im Blut zirkulierender vasoaktiver Substanzen und über parakrin sezernierte, vasoaktive Autakoide einen entscheidenden Einfluss auf den Kontraktionszustand der Gefäßmuskelzellen und damit den Gefäßtonus aus (Davies *et al* 1988; de Wit *et al* 1993; de Wit *et al* 1997; Furchgott und Zawadzki 1980; Palmer *et al* 1987). Endothelzellen sind untereinander und wahrscheinlich auch mit den glatten Gefäßmuskelzellen über Zellverbindungen gekoppelt.

Glatte Gefäßmuskelzellen

Die zirkulär zum Lumen verlaufenden 80 – 150 µm langen und ca. 8 µm breiten glatten Muskelzellen bilden die Tunica media. In Arterien sind sie mehrschichtig, in Arteriolen nur einschichtig angeordnet. Wie im Skelettmuskel verkürzt sich die glatte Muskelzelle durch Ineinandergleiten der Aktin- und Myosinfilamente. Allerdings erfolgt dies wesentlich langsamer und weniger energieaufwändig als im Skelettmuskel. Bei gleicher Kraftentwicklung besitzen sie einen 100 - 500 mal kleineren Energieverbrauch. Die Kontraktion glatter Muskelzellen wird einerseits über die zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration und andererseits über die Calciumsensitivität der Myofilamente reguliert. Der Spiegel des intrazellulären

Calciums kann rezeptorvermittelt durch externe Stimuli erhöht oder erniedrigt werden. Auch das Membranpotential der Zelle beeinflusst den Calciumspiegel der Zelle. Durch Hyperpolarisation wird die Öffnungswahrscheinlichkeit der spannungsgesteuerten Calciumkanäle erniedrigt und umgekehrt durch Depolarisation erhöht.

Als Sensoren des intrazellulären Calciumspiegels dient das Calmodulin, welches nach Bindung von vier Ca^{2+} -Ionen die Myosinleichtketten-Kinase (MLCK) aktiviert. Diese überträgt dann eine Phosphatgruppe von ATP auf die leichte Kette des Myosins, welches daraufhin unter ATP-Verbrauch mit Aktin interagieren kann und eine Kontraktion induziert. Eine Relaxation erfolgt, wenn Calciumionen ins sarkoplasmatische Retikulum und in den Extrazellulärraum zurückgepumpt werden und die intrazelluläre Calciumkonzentration sinkt. Dies führt zu einer Hemmung der Myosinleichtketten-Kinase (MLCK) und zu einer Dephosphorylierung des Myosins durch die Myosinphosphatase (Rapoport *et al* 1983). Die Myosinphosphatase wird ihrerseits in ihrer Aktivität reguliert. Bei einer Aktivierung wird das Gleichgewicht in Richtung auf den dephosphorylierten Zustand verschoben. Dieses ist Ca^{2+} -unabhängig und verändert die Empfindlichkeit des kontraktile Apparats für Calciumionen. Daher wird dieser Mechanismus als Änderung der Calciumsensitivität bezeichnet.

Zellverbindungen

Der Kontakt zwischen den Zellen und Zellschichten wird durch drei mögliche Kontakttypen hergestellt, die funktionell sehr unterschiedliche Aufgaben besitzen:

Tight junctions bewirken einen sehr engen Kontakt der Membranen zweier benachbarter Zellen und schnüren diese gleichsam zusammen. Damit wird zum einen die Permeabilität der Zellschicht – je nach Gewebeart – stark reduziert oder unterbunden, zum anderen die mechanische Belastbarkeit eines Zellverbandes hergestellt (Van Itallie und Anderson 2004).

Adhesion Junctions werden Kontaktzonen zwischen Zellen genannt, die über das Protein Cadherin in Verbindung mit dem Zytoskelett der jeweiligen Zelle stehen. Dieses Protein ermöglicht eine kontrollierte laterale Zellverbindung (Baldwin und Thurston 2001).

Gap Junctions stellen Zellverbindungen dar, die eine kommunizierende Verbindung herstellen. Aufgebaut sind die Kontakte aus Connexonen, Proteine, die aus sechs gleichartigen Untereinheiten (Connexinen) bestehen. Inzwischen wurden 20 Mitglieder dieser Proteinfamilie identifiziert und vier davon finden sich im Gefäßsystem. Benannt werden die Connexine nach ihrem Molekulargewicht, z.B. hat das Connexin 43 ein Molekulargewicht von 43 Dalton. Connexin 43 (Cx43) und Connexin 40 (Cx40) werden sowohl im Endothel als auch in der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert (Little *et al* 1995), während Connexin 37 nur im Endothel (Van Rijen *et al* 1997) und Connexin 45 (Cx45) nur in der glatten Muskulatur (Kruger *et al* 2000) anzutreffen sind. Gap junctions erlauben relativ unspezifisch eine Passage von Molekülen zwischen den Zellen. Das Molekulargewicht der permeierenden Moleküle überschreitet 1000 Dalton nicht. Damit können neben Ionen auch kleine Moleküle wie die second messenger zyklisches Adenosin-5-Monophosphat (cAMP), zyklisches Guanosin-5-Monophosphat (cGMP) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) durch diese Kanäle diffundieren (Kumar und Gilula 1996). Über sogenannte myoendotheliale Gap Junctions, die v.a. in kleinen Widerstandsgefäßen, nicht aber in größeren Leitungsgefäßen (z.B. Arteria femoralis) nachweisbar sind (Sandow und Hill 2000), kann ein Stoffaustausch auch zwischen Endothel und glatter Muskulatur stattfinden. Über ihren geringen elektrischen Widerstand erlauben sie einen Ionenfluß zwischen Zellen entlang eines Spannungsgradienten, so dass sich Membranpotentialänderungen zwischen den Zellen elektrotonisch ausbreiten können. Somit bilden sie die molekulare Grundlage für elektrische Synzytien (Beny 1999).

Ionenkanäle

In der Membran aller Gefäßzellen sind Ionenkanäle nachweisbar, die eine mehr oder minder selektive Permeabilität für ein bestimmtes Ion aufweisen und durch die Änderung ihrer Leitfähigkeit entscheidend an der Generierung eines Membranpotentials beteiligt sind. Damit haben sie Einfluß auf den Tonus der Gefäße. Die Depolarisation des Membranpotentials hat eine Vasokonstriktion zur Folge, während eine Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen eine Dilatation nach sich zieht. Dabei spielen Kaliumkanäle eine zentrale Rolle. Endothel- und Gefäßmuskelzellen unterscheiden sich im Hinblick auf die Expression von Kaliumkanälen.

Endothelzellen exprimieren eine Reihe verschiedener Ionenkanäle, welche über den Kaliumstrom das Membranpotential variieren. Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle kleiner und mittlerer Leitfähigkeit (small conductance K^+ -Kanal, SK_{Ca} , und intermediate conductance K^+ -Kanal, IK_{Ca}) (Coleman *et al* 2004), sowie einwärts-gleichrichtende (inward rectifier, K_{IR}) und spannungsabhängige Kaliumkanäle (voltage dependent, K_{V}) spielen für das Membranpotential der Endothelzellen die größte Rolle. Aber auch Volumen-abhängige Kationenkanäle und Ca^{2+} -abhängige Chloridkanäle scheinen Einfluß auf das Membranpotential zu nehmen (Nilius und Droogmans 2001).

Glatte Gefäßmuskelzellen exprimieren vier verschiedene Typen von Kaliumkanälen, die unterschiedliche Aktivierungsmechanismen besitzen. Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle großer Leitfähigkeit (big conductance Kaliumkanal, BK_{Ca}) öffnen sich bei einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über den Schwellenwert von 3-10 $\mu\text{mol/L}$. ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP}) reagieren bei einem Anstieg der intrazellulären ATP-Konzentration mit einer Verminderung der Kaliumleitfähigkeit. Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_{V}) werden bei einer Depolarisation der Zellmembran zwischen -55 und -35 mV aktiviert. Die einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle (inward rectifying, K_{IR}) sind in der Nähe des K^+ -Gleichgewichtspotentials (ca. -90 mV) aktiv und werden bei weniger negativen Potentialen deaktiviert. Sie werden ebenfalls durch die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration aktiviert, und es kommt zu einem Nettoausstrom von Kalium über diesen Kanal und zur Hyperpolarisation. Neben Kaliumkanälen findet man in glatten Muskelzellen auch Chloridkanäle, mechanosensitive Kationenkanäle und verschiedene Calciumkanäle, die z.T. spannungsabhängig reguliert werden (Jackson 2000; Sobey 2001).

1.2.2 Mechanismen der Regulation des Gefäßtonus

Wie bereits oben erwähnt, kann die Perfusion eines Organs je nach Bedarf erheblich verändert werden. Dabei ist die Perfusion stark an den Sauerstoffverbrauch gekoppelt. Bei Inaktivität ist auch die Durchblutung sehr gering, bei Aktivität steigt die Durchblutung. Dies gilt in besonderem Maße für den Skelettmuskel, da sein Sauerstoffbedarf bei Aktivität sehr stark ansteigt.

Um eine Steigerung der Durchblutung zu ermöglichen, müssen die Gefäße im Ruhezustand des Skelettmuskels kontrahiert sein. Nur wenn diese vorbestehende Kontraktion gegeben ist, kann durch eine Relaxation des glatten Muskels und Gefäßdilatation eine Zunahme der Perfusion erfolgen. Diese vorbestehende Kontraktion, die in den präkapillären Widerstandsgefäßen zu finden ist, wird als Tonus bezeichnet. Der Tonus ist umso höher, je geringer der tatsächliche Durchmesser bezogen auf den maximal möglichen Durchmesser ist. Eine Reihe von Mechanismen beeinflussen den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur. Hierzu zählen neurohumorale, lokalhumorale und myogene Einflüsse.

Druckinduzierte Tonusregulation

Die Muskelzellen in der Gefäßwand weisen einen spontanen Kontraktionszustand auf, auch wenn auf sie keine pharmakologischen oder neuronalen Einflüsse wirken. Der sogenannte Basaltonus der Gefäße kommt durch die Dehnung aufgrund einer transmuralen Druckdifferenz zustande. In bestimmten Gefäßgebieten kann dieser Tonus rhythmisch variieren, was Vasomotion genannt wird (Gustafsson 1993). Daneben besitzen die Gefäßmuskelzellen eine myogene Reaktivität, die dadurch gekennzeichnet ist, dass die kleinen Arterien und die Arteriolen auf eine Steigerung der transmuralen Druckdifferenz mit einer kompensatorischen Tonuserhöhung reagieren (Bayliss-Effekt) (Davis und Hill 1999). Umgekehrt führt eine Abnahme der transmuralen Druckdifferenz zu einer Verminderung des Tonus. Diese Durchmesseränderungen führen dazu, dass bei unterschiedlichem Perfusionsdruck die Durchblutung konstant bleibt.

Nervale Tonusregulation

Neben diesen myogenen Mechanismen tragen nervalen Komponenten zu dem Ruhetonus in geringem Maße bei. Hier ist der Einfluss der vasokonstriktischen sympathischen Nervenfasern zu nennen. Ihre Zahl nimmt allerdings in Richtung der terminalen Strombahn ab. Die Rolle vasodilatatorischer vegetativer Nervenfasern ist funktionell eher von untergeordneter Bedeutung.

Aus den Varikositäten der postganglionären sympathischen Nervenfasern wird der Neurotransmitter Noradrenalin freigesetzt. Noradrenalin besitzt eine hohe Affinität zu

den α_1 -Rezeptoren. Nach Bindung an diesen Rezeptor wird die Phospholipase C aktiviert, die aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) den Botenstoff Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) synthetisiert. Durch Bindung an seinen auf der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisierten Rezeptor kommt es zu einer Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen, was (wie oben geschildert) zu einer Kontraktion der Gefäßmuskelzellen führt und somit eine Vasokonstriktion bedingt (Schlossmann *et al* 2003). Seine eigene Freisetzung kann Noradrenalin über die Bindung an die präsynaptisch exprimierten α_2 -Rezeptoren regulieren (Arribas *et al* 1991). Daneben können auch Metabolite wie ATP (Evans und Surprenant 1992), sein Endprodukt Adenosin (Nishigaki *et al* 1991) und H^+ -Ionen (McGillivray-Anderson und Faber 1990), die im Rahmen des Stoffwechsels gebildet werden, die Freisetzung von Noradrenalin hemmen. Funktionell ist die nervale Tonusregulation eher den zentralen Regulationmechanismen zuzuordnen, da das sympathische Nervensystem die Efferenz der zentralen Kreislaufregulation darstellt.

Metabolische Faktoren

Ist die Stoffwechselaktivität der Organe erhöht, muß auch der Blutfluß zunehmen: zum einen, um den höheren Sauerstoffbedarf der Organe zu decken, zum anderen, um Stoffwechselprodukte wie ADP, AMP, Adenosin, CO_2 , H^+ -Ionen und Laktat abzutransportieren. Diese Metabolite beeinflussen nicht nur die sympathischen Nervenfasern, sondern haben auch einen direkten Effekt auf den Gefäßtonus. Adenosin führt über die Aktivierung der A_1 - und A_2 -Rezeptoren zur Relaxation der glatten Muskulatur (Marshall 2000), Laktat beeinflusst die Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanäle (Mori *et al* 1998). Durch die Anhäufung der Stoffwechselprodukte kommt es lokal zu einer Gewebsazidose, was ebenso zu einer Dilatation der Arteriolen führt. Ob das Endothel hierbei als Mediator wirkt ist umstritten.

Endokrine Faktoren

Zirkulierende Hormone, die den Tonus der Gefäße beeinflussen, sind die im Nebennierenmark gebildeten Katecholamine (v.a. Adrenalin und Noradrenalin). Diese üben über α - und β -Rezeptoren einen modulierenden Einfluß auf den Kontraktionszustand der Gefäße aus. Das stark vasokonstriktorisches Angiotensin II wird durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) aus dem Vorläuferpeptid

Angiotensin I synthetisiert und wirkt insbesondere über AT_1 -Rezeptoren gefäßverengend. Auch die endokrinen Faktoren sind funktionell den zentralen Mechanismen der Blutdruckregulation zuzuordnen.

Endotheliale Faktoren

Das Endothel nimmt bei der lokalen Durchblutungsregulation eine zentrale Stellung ein. Diese Rolle wird durch die vom Endothel gebildeten *Autakoide* vermittelt. Unter dem Begriff Autakoide werden Substanzen zusammengefasst, die direkt in der Umgebung ihrer Bildung ihren Wirkort per diffusionem erreichen. Die Freisetzung dieser Autakoide ist nicht konstant, sondern abhängig vom Stimulationsgrad des Endothels durch mechanische Reize oder durch Substanzen, die es in seiner Funktion beeinflussen. Ein Molekül, das sowohl in vivo also auch experimentell zur Endothelstimulation verwendet wird, ist Acetylcholin (ACh). Es bindet an muscarinerge Rezeptoren und führt bei intaktem Endothel zur Freisetzung verschiedener Autakoide, die ihrerseits neben anderen Effekten auch eine Vasodilatation hervorrufen können. Daher spricht man in diesem Zusammenhang von endothelabhängiger Vasodilatation.

Unter physiologischen Bedingungen bildet das Endothel auf Stimulation die vasodilatatorischen Autakoide Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandin I_2 (PGI₂, Prostazyklin) und einen hyperpolarisierenden Faktor (EDHF, Endothelium-derived hyperpolarizing factor), dessen chemische Identität stark umstritten ist. Die Untersuchung der Rolle dieser Autakoide bei der ACh-induzierten Vasodilatation in den Widerstandsgefäßen steht im Zentrum der vorliegenden Arbeit, und daher werden diese im Folgenden näher erläutert.

1.3 Endotheliale Autakoide

1.3.1 Stickstoffmonoxid

Im Jahr 1980 beschrieben Furchgott und Zawadzki zum ersten Mal einen Faktor, der nach Stimulation von Aortenringen durch Acetylcholin vom Endothel gebildet wird und eine Vasodilatation herbeiführt (Furchgott und Zawadzki 1980). Diese als „Endothelium-Derived-Relaxing-Factor“ (EDRF) bezeichnete Substanz (Furchgott 1983) wurde später als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert (Ignarro *et al* 1987; Palmer *et al* 1987). Bisher wurden drei verschiedene NO synthetisierende Isoenzyme in Säugetieren charakterisiert: die neuronale NO-Synthase (nNOS), die induzierbare NO-Synthase (iNOS) und die endotheliale NO-Synthase (eNOS).

Bindet Acetylcholin an einen membranständigen muskarinergen Rezeptor (M_3), wird das Endothel stimuliert. Durch die Aktivierung der Phospholipase C und die Bildung von IP_3 werden Calciumionen aus intrazellulären Speichern freigesetzt. Daneben kommt es auch zum Einstrom von Calciumionen aus dem Extrazellulärraum über Ionenkanäle, wobei die Beteiligung verschiedener Kanäle diskutiert wird (receptor operated calcium channels, ROC; transient receptor potential channels; TRPC). Calcium bindet an Calmodulin, welches daraufhin die eNOS aktiviert (Busse *et al* 1991). Die NO-Synthase bildet aus der Aminosäure L-Arginin die Aminosäure L-Citrullin. Bei dieser Reaktion wird der Botenstoff NO freigesetzt (Palmer *et al* 1988). Aufgrund seiner chemischen Eigenschaften diffundiert NO rasch in die Umgebung. In den glatten Muskelzellen wurden bisher zwei intrazelluläre Zielproteine beschrieben, die nach Bindung von NO eine Relaxation auslösen können. Nelson und Quayle zeigten, dass NO direkt BK_{Ca} -Kanäle in der glatten Gefäßmuskulatur öffnen kann (Faraci und Heistad 1998; Nelson und Quayle 1995), was zu einem verstärkten Kaliumausstrom und damit zur Hyperpolarisation der Muskelzellen führt. Dadurch wird die Leitfähigkeit der spannungsabhängigen Calciumkanäle (L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle) reduziert und somit die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration vermindert. Die Muskelzelle relaxiert und das Gefäß dilatiert.

Der zweite Signaltransduktionsweg, der als entscheidend für die NO-induzierte Vasodilatation identifiziert wurde, ist die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase

(sGC). NO interagiert mit der Hämgruppe des Enzyms (Stone und Marletta 1996), und es kommt zu einer gesteigerten Synthese des second messenger zyklischen Guanosin-5-Monophosphat (cGMP) aus Guanosin-5-triphosphat (GTP). Dieses aktiviert die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGK), die in zwei Isoenzyme unterteilt werden. Die membranständige cGKII ist in vielen verschiedenen Organen zu finden (ZNS, Chondrozyten, Alveolarzellen, Niere). In glatten Gefäßmuskelzellen ist vor allem die zytoplasmatische cGKI α und β exprimiert, die über eine Phosphorylierung von intrazellulären Zielproteinen deren Aktivität ändert und so eine Vasodilatation herbeiführt. Hierbei sind verschiedene Zielproteine identifiziert worden, deren relative Bedeutung noch unklar ist. Durch Übertragung eines Phosphatrestes auf den BK_{Ca} wird dessen Offenwahrscheinlichkeit gesteigert, was zu einer Hyperpolarisation und einem reduzierten Einstrom von Ca²⁺-Ionen in die Zelle führt (Alioua *et al* 1998; Fukao *et al* 1999; Hofmann *et al* 2006). Die cGKI überträgt ebenfalls einen Phosphatrest auf ein Protein, welches mit dem IP₃-Rezeptor assoziiert ist. Diese als Inositol-1,4,5-trisphosphat-assoziierte-cGKI-Substrat (IRAG) bezeichnete Domäne (Schlossmann *et al* 2000) reduziert den IP₃-induzierten Ausstrom von Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum. Ausserdem kann die cGKI die Myosin-bindende Untereinheit der Myosinphosphatase phosphorylieren und so die Phosphatase aktivieren. Dieses Enzym dephosphoryliert das kontraktile Protein Myosin und beendet so die Interaktion mit dem Aktin. Dieser Mechanismus wird auch als Ca²⁺-unabhängige Dilatation bezeichnet (Hofmann *et al* 2000; Munzel *et al* 2003), da die Kontraktion calciumunabhängig beendet wird.

1.3.2 Prostazyklin

Ähnlich wie die Bildung von NO ist auch die Synthese von Prostacyclin an den Anstieg der Calciumkonzentration in den Endothelzellen gekoppelt. Die Phospholipase A₂ spaltet aus den Phospholipiden der Zellmembran Arachidonsäure ab. Die Zyklooxygenase wandelt diese in Prostaglandin H₂ um, aus dem die Prostaglandin I₂-Synthase die Bildung des vasodilatierenden Prostacyclins katalysiert. Nach seiner Diffusion bindet es in den glatten Muskelzellen an den membranständigen G-Protein-gekoppelten IP-Rezeptor (Smyth und FitzGerald 2002). Über ein G-Protein wird die Adenylatcyclase aktiviert, die dann den zweiten wichtigen second messenger im glatten Muskel, das zyklische Adenosin-5-Monophosphat (cAMP) synthetisiert. Der second messenger cAMP führt zur

Aktivierung der Proteinkinase A, welche ähnlich wie die cGK über eine Phosphorylierung unterschiedlicher Zielproteine eine Relaxation der glatten Muskelzelle bewirken kann (Shaul *et al* 1992). Ebenso wie NO kann auch Prostazyklin eine vom sekundären Botenstoff cAMP unabhängige Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen durch Öffnung von Kaliumkanälen bewirken (Jackson *et al* 1993; Jackson 1993). In diesem Fall soll es sich um ATP-abhängige Kaliumkanäle handeln. Die Endstrecke mit einer Hyperpolarisation und Relaxation des glatten Muskels ist dann identisch zu dem oben dargestellten Mechanismus.

1.3.3 Endothelium-derived hyperpolarizing factor

Wird die Bildung der genannten Autakoide durch Hemmung der NO-Synthase und der Zyklooxygenase unterbunden, so kommt es in vielen Präparaten und Organen dennoch zu einer Dilatation nach Stimulation des Endothels (Cowan und Cohen 1991). Daher muss mindestens ein weiterer Mediator oder Mechanismus einen Beitrag zur endothelabhängigen Vasodilatation leisten. Aufgrund der Annahme, dass es sich um einen diffusiblen, autokrin wirkenden Mediator handelt, und seiner Eigenschaft, die Relaxation durch eine Hyperpolarisation herbeizuführen, wurde er als Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) bezeichnet (Quilley *et al* 1997). Die chemische Identität und seine Quelle werden kontrovers diskutiert. Bislang wurden sehr heterogene Substanzen identifiziert, die als EDHF wirken können. So konnten zum einen Kaliumionen (Edwards *et al* 1998), zum anderen Anandamid, ein Endocannabinoid mit großer Affinität zum CB₁-Rezeptor (Randall und Kendall 1998), als EDHF in Mesenterialarterien der Ratte identifiziert werden. Einige Autoren berichten, dass auch Hydrogenperoxid Eigenschaften eines EDHF sowohl im Menschen als auch in der Maus aufweist (Matoba und Shimokawa 2003). In einer Vielzahl von Untersuchungen konnte in verschiedenen Gefäßbetten unterschiedlicher Spezies ein Derivat der Arachidonsäure, die 11,12 Epoxy-Eicosatriensäure (11,12-EET), als EDHF nachgewiesen werden. Diese Eicosanoide werden durch die Cytochrom P450-Monooxygenase und ihre Isoenzyme synthetisiert (Bolz *et al* 2000; Campbell *et al* 1996; de Wit *et al* 1999; Fisslthaler *et al* 1999; Hecker *et al* 1994; Pratt *et al* 2001).

Allen genannten möglicherweise als EDHF wirkenden Substanzen ist gemeinsam, dass sie zumindest in den jeweiligen Präparationen die wesentlichen Kriterien

erfüllen: Sie lösen eine Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen aus, die Hemmung ihrer Bildung hebt die endothelabhängige Dilatation auf, und die externe Applikation der jeweiligen Substanzen führt zu einer Hyperpolarisation und Dilatation. Dabei ist allen als EDHF postulierten Substanzen gemein, dass sie zu einer Öffnung von Kaliumkanälen im Endothel und/oder in der glatten Gefäßmuskulatur führen, was letztendlich die Vasodilatation auslöst. (Burnham *et al* 2002; Busse *et al* 2002; Coleman *et al* 2004; Cowan *et al* 1993; Murphy und Brayden 1995). Welche Kaliumkanäle an der EDHF-induzierten Vasodilatation beteiligt sind, ist ein Gegenstand der vorliegenden Untersuchung. Die Identifikation des beteiligten Kanals läßt möglicherweise auch Schlüsse auf den EDHF zu.

1.4 Fragestellung

1.4.1 Stickstoffmonoxid-vermittelte Dilatation

Es wurden unterschiedliche Wege beschrieben, durch die Stickstoffmonoxid eine Vasodilatation herbeizuführen kann: direkte Aktivierung von Kaliumkanälen in der glatten Muskulatur oder Aktivierung der cGMP/cGKI- mit nachfolgenden Signalkaskade. Unklar ist, wie bedeutsam diese Mechanismen in Widerstandsgefäßen *in vivo* sind. Dieser Frage wurde in dieser Arbeit nachgegangen, indem cGKI-defiziente Mäuse untersucht wurden.

1.4.2 Bedeutung von NO bei der Acetylcholin-induzierten Dilatation

Das Endothel ist nicht nur Grenzschicht zwischen Blutstrom und Gefäßwand, sondern ein komplexes Organ, welches u.a. über die Synthese von NO Einfluß auf den Gefäßdurchmesser und damit den arteriellen Druck ausübt. Obwohl in großen Leitungsgefäßen NO als wichtiger endothelialer Mediator identifiziert ist, ist seine Rolle in bei der endothelabhängigen Dilatation in den funktionell wichtigen Arteriolen umstritten. Neben NO könnten auch Prostaglandine eine Mediatorfunktion haben. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Beteiligung von NO und Prostaglandinen bei der endothelabhängigen Dilatation in der Mikrozirkulation des Skelettmuskels untersucht.

1.4.3 Beteiligung der CYP-P450-Monooxygenase und Ca^{2+} -abhängiger Kaliumkanäle bei der EDHF-vermittelten Dilatation

Verschiedene Untersuchungen schreiben EDHF mit abnehmender Gefäßgröße eine zunehmende Bedeutung bei der endothelabhängigen Vasodilatation zu. Seine Identität ist umstritten. In verschiedenen Präparationen wurden Derivate der Cytochrom-P450-Monooxygenase als hyperpolarisierender Faktor nachgewiesen. Als Endstrecke der EDHF-Wirkung wird die Gruppe der Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanäle diskutiert. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Arachidonsäurederivate als EDHF in den Widerstandsgefäßen der Maus fungieren und welche der verschiedenen Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanäle eine Dilatation nach Endothelstimulation auslösen.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden einerseits Messungen des arteriellen Drucks an wachen Tieren über einen in die Arteria carotis implantierten Katheter vorgenommen. Andererseits wurde mittels intravitalmikroskopischer Untersuchung die Dilatation der Arteriolen im Skelettmuskel direkt beobachtet. Die Untersuchungen wurden in Wildtyp-Tieren sowie cGKI- und eNOS-defizienten Mäusen vorgenommen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Von PD Dr. Robert Feil, Technische Universität München, wurden freundlicherweise Mäuse, die defizient für die cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGKI^{-/-}) waren, sowie deren Wildtyp-Wurfgeschwister, die ein intaktes Gen für die cGMP-abhängige Proteinkinase aufwiesen (cGKI^{+/+}), zur Verfügung gestellt. Sie gingen aus der Verpaarung von heterozygoten Elterntieren (cGKI^{+/-}) mit einem 129Sv genetischem Hintergrund hervor. Bevor die Mäuse für die Versuche verwendet wurden, erfolgte an der Technischen Universität München eine Genotypisierung der Tiere mittels PCR.

Mäuse, die defizient für die endotheliale NO-Synthase mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6 waren, wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Axel Gödecke, Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt und in der institutseigenen Tierhaltung weiter gezüchtet und aufgezogen. Die Tiere wurden in Makrolon-Käfigen Typ 2, mit bis zu sechs Tieren bei freiem Zugang zu Standardfutter und Trinkwasser gehalten. Von der Firma Charles River (Sulzfeld) wurden Mäuse mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6 bezogen und ebenfalls im Institut weitergezüchtet. Alle Mäuse wiesen zum Untersuchungszeitpunkt ein Körpergewicht von 13 bis 37g auf. Die Versuche erfolgten in Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz und waren durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ211-2531-12/99).

2.1.2 Substanzen

Von der Firma Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, wurden folgende Substanzen bezogen: Acetylcholin (ACh), Adenosin (ADO), Nitroprussid-Natrium (SNP), N^o-nitro-L-Arginin (L-NA), Sulfaphenazol (Sulfa) und 17-Octadecynolsäure (17-ODYA). Apamin und Iberiotoxin (Ibtx) wurden von der Firma Bachem, Weil am Rhein, Indometacin-Natrium (Confortid, Indo) von Dumex, Bad Vilbel und S-Nitroso-N-Acetyl-D/L-Penicillamin (SNAP) von der Firma Alexis Biochemicals, Grünberg, geliefert. AppliChem, Darmstadt, lieferte die Salze NaCl, KCl, CaCl₂, MgSO₄, NaHCO₃, KH₂PO₄ zur Herstellung der Krebs-Pufferlösung. Für die Narkose bzw.

deren Antagonisierung wurden Fentanyl (Fentanyl-0.5mg-Curamed[®]) von der Firma Cura-Med, Karlsruhe, Midazolam (Midzolam-ratiopharm[®]) von der Firma Ratiopharm, Ulm, Medetomidin (Domitor[®]) und Atipamezol (Antisedan[®]) von Pfizer, Karlsruhe, Flumazenil (Anexate[®]) von Hoffman-La Roche AG Grenzach-Wyhlen und Naloxon (Narcanti[®]) von Bristol-Myers Squibb GmbH München bezogen.

2.1.3 Lösungen

Als Lösung zur Superfusion des präparierten Musculus cremaster wurde eine Krebs-Pufferlösung mit folgender Zusammensetzung verwendet:

143 mmol/L	Na ⁺
6 mmol/L	K ⁺
2.5 mmol/L	Ca ²⁺
1.2 mmol/L	Mg ²⁺
128 mmol/L	Cl ⁻
25 mmol/L	HCO ₃ ⁻
1.2 mmol/L	SO ₄ ²⁻
1.2 mmol/L	H ₂ PO ₄ ⁻

Die Pufferlösung wurde mit einem Gemisch aus 95% N₂ und 5% CO₂ begast, so dass ein pCO₂ von ca. 40 mm Hg erreicht wurde. Die durch diesen Druck eingestellte CO₂-Konzentration und die in der Lösung vorhandene HCO₃⁻-Konzentration führte zu einem pH-Wert von 7.4. Der gemessene O₂-Partialdruck in der Lösung nach Erreichen des Präparats betrug 30 mm Hg, was durch den Sauerstoff der Umgebungsluft bedingt war.

Da ein Teil der verwendeten Substanzen eine geringe Löslichkeit in der verwendeten Pufferlösung aufweist, wurden diese zunächst in einem geeignetem Lösungsmittel angesetzt und anschließend mit Krebs-Lösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt: Nitroprussid-Natrium wurde in 1 mmol/L Natrium-Acetat-Lösung in einer Konzentration 10 mmol/L gelöst. N^ω-nitro-L-Arginin (6 mmol/L) wurde in destilliertem Wasser bei einer Temperatur von 55°C gelöst. Iberiotoxin (0,1 mmol/L), Apamin (0,1 µmol/L) und Indometacin-Natrium (12 mmol/L) wurden in Aqua dest., Sulfaphenazol (6 mmol/L) und 17-Octadecynolsäure wurden in 60% Ethanol gelöst. Acetylcholin

und Adenosin wurden direkt in der Pufferlösung gelöst. Alle Lösungen wurde nunmittelbar vor Versuchsbeginn frisch angesetzt.

2.1.4 Weitere Materialien

Die technischen Gase zur Begasung der Pufferlösung wurden von der Firma Linde, München, geliefert. Chirurgisches Nahtmaterial (monofiler, atraumatischer 6/0 Polypropylenfaden, Prolene[®]) zur Präparation des M. cremaster wurde von der Firma Ethicon, Hamburg, geliefert. Polyethylenkatheter PE 10 (Innendurchmesser: 0.28mm; Aussendurchmesser: 0.61mm) und PE50 (Innendurchmesser: 0.5mm; Aussendurchmesser: 1.00mm) zur Kanülierung der Gefäße und zur Intubation der Trachea wurden von der Firma Schubert, München, bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation der Versuchstiere

Neuroleptanalgesie

Durch intraperitoneale Injektion von Fentanyl (0,05 mg/kg), Midazolam (5 mg/kg) und Medetomidin (0,5 mg/kg) wurde die Narkose eingeleitet. Nach ca. 10 Minuten war das Toleranzstadium erreicht, so dass die Präparation begonnen werden konnte. Diese Substanzen wurden mit Ringer-Lösung im Verhältnis 1:10 verdünnt und während der Intravitalmikroskopie mittels einer Infusionspumpe (Perfusor VII[®], B. Braun Melsungen AG, Melsungen) nach Kanülierung der rechten Vena jugularis kontinuierlich mit einer Rate von 0.1-0.2 ml/min/kg infundiert. Nach Abschluß des Versuches wurden die Tiere durch eine Überdosierung der Narkotika getötet.

Katheterimplantation

Nach Rasur wurde über einen medianen Hautschnitt die Trachea dargestellt und diese zwischen zwei Knorpelspannen im oberen Drittel inzidiert. Anschließend wurde ein ca. 2 cm langer Polyethylenschlauch PE50 als Tubus im Lumen plaziert und dann mit zwei Baumwollfäden an der Luftröhre fixiert. Dies erleichterte die Spontanatmung der Tiere; außerdem konnte bei Abfall der Atemfrequenz bzw. bei Sistieren der

Spontanatmung durch eine Beatmungsmaschine (7025 Rodent Ventilator, Hugo Sachs Elektronik, Freiburg) die Ventilation sichergestellt werden. Die Beatmung erfolgte dann mit Raumluft und einer Frequenz von 130-135 Zügen pro Minute bei einem Beatmungsdruck von 3-6 cm H₂O. Über denselben Hautschnitt wurde die rechte Vena jugularis freipräpariert und mit einem Polyethylenschlauch PE10, der mit isotoner NaCl-Lösung gefüllt war, katheterisiert. Anschließend wurde der zentralvenöse Zugang durch drei Baumwollfäden am Gefäß fixiert, nachdem die korrekte intraluminale Lage durch Blutaspiration und Flüssigkeitsinjektion überprüft worden war. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Narkose über diesen Zugang aufrechterhalten.

Eine invasive arterielle Druckmessung an der Maus wurde in wachen Tieren vorgenommen. Nach Narkoseeinleitung wurde den Versuchstieren über den o.g. Zugangsweg lediglich ein mit isotoner NaCl-Lösung gefüllter Polyethylenkatheter in die Arteria carotis implantiert, der zuvor nach Erhitzen in einen Winkel von ca. 90° gebogen und dessen Durchgängigkeit geprüft wurde. Der Schlauch wurde im umgebenden Muskelgewebe mit einer Einzelknopfnahnt fixiert, subcutan nach dorsal geführt und hinter dem rechten Ohr ausgeleitet.

Präparation des Musculus cremaster

Die Maus wurde auf einer speziell gefertigten, mit Heizelementen versehenen Plexiglas-Arbeitsbühne (Werkstatt des Instituts) gelagert, so dass der Musculus cremaster für die Intravitalmikroskopie nach der von Baez (Baez 1973) beschriebenen Methode zugänglich gemacht werden konnte. Hierfür wurde das Skrotum am unteren Pol durch einen kleinen Hautschnitt eröffnet und der Schnitt anschließend streng subkutan bis in die Inguinalregion verlängert. Anschließend wurde der Pol des nun freiliegenden M. cremaster durch chirurgisches Nahtmaterial fixiert und vertikal aufgespannt, um ihn vom Bindegewebe zu befreien. Der Muskel wurde zwischen den Hinterbeinen ausgelagert und über dem Deckglas, das auf der Arbeitsbühne befestigt war, an einem Silikonring fixiert. Dann wurde der Muskelsack unter Schonung großer Gefäße inzidiert und bis zur Basis eröffnet. Mit insgesamt ca. sechs Einzelknopfnähten wurden die Ränder des Muskels am Silikonring fixiert, so dass dieser flach auf dem Deckglas zu liegen kam. Das Ligament zwischen

Cremastermuskel und Hoden wurde durchtrennt und der Hoden in die Bauchhöhle reponiert. Auftretende Blutungen wurden mit einem LötKolben kauterisiert.

2.2.2 Intravitalmikroskopie

Apparativer Versuchsaufbau

Sowohl während der Präparation als auch während des Versuchs wurde der Cremastermuskel mit einer Krebs-Pufferlösung (s. Abschnitt 2.1.3) überströmt. Durch Begasung (95% N₂ und 5%CO₂) der Pufferlösung wurde ein konstanter pH-Wert sichergestellt (pH 7.4). Außerdem wurde die Lösung über einen Wärmekreislauf auf 34°C erwärmt, bevor sie das Präparat erreichte (**Abbildung 2.1**). Um dem Superfusat lokal applizierte Substanzen in einem Verhältnis von 1:100 durch eine Rollerpumpe (Minipuls 2, Abimed, Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich) beizumischen, wurde die Fließgeschwindigkeit der Pufferlösung in Abhängigkeit von dem durch die Rollerpumpe geförderten Volumen auf 2 ml/min oder 8 ml/min eingestellt und vor jedem Versuch neu kalibriert. Alle Konzentrationsangaben sind Endkonzentrationen, die auf dem untersuchten Gewebe erreicht wurden. Die Arteriolen des Cremastermuskels wurden mit Hilfe eines binokularen Mikroskops (Metallux 3, Leitz, Wetzlar; Objektiv: 32x, Apertur: 0.32; Okular: 10x) untersucht. Über eine Schwarz-Weiß-Videokamera (PCO Computer Optics, Kehlheim) wurde die Mikrozirkulation auf einem Bildschirm (Sony, PVM-1442 QM, Japan) dargestellt. Über einen Videotimer (VTG 33, FOR.A.-Company, Japan) wurde in dieses Bild ein Zeitsignal eingeblendet. Zur späteren Datenauswertung wurden mikroskopische Bilder mit Hilfe eines Videorekorders (Panasonic, AG-5700, Japan) auf Videoband aufgenommen. Zur Durchmesserbestimmung wurden die aufgezeichneten Videosequenzen mit Hilfe eines Programms (Optimas 6.5, 1999, Media Cybernetics, Leiden, Niederlande) digitalisiert und auf einem Computerbildschirm dargestellt. Mit einem im Labor entwickelten Makro der Software konnte ein Standbild dargestellt werden, um die inneren Gefäßränder mit zwei Balken zu markieren. Der Abstand der beiden Balken, multipliziert um den Vergrößerungsfaktor, ergab den Gefäßdurchmesser. Der Vergrößerungsfaktor wurde zuvor mit einem Objektmikrometer bestimmt und errechnet.

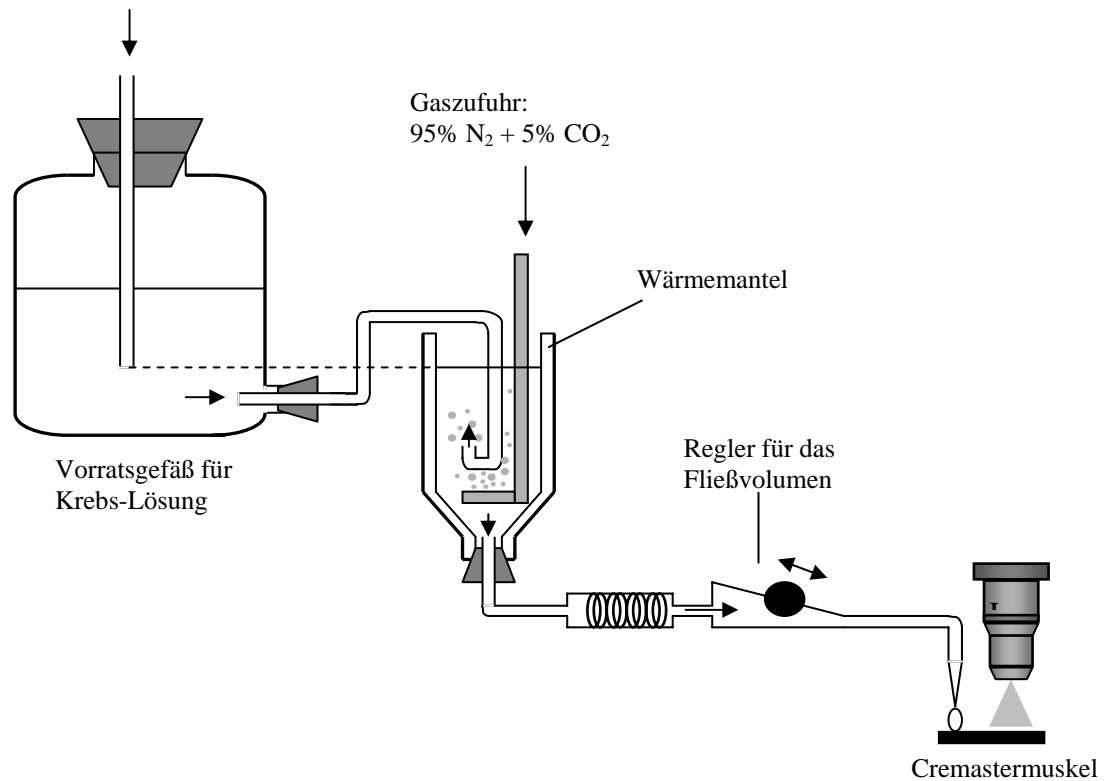


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung des während der Intravitalmikroskopie benutzten Superfusionssystems.

Die Superfusion verhinderte ein Austrocknen und Auskühlen des Cremastermuskels. Aus dem Vorratsgefäß wurde die Krebs-Lösung in ein zweites Gefäß geleitet, wo es mit einem Gasgemisch equilibriert wurde, um den pH-Wert konstant bei 7,40 zu halten. Durch den Wärmemantel um das zweite Gefäß und den Durchlauferwärmer erreichte man eine Temperatur der Superfusion von 34°C während Überströmung des Muskels. Über einen vorgeschalteten Infusionsregler wurde die Menge der Superfusion konstant auf 8 ml/min eingestellt.

Genereller Versuchsablauf: Diskontinuierliche Durchmessermessung

Prinzipiell wurden in einem Experiment sequentiell 7 – 14 Arteriolen mit einem Durchmesser von 4 – 50 µm untersucht. Arteriolen, die zu Versuchsbeginn keinen Spontantonus aufwiesen oder im Bereich von Blutungen im Muskel lagen, wurden nicht in die Untersuchung aufgenommen.

Um die Bedeutung der endothelialen Autakoide im Gefäßbett zu untersuchen, wurden die Durchmesser der Arteriolen während der Gabe von Hemmstoffen und vasoaktiven Substanzen aufgezeichnet. Anhand markanter Strukturen (z.B. Nerven, Venen, Gefäßabgänge) wurde eine Skizze des Präparats angefertigt, um zu gewährleisten, dass immer exakt dieselben Lokalisationen der Gefäße aufgesucht wurden. Über die oben genannte Rollerpumpe wurden der Superfusion verschiedene

Substanzen hinzugefügt, und die Gefäße unmittelbar vor und während der Applikation untersucht. Dies geschah unter Beachtung der unterschiedlichen Zeitpunkte des Wirkeintrittes der verwendeten Pharmaka. Im Untersuchungsverlauf wurden die Arteriolen der Reihe nach für ca. fünf Sekunden in das Blickfeld eingestellt und Bilder auf dem Videoband aufgezeichnet. Anhand dieser Sequenzen konnte die induzierte Durchmesseränderung nach Messung des inneren Durchmessers berechnet werden. Bevor eine andere Substanz bzw. eine andere Konzentration der verwendeten Substanz superfundiert wurde, wurde der Muskel für ca. 2 Minuten ausschließlich mit Krebs-Pufferlösung überströmt, um ein Auswaschen der Substanz und eine Rückkehr der Gefäßdurchmesser zu ihrem Ausgangswert zu ermöglichen. Nach Abschluss aller Untersuchungen wurde eine Kombination aus verschiedenen Vasodilatoren über den Cremastermuskel superfundiert, um eine maximale Dilatation zu erzeugen und damit den maximalen Gefäßdurchmesser D_{max} zu bestimmen. Zur Verwendung kamen Acetylcholin, SNP und Adenosin (jeweils 0,1 mmol/L).

2.2.3 Versuchsprotokolle bei der Intravitalmikroskopie

NO-induzierte Dilatation

In dieser Versuchsreihe wurde der Frage nachgegangen, wie bedeutend der cGMP/cGKI-Signaltransduktionsweg bei einer durch Stickstoffmonoxid (NO) induzierten Dilatation der Arteriolen ist. Hierzu wurde der Durchmesser vor jeder Superfusion gemessen, anschließend zunächst Natriumnitroprussid (SNP) in aufsteigenden Konzentrationen (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/L}$) superfundiert und die Durchmesseränderung registriert. SNP setzt spontan NO frei, weshalb es zu den nicht-enzymatischen NO-Donoren gezählt wird. Ausserdem wurde in einer zweiten Versuchsreihe der ebenfalls nicht-enzymatische NO-Donor S-Nitroso-N-Acetyl-D/L-Penicillamin in den zwei Konzentrationen 1 und 10 $\mu\text{mol/L}$ superfundiert.

Wirkung von Indometacin auf die endothelabhängige Vasodilatation

In einer weiteren Versuchsreihe wurde das Endothel pharmakologisch stimuliert und wiederum die Durchmesseränderung der Gefäße registriert. Als Endothelstimulator wurde Acetylcholin (Furchgott und Zawadzki 1980) in aufsteigenden Konzentrationen

verwendet (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/L}$). Das Versuchsprotokoll wurde zweimal durchgeführt, zunächst in Ab-, dann in Anwesenheit des Inhibitors der Zyklooxygenase Indometacin (3 $\mu\text{mol/L}$). Hierdurch konnte der Einfluß von Prostaglandinen als Mediator der endothelabhängigen Dilatation untersucht werden. Um die endogene Prostaglandinsynthese effektiv zu hemmen, wurde Indometacin mindestens 30 min superfundiert, bevor die Serie wiederholt wurde. Indometacin wurde während des Experiments weiter kontinuierlich appliziert. Nachdem eine Versuchsreihe mit Acetylcholin abgeschlossen war, wurde SNP in der Konzentration 10 $\mu\text{mol/L}$ superfundiert und die Dilatationen registriert.

Wirkung von ODYA und Sulfaphenazol auf die endothelabhängige Vasodilatation

Hier wurde die Bedeutung der Cytochrom-P450-Monooxygenase bei der Acetylcholin-vermittelten Dilatation untersucht. Diese Versuche fanden in Anwesenheit von Indometacin (3 $\mu\text{mol/L}$) statt und wurden in eNOS-defizienten Mäusen durchgeführt. Die Arteriolen wurden durch Acetylcholin (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/L}$) vor und nach der Hemmung der Cytochrom-P450-Monooxygenase durch Sulfaphenazol (Sulfa 20 $\mu\text{mol/L}$, mindestens 30 Minuten Einwirkzeit) (Hoepfl *et al* 2002; Mancy *et al* 1996) oder 17-Octadecynolsäure (ODYA 100 $\mu\text{mol/L}$, mindestens 30 Minuten Einwirkzeit) (Wang *et al* 1998) stimuliert. Nach der Registrierung der ACh-induzierten Dilatationen erfolgte die Superfusion von 10 $\mu\text{mol/L}$ SNP, um zu untersuchen, ob die Gefäße durch diese Inhibitoren ihre Fähigkeit zur Dilatation einbüßten.

Wirkung von Iberiotoxin auf die endothelabhängige Vasodilatation

In dieser Versuchsreihe sollte in Wildtyptieren der Einfluß von Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanälen großer Leitfähigkeit (BK_{Ca}) mit Hilfe des spezifischen Inhibitors Iberiotoxin (Ibtx 0,1 $\mu\text{mol/L}$, 10 Minuten Einwirkzeit) (Jackson 2000) in Anwesenheit von Indometacin (3 $\mu\text{mol/L}$) untersucht werden. Die durch Acetylcholin (1 bis 10 $\mu\text{mol/L}$) induzierte Dilatation der Arteriolen wurde vor und nach Applikation des BK_{Ca} -Inhibitors Iberiotoxin registriert. Desweiteren wurde in weiteren Versuchsreihen der Inhibitor der endothelialen NO-Synthase N^{ω} -nitro-L-Arginin (L-NA, 30 $\mu\text{mol/L}$,

Einwirkzeit mindestens 30 Minuten) vor bzw. nach Iberiotoxin-Behandlung appliziert. L-NA ist ein spezifischer Inhibitor der NO-Synthase.

Wirkung von Apamin auf die endothelabhängige Vasodilatation

Um den Einfluß der Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanäle kleiner Leitfähigkeit (SK_{Ca}) auf die Acetylcholin-induzierte Dilatation zu untersuchen, wurde der spezifische Inhibitor dieses Kanals Apamin (0,1 $\mu\text{mol/L}$; 10 Minuten Einwirkzeit) (Jackson 2000) verwendet. Dies geschah in Anwesenheit von Indometacin (3 $\mu\text{mol/L}$) und L-NA (30 $\mu\text{mol/L}$). ACh wurde in aufsteigenden Konzentrationen (1 bis 10 $\mu\text{mol/L}$) appliziert und die Dilatationen vor und nach Apamin-Behandlung gemessen. In dieser Versuchsreihe wurde ebenfalls Iberiotoxin (0,1 $\mu\text{mol/L}$) als zusätzlicher Inhibitor nach Apamin hinzugefügt.

2.2.4 Makrohämodynamische Messung

Zur Bestimmung der basalen hämodynamischen Parameter (arterieller Blutdruck und Herzfrequenz) wurde den Versuchstieren unter Narkose ein Katheter in die Arteria carotis implantiert (s. Abschnitt 2.2.1.2). Der Katheter wurde durch eine Metallhülse geführt und über ein drehbares Gelenkstück an einen Druckabnehmer (Bell & Howell, Pasadena, California, USA) angeschlossen. Diese Vorrichtung (Instech Laboratories Inc., Plymouth Meeting, Pennsylvania, USA) verhindert ein Verdrillen des Schlauches und ermöglicht den Tieren eine nahezu uneingeschränkte Bewegungsfreiheit. Zwei Stunden nach der subcutanen Applikation der Antagonisten (Atipamezol 2,5 mg/kg, Flumazenil 0,5 mg/kg, Naloxon 1,2 mg/kg) der Neuroleptanalgesie erfolgte die kontinuierliche Aufzeichnung des Blutdrucks im wachen Tier mit einer Frequenz von 1000 Hz über einen Analog-Digital-Wandler. Die Daten wurden mit Hilfe eines Datenverarbeitungsprogramms (Xmad) auf die Festplatte eines Pentium-II-Computers zur späteren Analyse gespeichert. Die hohe Datenaufnahmerate ermöglichte die Berechnung der Herzfrequenz aus den gespeicherten Blutdruckwerten mit einer Schlag-zu-Schlag Auflösung. Hierzu wurde ein weiteres Computerprogramm (Xmana) verwendet. Nachdem der arterielle Blutdruck über 60 Minuten aufgezeichnet worden war, wurden den Versuchstieren über den arteriellen Katheter zunächst SNP im Bolus von 0,05 bis 15 nmol injiziert, anschließend Acetylcholin in einer Menge von 0,5 bis 5 nmol. Der arterielle Druck wurde 30

Sekunden vor und bis 90 Sekunden nach den Bolusinjektionen, die innerhalb von 5 Sekunden erfolgten, ebenfalls aufgezeichnet und ausgewertet.

2.3 Datenauswertung

2.3.1 Statistik und Berechnungen

Alle dargestellten Werte sind als Mittelwert mit der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) angegeben. Für statistische Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurde der ungepaarte und für Vergleiche innerhalb einer Gruppe der gepaarte t-Test verwendet. Unterschiede wurden als signifikant betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% ($p < 0.05$) war.

Die Dilatationswerte sind als Prozent der maximalen Dilatationskapazität angegeben, die nach der folgenden Formel berechnet wurden:

$$\% \text{ der Dilatationskapazität} = \frac{(D_{AG} - D_{KO})}{(D_{MAX} - D_{KO})} * 100$$

D_{AG} repräsentiert den Durchmesser in der Gegenwart eines Agonisten, D_{KO} den Kontrolldurchmesser, der unmittelbar vor Applikation des Agonisten gemessen wurde und D_{MAX} den maximalen Durchmesser, welcher am Ende des Experiments gemessen wurde. Die Normierung der Durchmesserzunahme ($D_{AG} - D_{KO}$) eines Gefäßes auf die maximal mögliche Dilatation ($D_{MAX} - D_{KO}$) erlaubt es, die Antwort des Gefäßes unabhängig von seinem absoluten Durchmesser bzw. seines Kontraktionszustands zu beurteilen. Der Tonus der untersuchten Arteriolen ist angegeben als Quotient des Durchmessers, bezogen auf den maximalen Durchmesser, der am Ende des Versuchs durch Gabe der Vasodilatoren bestimmt wurde. Daraus ergibt sich der Tonus als dimensionslose Zahl. Weiterhin wurden die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen bestimmt. Die maximale Antwort (E_{Max}) und die Konzentration, die eine halbmaximale Antwort hervorruft (EC_{50}) wurden durch nicht-lineare Regressionsanalyse entsprechend der folgenden Formel errechnet:

$$E = \frac{E_{Max} * \text{Konzentration}}{(EC_{50} + \text{Konzentration})}$$

Hierbei ist E jeweils der gemessene Effekt (Dilatation) bei den einzelnen untersuchten Konzentrationen. Signifikante Änderungen der E_{Max} und EC_{50} wurden nach der von Meddings und Mitarbeitern (Meddings *et al* 1989) beschriebenen Methode errechnet.

2.3.2 Verwendete Software

Der Durchmesser der Arteriolen wurde mit Optimas 6.5[®] (Media Cybernetics, Leiden, Niederlande) erhoben. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Computerprogramm STATA 6.0[®] (Stata Corporation, College Station, Texas, USA), die gezeigten Grafiken wurden mit dem Programm SigmaPlot 2001[®] (SPSS Inc, Chicgo, Illinois, USA) erstellt. Zur digitalen Datenaufnahme wurden die beiden frei verfügbaren Programme Xmad (www.metalab.unc.edu/pub/Linux/science/lab/xmad-4.2) und Xmana (www.metalab.unc.edu/pub/Linux/science/lab/xmana-2.6), die von Harald M. Strauss entwickelt wurden, eingesetzt. Zur Textverarbeitung wurde Word XP[®] (WindowsXP, Microsoft, München) und für die Literaturbearbeitung Reference Manager 9.0[®] (Research Information System, Carlsbad, California, USA) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz in wachen Tieren

Zunächst wurden die basalen hämodynamischen Parameter im wachen Zustand bestimmt. Daher wurde eine Blutdruck- und Herzfrequenzmessung im wachen Tier in acht Wildtyp- (Alter: 48 ± 5 Tage), sechs cGKI-defizienten (Alter: 52 ± 6 Tage) und sechs eNOS-defizienten Tieren (Alter: 46 ± 2 Tage) durchgeführt. Die gemessenen Werte wurden über 60 Minuten gemittelt.

Die cGKI-defizienten Tiere (cGKI^{-/-}) zeigten im Vergleich zu ihren Wildtypwurfgeschwistern (WT) keinen Unterschied im mittleren arteriellen Druck (cGKI^{-/-} 106 ± 6 mm Hg, WT 104 ± 6 mmHg; **Abbildung 3.1**). Auch die Herzfrequenz war zwischen den Genotypen nicht verschieden (**Abbildung 3.1**). Im Gegensatz hierzu hatten Tiere, die eine Defizienz der endothelialen NO-Synthase aufwiesen, einen signifikant höheren mittleren arteriellen Druck (127 ± 9 mmHg; $p < 0,05$ vs. wt), während die Herzfrequenz im Vergleich zu Wildtyptieren signifikant niedriger war (**Abbildung 3.1**).

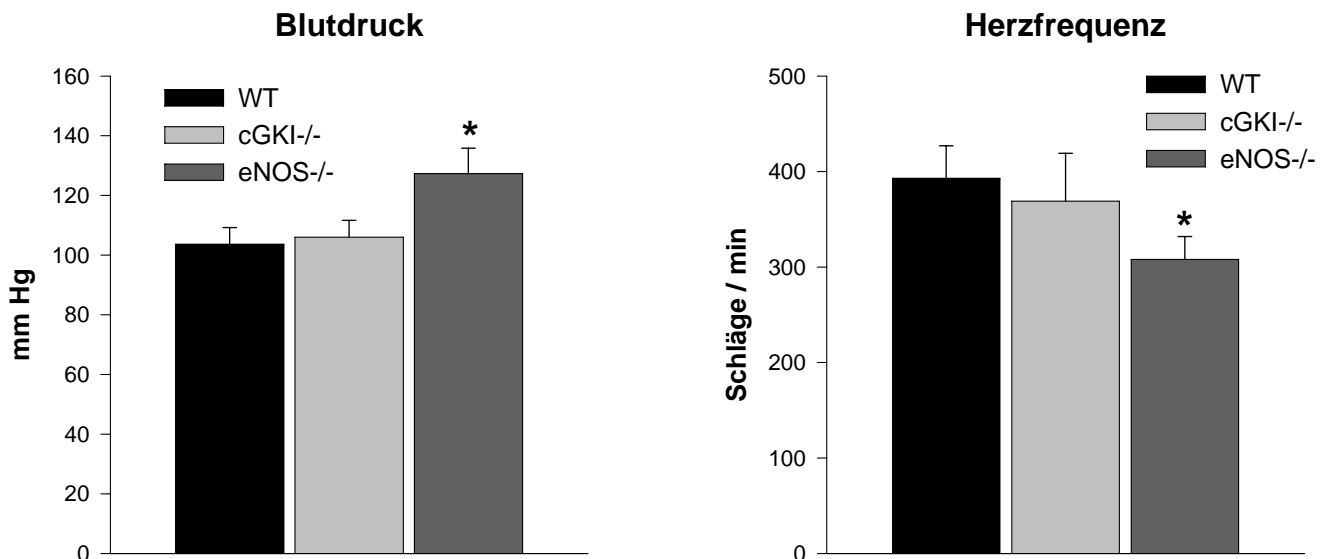


Abbildung 3.1 Mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz. Angegeben ist der mittlere arterielle Blutdruck und die Herzfrequenz, die über 60 Minuten in Wildtyp-, cGKI^{-/-}- und eNOS^{-/-}-Tieren gemessen wurden. *: $p < 0,05$ vs WT

WT n = 8 Tiere; cGKI^{-/-} n = 6 Tiere; eNOS^{-/-} n = 6 Tiere

3.2 Applikation von Stickstoffmonoxid (NO)

Es wird vermutet, dass NO seine vasodilatierende Wirkung hauptsächlich über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase entfaltet, welche cGMP synthetisiert und in der Konsequenz die cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGKI) aktiviert. Es sollte untersucht werden, ob diese Signaltransduktionskaskade die Wirkung von NO in Widerstandsgefäßen vermittelt. Dies wurde einerseits durch Messung des Blutdrucks und andererseits mittels Intravitalmikroskopie durchgeführt.

3.2.1 Wirkung von NO auf den arteriellen Blutdruck

Die synthetische Verbindung Nitroprussid-Natrium (Sodium-Nitroprusside, SNP), die spontan Stickstoffmonoxid freisetzt (Ignarro *et al* 1981; Napoli und Ignarro 2003) wurde als Bolus in die Arteria carotis der Tiere verabfolgt. Die Applikation von drei verschiedenen SNP-Dosierungen (0,05 nmol, 0,5 nmol, 5 nmol) erfolgte in denselben Versuchstieren, in denen vorher die Messung der basalen hämodynamischen Parameter durchgeführt worden war (siehe Abschnitt 3.1).

Die Injektion von SNP führte zu einem sofortigen Druckabfall, der in Abhängigkeit von der Konzentration unterschiedlich ausgeprägt und von verschiedener Dauer war. Nach der SNP-Injektion erreichte der arterielle Mitteldruck in Wildtyp-Tieren ($n = 8$) nach 11 ± 1 (0,05 nmol), 14 ± 1 (0,5 nmol) bzw. 18 ± 1 Sekunden (5,0 nmol) ein Minimum. Das erreichte Minimum war dosisabhängig. Nach 0,05 nmol SNP fiel der Druck von 136 ± 7 auf 127 ± 9 mmHg ($p < 0,05$), nach 0,5 nmol auf 113 ± 5 mmHg ($p < 0,05$) und nach 5,0 nmol auf 85 ± 5 mmHg ($p < 0,05$). Somit zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der Amplitude des Druckabfalls (0,05 nmol: 9 ± 3 mmHg; 0,5 nmol: 22 ± 5 mmHg; 5,0 nmol: 51 ± 6 mmHg). Der Druck kehrte dann allmählich zum Ausgangswert zurück. Die Dauer dieses Zeitintervalls zeigte ebenso wie die Amplitude eine klare Abhängigkeit von der verwendeten Dosis (0,05 nmol: 36 ± 6 s; 0,5 nmol: 52 ± 10 s; 5,0 nmol: 83 ± 8 s). Die **Abbildung 3.2** zeigt den zeitlichen Verlauf des mittleren arteriellen Drucks. Die Applikation des Lösungsmittels alleine führte zu keiner ausgeprägten Druckänderung (**Abbildung 3.3**).

Eine den Wildtyp-Tieren vergleichbare Reaktion nach intraarterieller SNP-Applikation fand sich auch in eNOS-defizienten Tieren ($n = 6$) (**Abbildung 3.2 und 3.3**). Der arterielle Mitteldruck fiel nach 0,05 nmol SNP von 137 ± 5 auf einen Minimalwert von

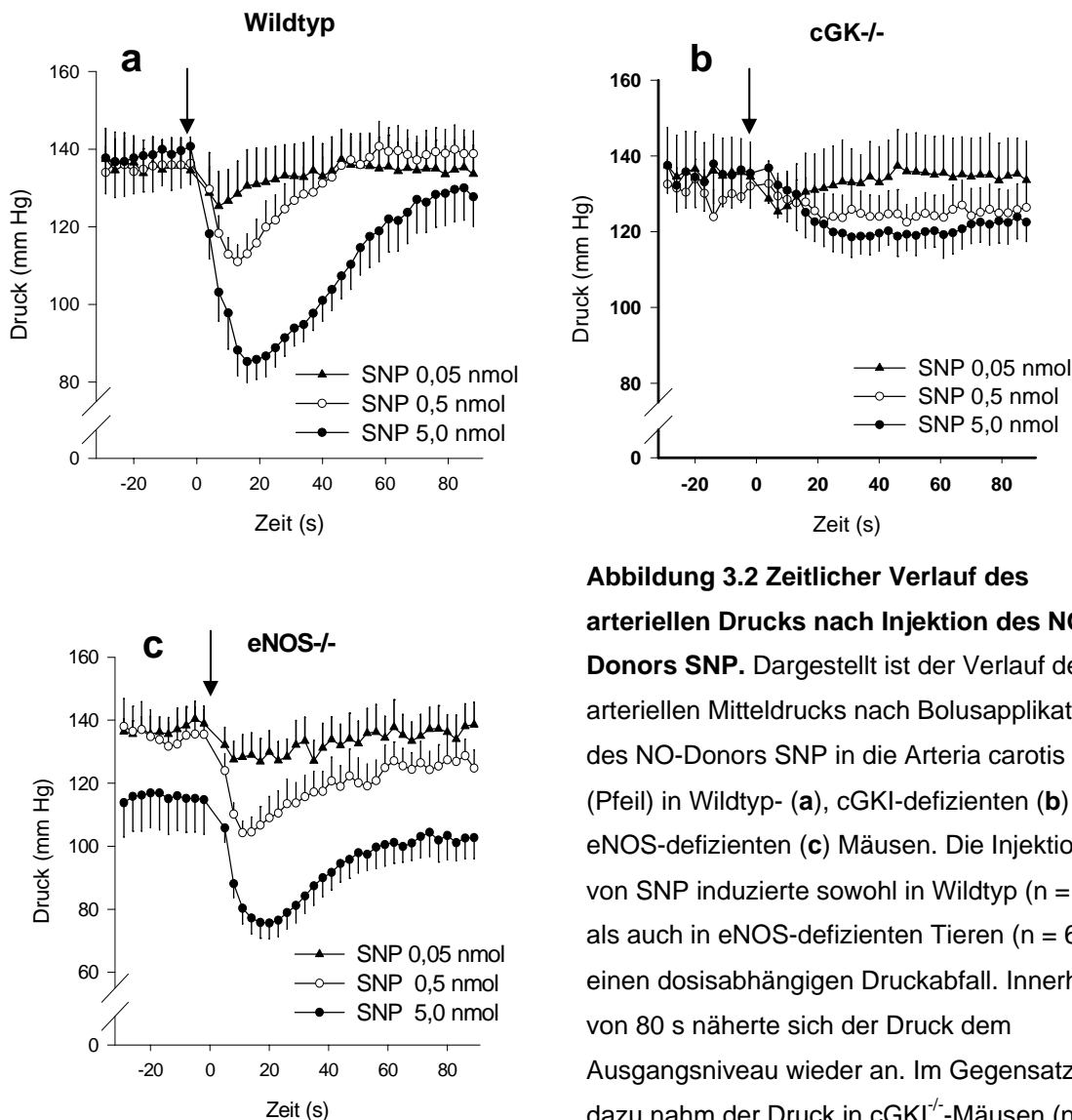


Abbildung 3.2 Zeitlicher Verlauf des arteriellen Drucks nach Injektion des NO-Donors SNP. Dargestellt ist der Verlauf des arteriellen Mitteldrucks nach Bolusapplikation des NO-Donors SNP in die Arteria carotis (Pfeil) in Wildtyp- (a), cGKI-defizienten (b) und eNOS-defizienten (c) Mäusen. Die Injektion von SNP induzierte sowohl in Wildtyp ($n = 8$) als auch in eNOS-defizienten Tieren ($n = 6$) einen dosisabhängigen Druckabfall. Innerhalb von 80 s näherte sich der Druck dem Ausgangsniveau wieder an. Im Gegensatz dazu nahm der Druck in cGKI^{-/-}-Mäusen ($n = 4$) nur bei der höchsten Dosis leicht ab.

128 ± 6 mmHg, nach 0,5 nmol auf 103 ± 5 mmHg und nach 5,0 nmol auf 76 ± 5 mmHg. Dabei erreichte der Druck das Minimum nach 12 ± 3 (0,05 nmol), 17 ± 5 (0,5 nmol) und 20 ± 2 Sekunden (5,0 nmol). Das Zeitintervall des Druckabfalls war tendenziell verlängert, ohne sich jedoch von Wildtyp-Tieren signifikant zu unterscheiden (0,05 nmol: 53 ± 2 s; 0,5 nmol: 75 ± 15 s; 5,0 nmol: keine Rückkehr auf Ausgangsniveau während 90 s).

Im Gegensatz dazu fiel der arterielle Druck in cGKI-defizienten Tieren ($n = 4$) bei der Applikation von 0,05 nmol SNP nicht ab (von 132 ± 10 auf 130 ± 10 mmHg). Höhere Dosierungen induzierten arterielle Drucksenkungen. So fiel der Druck nach 0,5 nmol SNP von 131 ± 6 auf 125 ± 7 mmHg ($p < 0,05$) und bei 5,0 nmol SNP auf 118 ± 6 mmHg ($p < 0,05$). Diese Drucksenkungen waren im Vergleich signifikant geringer

(**Abbildung 3.3**) als in Wildtyptieren und traten verzögert auf (0,5 nmol: 21 ± 0 s ; 5,0 nmol: 31 ± 3 s, $p < 0,05$ vs WT). **Abbildung 3.2** zeigt den zeitlichen Verlauf und **Abbildung 3.3** den Vergleich mit Wildtyp- und eNOS-defizienten Tieren.

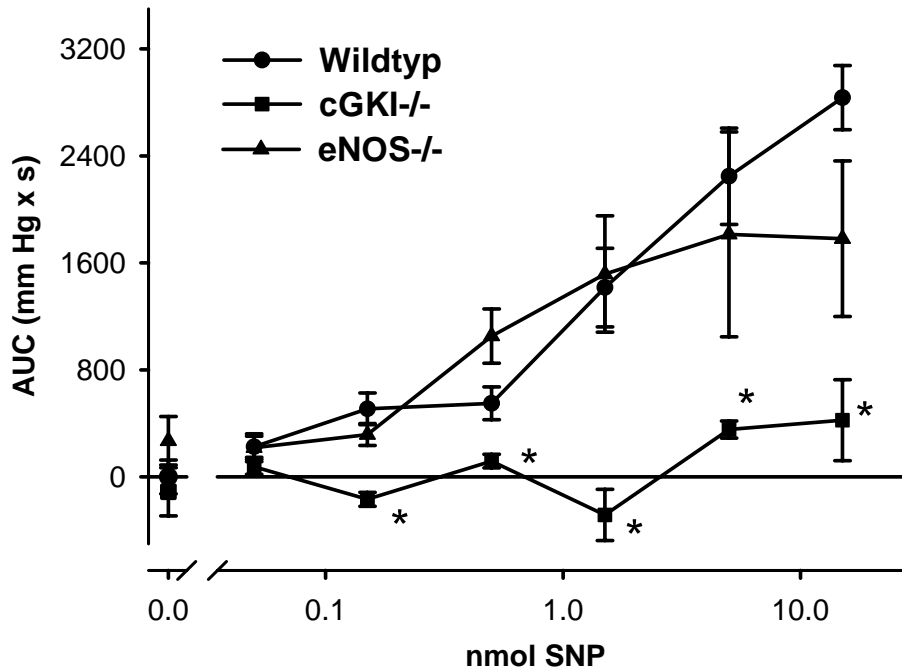


Abbildung 3.3 Arterieller Druckabfall nach Injektion von SNP. Dargestellt ist die Fläche unter der Kurve (Area under the curve, AUC), die berechnet wurde aus dem Druckabfall über die Zeit. Injektion des Lösungsmittels (NaCl-Lösung, 0,0 nmol SNP) führte zu keinem Druckabfall. Ansteigende Dosierungen von SNP führten zu einer dosisabhängigen Zunahme der AUC in WT und eNOS^{-/-}-Tieren. In cGKI^{-/-}-Tieren war dieser Druckabfall nicht vorhanden oder signifikant abgeschwächt. Erst bei 3 nmol SNP war ein Druckabfall zu beobachten.

* : $p < 0,05$ vs wt. WT n=8 Tiere ; cGKI^{-/-} n=4 Tiere, eNOS^{-/-} n=6 Tiere

3.2.2 Wirkung von NO auf arterioläre Durchmesser

Die Bestimmung des mittleren arteriellen Drucks lässt nur einen indirekten Schluß auf das Verhalten der Widerstandsgefäße zu. Daher sollte die vasodilatierende Wirkung von NO in Widerstandsgefäßen in der Mikrozirkulation mittels Intravitalmikroskopie direkt beobachtet werden. Dazu wurden NO-Donoren lokal auf die Mikrozirkulation appliziert. In Arteriolen (n = 42 in drei Tieren) der Wildtyptiere erzeugte SNP eine deutliche Dilatation, die in ihrer Ausprägung konzentrationsabhängig war. So erweiterten sich die Gefäße schon bei der niedrigsten verwendeten Konzentration (0,1 $\mu\text{mol/L}$ SNP: von 13 ± 2 μm auf 18 ± 2 μm , $p < 0,05$) und bei der höchsten verwendeten Konzentration sehr deutlich (10

$\mu\text{mol SNP}$: von $12 \pm 2 \mu\text{m}$ auf $25 \pm 2 \mu\text{m}$). Die maximale Dilatation (E_{Max}) auf SNP betrug $69 \pm 3 \%$ der Dilatationskapazität, und die SNP-Konzentration, die eine halbmaximale Wirkung aufwies (EC_{50}) $0,11 \pm 0,03 \mu\text{mol/L}$. Der maximale Durchmesser der untersuchten Arteriolen war $31 \pm 3 \mu\text{m}$ (**Abbildung 3.4**). Im Gegensatz zu dieser deutlichen dilatativen Antwort war die Reaktion der Gefäße in $\text{cGKI}^{-/-}$ -Tieren ($n = 67$ in fünf Tieren) stark abgeschwächt. Bei $0,1$ und $0,3 \mu\text{mol/L}$ war keine signifikante Erweiterung zu beobachten (jeweils vor SNP: $12 \pm 2 \mu\text{m}$; während SNP: $12 \pm 2 \mu\text{m}$). Erst die Superfusion von $1 \mu\text{mol/L}$ SNP erweiterte die Gefäße von $10 \pm 2 \mu\text{m}$ auf $12 \pm 2 \mu\text{m}$ ($p < 0,05$), und $10 \mu\text{mol/L}$ SNP dilatierte die Arteriolen von $10 \pm 2 \mu\text{m}$ auf $14 \pm 1 \mu\text{m}$ ($p < 0,05$). Die maximale Dilatation (E_{Max}) auf SNP war signifikant reduziert ($23 \pm 5 \%$, $p < 0,05$ vs WT) und die ED_{50} auf $1,6 \pm 0,1 \mu\text{mol/L}$ erhöht ($p < 0,05$ vs WT). Der maximale Gefäßdurchmesser der untersuchten Gefäße betrug $27 \pm 2 \mu\text{m}$ (**Abbildung 3.4**).

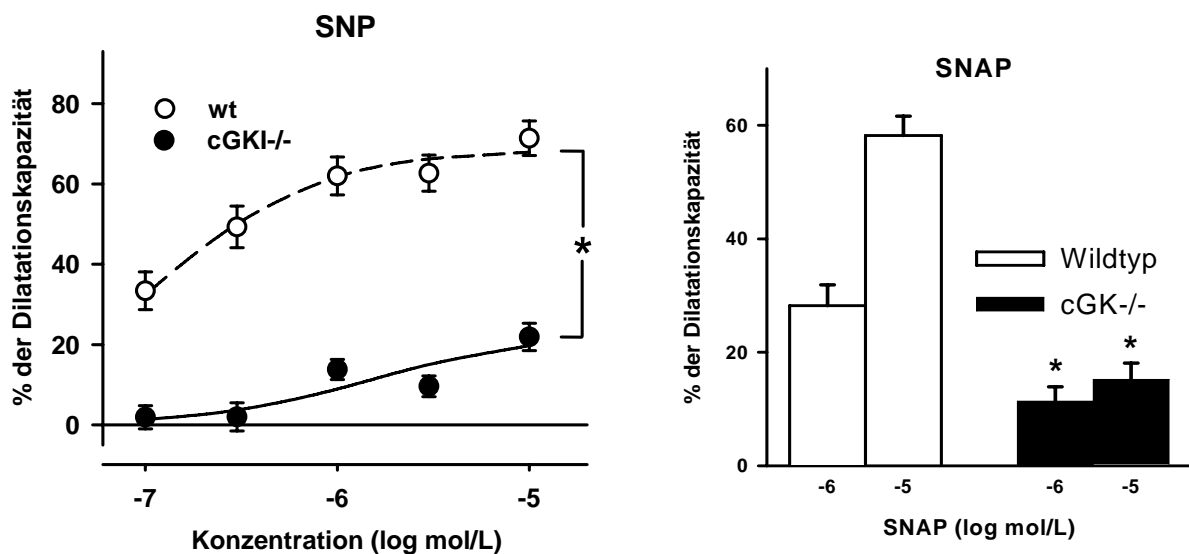


Abbildung 3.4 Dilatation auf NO-Donoren in Arteriolen in der Mikrozirkulation. Dargestellt ist die Dilatation der Arteriolen auf zwei chemisch verschiedene NO-Donoren in unterschiedlichen Konzentrationen als Dilatationskapazität (%). Links: Dargestellt sind die gemessenen Dilatationen (Kreise) sowie die berechnete Konzentrations-Wirkungs-Beziehung (Kurve). SNP ($0,1 \mu\text{mol/L}$ bis $10 \mu\text{mol/L}$) führt zu einer Erweiterung der Arteriolen in Wildtyp-Tieren mit einer E_{Max} von $69 \pm 3 \%$ (gestrichelte Kurve). Die Dilatationsantwort auf SNP ist in $\text{cGKI}^{-/-}$ -Tieren signifikant reduziert (E_{Max} $23 \pm 5 \%$, durchgezogene Kurve). Rechts: SNAP, ein weiterer NO-Donor, führte ebenso zu einer konzentrationsabhängigen Dilatation in Wildtyp-Tieren. Auch die SNAP-induzierte Dilatation war in $\text{cGKI}^{-/-}$ -Tieren signifikant reduziert.

* : $p < 0,05$ vs WT. Wildtyp $n=42$; $\text{cGKI}^{-/-}$ $n = 67$.

Dieser Befund sollte durch einen weiteren, strukturell unterschiedlichen NO-Donor (S-Nitroso-N-Acetyl-D/L-Penicillamin, SNAP) verifiziert werden. Die Relaxation der Arteriolen in Wildtyptieren war auch hier deutlich ($1 \mu\text{mol/L}$: von 10 ± 2 auf $18 \pm 3 \mu\text{m}$; $10 \mu\text{mol/L}$: von $13 \pm 2 \mu\text{m}$ auf $23 \pm 2 \mu\text{m}$). Auch in cGKI-defizienten Mäusen waren signifikante Dilatationen nach der Superfusion von SNAP zu beobachten ($1 \mu\text{mol/L}$: von 11 ± 1 auf $13 \pm 1 \mu\text{m}$; $10 \mu\text{mol/L}$: von 10 ± 1 auf $13 \pm 1 \mu\text{m}$), die aber deutlich abgeschwächt gegenüber den Wildtyptieren waren (**Abbildung 3.4**).

3.3 Effekt des endothelabhängigen Dilatators Acetylcholin

Es sollte untersucht werden, inwieweit der NO/cGMP Signalweg in Widerstandsgefäßen zur endothelvermittelten Vasodilatation beiträgt. Hierzu wurde wiederum einerseits der arterielle Druck gemessen, andererseits wurden intravitalmikroskopische Experimente durchgeführt. Zur Stimulation des Endothels wurde Acetylcholin verwendet.

3.3.1 Wirkung von ACh auf den arteriellen Druck

Die intraarterielle Bolusapplikation von Acetylcholin (0,5 nmol, 1,5 nmol, 5,0 nmol) führte in Wildtyptieren zu einer Senkung des arteriellen Drucks. Die Drucksenkung war dabei dosisabhängig und transient. So fiel der Druck bei ACh 0,5 nmol in 8 ± 1 Sekunden von 124 ± 9 auf 82 ± 6 mmHg ($p < 0,05$). Bei ACh 1,5 nmol erreichte der arterielle Mitteldruck in 10 ± 1 Sekunden ein Minimum von 71 ± 4 mmHg ausgehend von 136 ± 8 mmHg ($p < 0,05$) und bei ACh 5,0 nmol fiel er innerhalb von 9 ± 1 Sekunden von 115 ± 4 auf 54 ± 5 mmHg ($p < 0,05$). Hierbei war die Dauer des Druckabfalls nicht dosisabhängig (0,5 nmol: 42 ± 4 s; 1,5 nmol: 77 ± 10 s; 5,0 nmol: 61 ± 10 s). Der zeitliche Verlauf ist in **Abbildung 3.5** dargestellt.

Auch in eNOS-defizienten Tieren ($n = 6$) führte Acetylcholin zu Reduktionen des arteriellen Mitteldrucks (**Abbildung 3.5**), die sich in ihrer Ausprägung nicht signifikant von denen der Wildtyptiere unterschieden. Bei ACh 0,5 nmol erreichte der mittlere arterielle Druck in 10 ± 1 Sekunden ($p = 0,38$ vs WT) ein Minimum von 96 ± 5 mmHg ($p=0,08$ vs wt) bei einem Ausgangswert von 118 ± 9 mmHg vor der Injektion. Bei 1,5 nmol ACh fiel der Druck in 11 ± 1 Sekunden von 119 ± 9 auf 76 ± 7 mmHg ($p=0,10$ vs wt) und bei 5,0 nmol in 11 ± 1 Sekunden von 113 ± 8 auf 75 ± 9 mmHg ($p=0,07$ vs

WT). Die Dauer des Druckabfalls betrug 28 ± 3 (0,5 nmol; $p < 0,05$ vs WT), 37 ± 6 (1,5 nmol; $p = 0,11$ vs WT) bzw. 34 ± 3 (5,0 nmol) Sekunden und war somit tendenziell und bei 0,5 nmol signifikant verkürzt.

Acetylcholin führte nach intraarterieller Injektion auch in $cGKI^{-/-}$ -Tieren ($n = 3$) zu einer Senkung des arteriellen Drucks (**Abbildung 3.5**). Bei 0,5 nmol fiel der Druck von 127 ± 7 auf 106 ± 4 mmHg ($p = 0,09$ vs WT) und bei 1,5 nmol von 122 ± 6 auf 80 ± 8 mmHg ($p = 0,16$ vs WT). Nach Injektion von 5,0 nmol ACh kam es zur Abnahme des Drucks von 138 ± 12 auf 71 ± 8 mmHg ($p = 0,07$ vs WT). Diese Druckminima wurden nach 8 – 10 Sekunden erreicht. Somit unterschied sich weder der Wirkungseintritt noch die Differenz zwischen Ausgangs- und minimalem Druck von Wildtyptieren. Die Dauer der Druckreduktion war weitgehend identisch (0,5 nmol: 36 ± 3 s, $p = 0,34$ vs WT; 5,0 nmol: 94 ± 4 s, $p = 0,35$ vs WT), lediglich bei der mittleren Dosis war diese Dauer etwas größer (1,5 nmol: 37 ± 10 s, $p < 0,05$ vs WT).

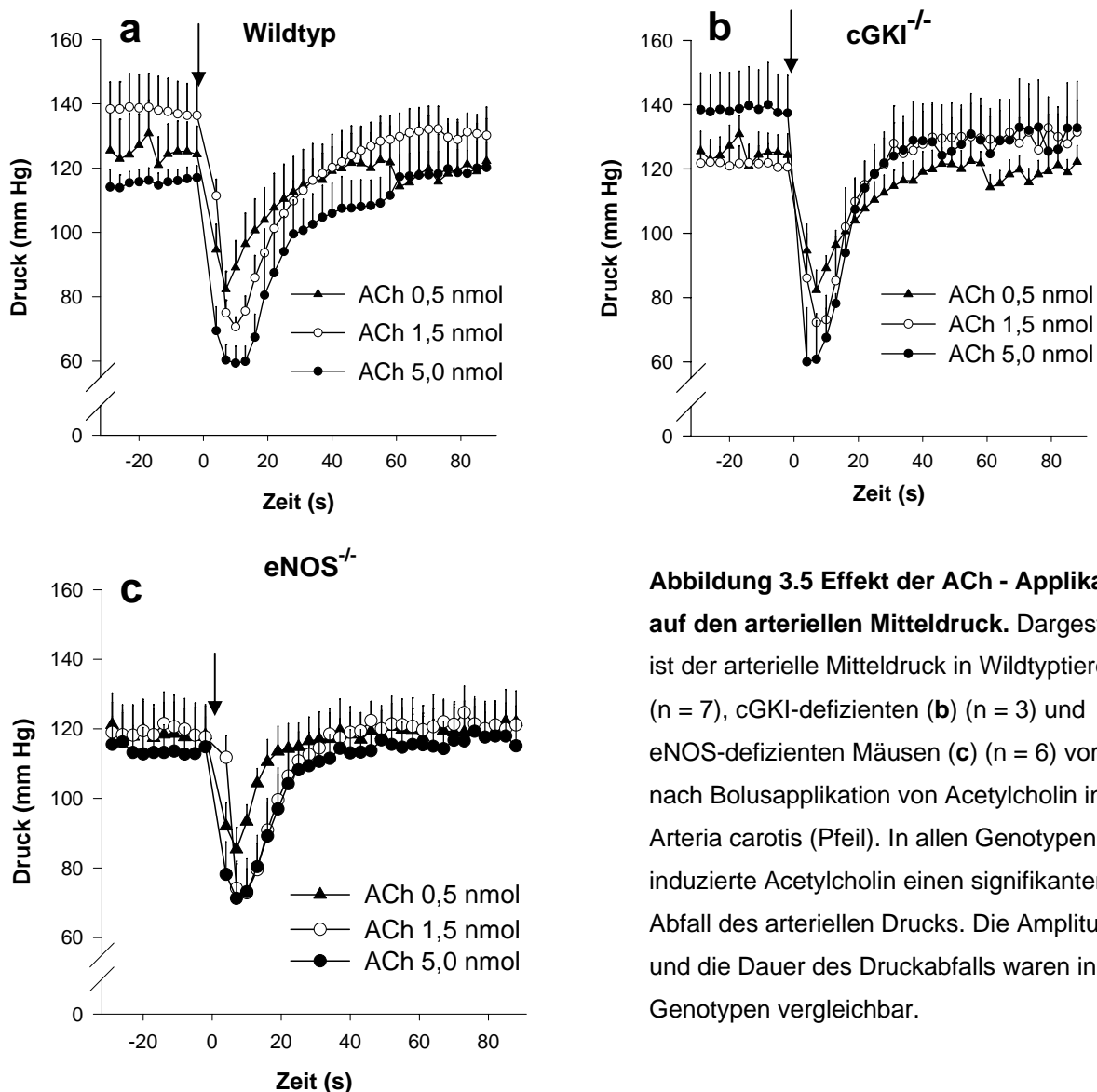


Abbildung 3.5 Effekt der ACh - Applikation auf den arteriellen Mitteldruck. Dargestellt ist der arterielle Mitteldruck in Wildtyptieren (a) ($n = 7$), $cGKI$ -defizienten (b) ($n = 3$) und $eNOS$ -defizienten Mäusen (c) ($n = 6$) vor und nach Bolusapplikation von Acetylcholin in die Arteria carotis (Pfeil). In allen Genotypen induzierte Acetylcholin einen signifikanten Abfall des arteriellen Drucks. Die Amplitude und die Dauer des Druckabfalls waren in den Genotypen vergleichbar.

3.3.2 Effekt von Acetylcholin auf arterioläre Durchmesser

Lokale Applikation von Acetylcholin-induzierte in Wildtyptieren eine signifikante konzentrationsabhängige Dilatation. Schon bei 0,1 $\mu\text{mol/L}$ Acetylcholin war eine signifikante Dilatation zu beobachten, die mit steigender Konzentration weiter zunahm. Die absoluten Durchmesser sind in **Tabelle 3.1** dargestellt. Die maximale Dilatation (E_{Max}) betrug $81 \pm 3 \%$ und die EC_{50} $0,35 \pm 0,06 \mu\text{mol/L}$ (**Abbildung 3.6**). Auch in cGKI-defizienten Tieren führte die Superfusion von Acetylcholin zu einer konzentrationsabhängigen Dilatation, die mit einer E_{Max} von $82 \pm 3 \%$ nicht verschieden war von ihren Wildtypwurfgeschwistern. Lediglich die EC_{50} war geringfügig aber signifikant nach rechts verschoben ($0,69 \pm 0,10 \mu\text{mol/L}$, **Abbildung 3.6**). In **Tabelle 3.1** sind die absoluten Durchmesser verzeichnet.

Genotyp	$\mu\text{mol/L}$	n	vor	während	Dia_{Max}	p
Wildtyp	0,1	77	13 ± 1	15 ± 2	28 ± 2	< 0,05
	0,3	77	13 ± 2	19 ± 2		< 0,05
	1,0	77	12 ± 2	22 ± 1		< 0,05
	3,0	77	13 ± 2	24 ± 1		< 0,05
	10,0	77	13 ± 2	25 ± 2		< 0,05
cGKI -/-	0,1	67	10 ± 1	13 ± 1	26 ± 1	< 0,05
	0,3	67	10 ± 1	15 ± 1		< 0,05
	1,0	67	11 ± 1	19 ± 1		< 0,05
	3,0	67	11 ± 1	22 ± 1		< 0,05
	10,0	67	11 ± 2	23 ± 1		< 0,05

Tabelle 3.1 Absolute Durchmesser in μm vor und während Acetylcholin in WT und cGKI-defizienten Tieren. n: Anzahl der Arteriolen, Dia_{Max} : maximaler Gefäßdurchmesser, p: Signifikanzniveau beim Vergleich vor und während Behandlung (gepaarter t-Test)

Auch in eNOS-defizienten Tieren führte ACh zu einer konzentrationsabhängigen Dilatation, die bei 0,1 $\mu\text{mol/L}$ begann. Die absoluten Durchmesser sind der **Tabelle 3.4** zu entnehmen. Die maximale Dilatation (E_{Max} $74 \pm 4 \%$) unterschied sich nicht signifikant von der in Wildtyptieren errechneten (**Abbildung 3.6**). Die EC_{50} war mit $0,50 \pm 0,10 \mu\text{mol/L}$ im Vergleich zu Wildtyptieren nicht signifikant verändert.

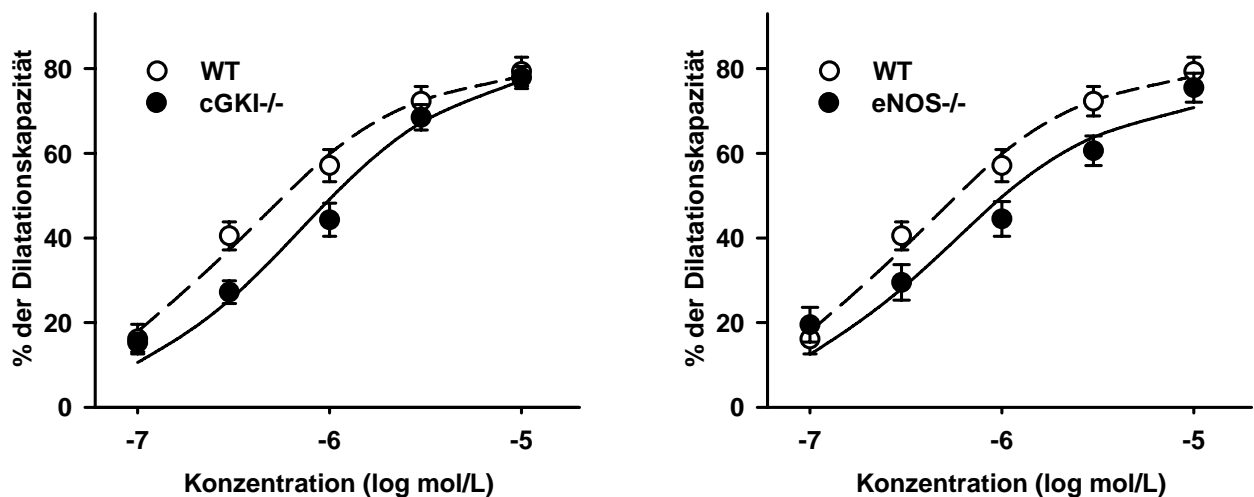


Abbildung 3.6 Vergleich der Acetylcholin-induzierten Vasodilatation in eNOS- und cGKI-defizienten Tieren. Dargestellt ist die Dilatation auf ACh als Prozent der Dilatationskapazität und die berechnete Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Sowohl in cGKI^{-/-}-Tieren (**links**) als auch in eNOS^{-/-}-Tieren (**rechts**) war die maximale Dilatation nicht verschieden von der Wildtypkontrolle (gestrichelte Kurve).

WT: n = 77 in 6 Tieren; eNOS^{-/-}: n = 78 in 6 Tieren; cGKI^{-/-}: n = 109 in 8 Tieren.

3.3.3 Effekt der Prostaglandinsynthesehemmung auf die ACh-induzierte Dilatation

Um zu untersuchen welche Mediatoren die Dilatation nach Acetylcholin vermitteln, wurde zunächst die Zyklooxygenase blockiert und so die endotheliale Prostaglandinbildung unterdrückt. In dieser Serie wurden drei Wildtypmäuse (n = 35), drei cGKI^{-/-} (n = 42) sowie sechs eNOS-defiziente Tiere (n = 78) untersucht. Der Ruhedurchmesser der Arteriolen in den Genotypen dieser Versuchsreihe unterschied in sich unbehandeltem Zustand nicht (WT 14,1 ± 2,0 µm; cGKI^{-/-} 12,6 ± 2,0 µm; eNOS^{-/-} 11,9 ± 1,2 µm, p = 0,2 vs WT). Auch der Tonus der Gefäße war zwischen den Genotypen nicht verschieden.

Die Applikation von Indometacin (3 µmol/L) für 30 Minuten führte in eNOS-defizienten Tieren (n = 78 in 6 Tieren) zu einer signifikanten Reduktion des Durchmessers von 12 ± 1 auf 10 ± 1 µm (p < 0,05). In Wildtyp- (n = 35 in drei Tieren) und cGKI-defizienten Mäusen (n = 42 in drei Tieren) änderte sich der Ruhedurchmesser nicht signifikant (WT von 14 ± 2 auf 15 ± 2 µm; cGKI^{-/-} von 11 ± 2

auf $11 \pm 1 \mu\text{m}$). Aufgrund der geringen Beobachtungszahl ist jedoch keine definitive Aussage möglich.

Die Superfusion von Acetylcholin führte auch in dieser Untergruppe von Wildtyptieren zu einer konzentrationsabhängigen Dilatation mit einer E_{Max} von $72 \pm 4 \%$ und einer EC_{50} von $0,90 \pm 0,05 \mu\text{mol/L}$. Nach Applikation von Indometacin blieb die E_{Max} mit $79 \pm 5\%$ unverändert. Die EC_{50} war auf $0,47 \pm 0,13 \mu\text{mol/L}$ signifikant vermindert ($p < 0,05$ vs Kontrolle, **Abbildung 3.7**). Die absoluten Durchmesserwerte sind in **Tabelle 3.2** dargestellt. Auch in cGKI-defizienten Tieren war in dieser Untergruppe eine konzentrationsabhängige Dilatation zu beobachten, die durch Indometacin nicht verändert wurde (Kontrolle: E_{Max} $61 \pm 4 \%$, EC_{50} $0,28 \pm 0,07 \mu\text{mol/L}$; Indo: E_{Max} $57 \pm 4 \%$, EC_{50} $0,15 \pm 0,05 \mu\text{mol/L}$; **Tabelle 3.3**). Die **Abbildung 3.7** zeigt die komplette Konzentrations-Wirkungs-Kurve. In eNOS-defizienten Tieren schwächte die Prostaglandinsynthesehemmung die Dilatation signifikant ab; so war die maximale Dilatation (E_{Max}) von 74 ± 4 auf $55 \pm 3 \%$ ohne Änderung der EC_{50} ($0,50 \pm 0,10$ vs $0,41 \pm 0,10 \mu\text{mol/L}$) reduziert (**Tabelle 3.4**). Dennoch läßt sich eine deutliche konzentrationsabhängige Dilatationen nach Hemmung der Zyklooxygenase erkennen (**Abbildung 3.7**).

Versuch	$\mu\text{mol/L}$	n	vor	während	Dia_{Max}	p
Kontrolle	0,1	35	12 ± 2	16 ± 2		$< 0,05$
	0,3	35	15 ± 2	18 ± 2		$< 0,05$
	1,0	35	13 ± 2	21 ± 1	26 ± 2	$< 0,05$
	3,0	35	13 ± 2	22 ± 1		$< 0,05$
	10,0	35	14 ± 2	24 ± 2		$< 0,05$
Indo	0,1	35	17 ± 2	17 ± 1		0,80
	0,3	35	14 ± 2	17 ± 2		$< 0,05$
	1,0	35	14 ± 1	22 ± 2	26 ± 2	$< 0,05$
	3,0	35	14 ± 2	23 ± 2		$< 0,05$
	10,0	35	14 ± 2	23 ± 2		$< 0,05$

Tabelle 3.2 Absolute Durchmesser in μm vor und während Acetylcholin in Wildtyptieren unter Kontrollbedingungen und nach Indometacin

n: Anzahl der Arteriolen, Dia_{Max} : maximaler Gefäßdurchmesser, p: Signifikanzniveau beim Vergleich vor und während Behandlung (gepaarter t-Test)

Versuch	$\mu\text{mol/L}$	n	vor	während	Dia _{Max}	p
Kontrolle	0,1	42	11 ± 2	13 ± 2	24 ± 2	< 0,05
	0,3	42	10 ± 2	15 ± 2		< 0,05
	1,0	42	12 ± 2	17 ± 1		< 0,05
	3,0	42	12 ± 2	19 ± 1		< 0,05
	10,0	42	11 ± 2	20 ± 1		< 0,05
Indo	0,1	42	10 ± 1	15 ± 2	24 ± 2	< 0,05
	0,3	42	12 ± 2	16 ± 2		< 0,05
	1,0	42	11 ± 2	18 ± 2		< 0,05
	3,0	42	12 ± 2	20 ± 2		< 0,05
	10,0	42	10 ± 2	19 ± 2		< 0,05

Tabelle 3.3 Absolute Durchmesser in μm vor und während Acetylcholin in cGKI-defizienten Tieren unter Kontrollbedingungen und nach Indometacin

n: Anzahl der Arteriolen, Dia_{Max}: maximaler Gefäßdurchmesser, p: Signifikanzniveau beim Vergleich vor und während Behandlung (gepaarter t-Test)

Versuch	$\mu\text{mol/L}$	n	vor	während	Dia _{Max}	p
Kontrolle	0,1	78	11 ± 1	15 ± 1	26 ± 1	< 0,05
	0,3	78	14 ± 1	18 ± 1		< 0,05
	1,0	78	13 ± 1	20 ± 1		< 0,05
	3,0	78	14 ± 1	22 ± 1		< 0,05
	10,0	78	12 ± 1	23 ± 1		< 0,05
Indometacin	0,1	78	10 ± 1	14 ± 1	26 ± 1	< 0,05
	0,3	78	10 ± 1	14 ± 1		< 0,05
	1,0	78	10 ± 1	18 ± 1		< 0,05
	3,0	78	11 ± 1	18 ± 1		< 0,05
	10,0	78	10 ± 1	20 ± 1		< 0,05

Tabelle 3.4 Absolute Durchmesser in μm vor und während Acetylcholin in eNOS-defizienten Tieren unter Kontrollbedingungen und nach Indometacin

n: Anzahl der Arteriolen, Dia_{Max}: maximaler Gefäßdurchmesser, p: Signifikanzniveau beim Vergleich vor und während Behandlung (gepaarter t-Test)

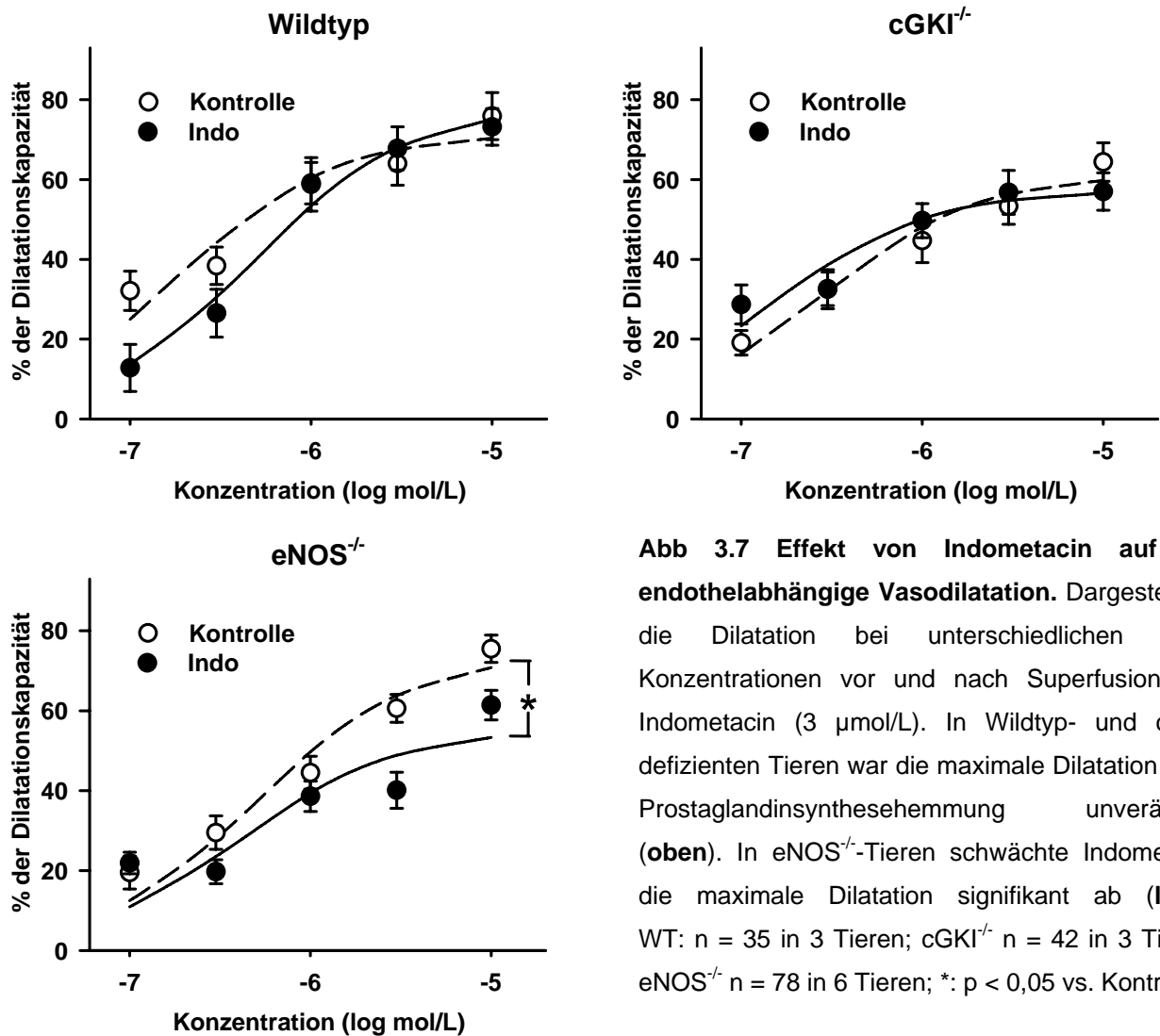


Abb 3.7 Effekt von Indometacin auf die endothelabhängige Vasodilatation. Dargestellt ist die Dilatation bei unterschiedlichen ACh-Konzentrationen vor und nach Superfusion von Indometacin (3 $\mu\text{mol/L}$). In Wildtyp- und cGKI-defizienten Tieren war die maximale Dilatation nach Prostaglandinsynthesehemmung unverändert (**oben**). In eNOS^{-/-}-Tieren schwächte Indometacin die maximale Dilatation signifikant ab (**links**) WT: n = 35 in 3 Tieren; cGKI^{-/-} n = 42 in 3 Tieren; eNOS^{-/-} n = 78 in 6 Tieren; *: p < 0,05 vs. Kontrolle

3.4 Hemmung der Cytochrom-P450-Monooxygenase

Wie **Abbildung 3.7** zeigt, waren in Abwesenheit von Prostaglandinen und NO noch deutliche Dilatationen nach Stimulation mit Acetylcholin zu beobachten. Diese Beobachtung legt nahe, dass mindestens noch ein weiterer Dilatator vom Endothel freigesetzt wird.

In dieser Serie sollte untersucht werden, ob die Cytochrom-P450-Monooxygenase beteiligt ist. Es wurden zwei Hemmstoffe dieses Enzyms, Sulfaphenazol (20 $\mu\text{mol/L}$) und 17-Octadecynolsäure (17-ODYA, 100 $\mu\text{mol/L}$), in eNOS-defizienten Tieren untersucht. Diese Versuchsserien wurden in Anwesenheit von Indometacin durchgeführt.

Zunächst wurden Kontrolldilataationen nach Inhibition der Prostaglandinsynthese erhoben. In Anwesenheit von Indometacin löste Acetylcholin wie auch zuvor beobachtet eine konzentrationsabhängige Dilatation mit einer E_{Max} von $82 \pm 4 \%$ und einer EC_{50} $0,59 \pm 0,10 \mu\text{mol/L}$ aus. Diese Dilatationskapazität war auch durch die Anwesenheit des Inhibitors Sulfaphenazol (Sulfa $20 \mu\text{mol/L}$, $n = 52$ in fünf Tieren) nicht verändert. Die E_{Max} betrug $79 \pm 4 \%$ und die EC_{50} $0,52 \pm 0,12 \mu\text{mol/L}$ (**Abbildung 3.8**).

17-Octadecynolsäure (ODYA 10 mmol/L), ein weiterer Hemmstoff der Cytochrom-P450-Monooxygenase, der sich sowohl in Wirkort als auch in seiner chemischen Struktur von Sulfaphenazol unterscheidet, wurde in 44 Arteriolen von vier Tieren untersucht. Nach ODYA war die maximale Dilatation auf Acetylcholin ebenfalls nicht verschieden von der Kontrolle (E_{Max} 83 ± 4 vs $90 \pm 5 \%$, $p = 0,31$). Lediglich die EC_{50} erhöhte sich geringfügig von $0,67 \pm 0,13$ auf $1,23 \pm 0,22 \mu\text{mol/L}$ ($p < 0,05$; **Abbildung 3.8**). Die absoluten Durchmesser sind in Tabelle 3.5 und 3.6 dargestellt

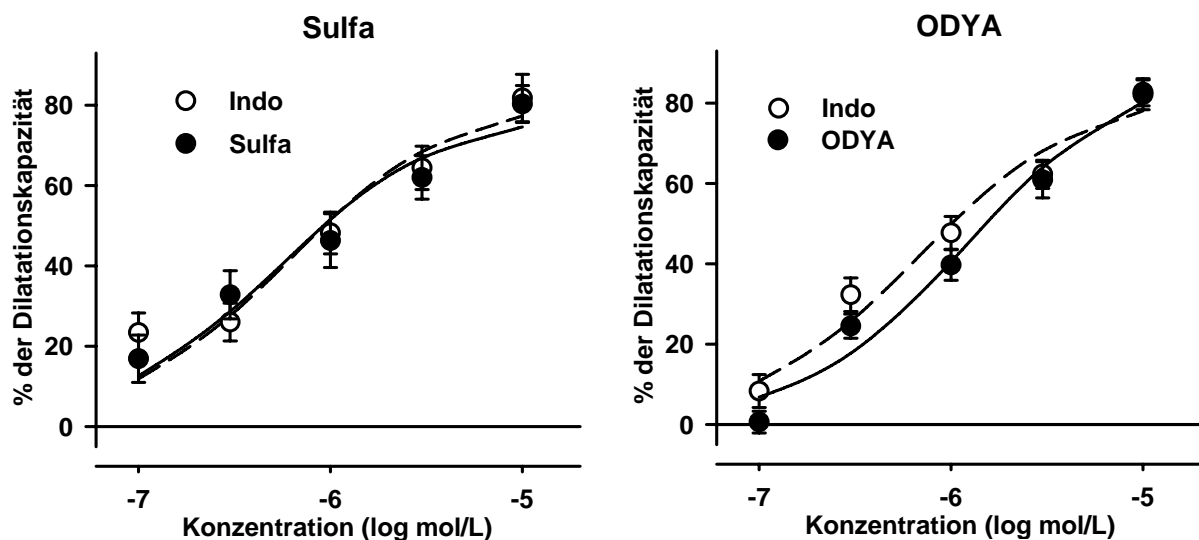


Abbildung 3.8 Effekt der Hemmung der Cytochrom-P450-Monooxygenase auf die Dilatation nach Endothelstimulation mit Acetylcholin in $eNOS^{-/-}$ -Mäusen

Dargestellt sind die Dilatation als % der maximalen Durchmesseränderung bei unterschiedlichen ACh-Konzentrationen und die berechnete Konzentrations-Wirkungs-Beziehung in Anwesenheit von Indometacin sowie der CYP-P450-Inhibitoren Sulfaphenazol und 17-ODYA. Weder Sulfaphenazol (**links**) noch ODYA (**rechts**) reduzierten die maximale Dilatation auf Acetylcholin in $eNOS$ -defizienten Tieren. Sulfa $n = 52$ in fünf und ODYA $n = 44$ Arteriolen in vier Tieren

Versuch	$\mu\text{mol/L}$	n	vor	während	Dia _{Max}	p
Indo	0,1	52	9 ± 1	14 ± 1	31 ± 1	< 0,05
	0,3	52	10 ± 1	17 ± 1		< 0,05
	1,0	52	9 ± 1	20 ± 1		< 0,05
	3,0	52	10 ± 1	24 ± 1		< 0,05
	10,0	52	11 ± 1	27 ± 1		< 0,05
Indo + Sulfaphenazol	0,1	52	12 ± 1	16 ± 1	31 ± 1	< 0,05
	0,3	52	10 ± 1	18 ± 1		< 0,05
	1,0	52	10 ± 1	20 ± 1		< 0,05
	3,0	52	11 ± 1	24 ± 1		< 0,05
	10,0	52	12 ± 1	27 ± 1		< 0,05

Tabelle 3.5 Absolute Durchmesser in μm vor und während Acetylcholin in eNOS-defizienten Tieren unter Indometacin und nach Sulfaphenazol

n: Anzahl der Arteriolen, Dia_{Max}: maximaler Gefäßdurchmesser, p: Signifikanzniveau beim Vergleich vor und während Behandlung (gepaarter t-Test)

Versuch	$\mu\text{mol/L}$	n	vor	während	Dia _{Max}	p
Indo	0,1	44	8 ± 1	10 ± 1	26 ± 1	< 0,05
	0,3	44	6 ± 1	13 ± 1		< 0,05
	1,0	44	6 ± 1	16 ± 1		< 0,05
	3,0	44	7 ± 1	19 ± 1		< 0,05
	10,0	44	7 ± 1	23 ± 1		< 0,05
ODYA	0,1	44	9 ± 1	10 ± 1	26 ± 1	0,13
	0,3	44	8 ± 1	13 ± 1		< 0,05
	1,0	44	8 ± 1	15 ± 1		< 0,05
	3,0	44	8 ± 1	19 ± 1		< 0,05
	10,0	44	7 ± 1	23 ± 1		< 0,05

Tabelle 3.6 Absolute Durchmesser in μm vor und während Acetylcholin in eNOS-defizienten Tieren unter Indometacin und nach ODYA

n: Anzahl der Arteriolen, Dia_{Max}: maximaler Gefäßdurchmesser, p: Signifikanzniveau beim Vergleich vor und während Behandlung (gepaarter t-Test)

3.5 Effekt der Hemmung von Ca²⁺-abhängigen Kalium-Kanälen

Ziel der nächsten Versuchsreihen war es zu untersuchen, ob die Acetylcholin-induzierte Dilatation sensibel auf die Blockade von Ca²⁺-abhängigen K⁺-Kanälen war. Es wurden K_{Ca} mit großer Leitfähigkeit (BK_{Ca}) durch Iberiotoxin und K_{Ca}-Kanäle mit kleiner Leitfähigkeit (SK_{Ca}) durch Apamin blockiert.

3.5.1 Effekt des BK_{Ca}-Blockers Iberiotoxin

Es wurden vier eNOS-defiziente (n = 41) und vier Wildtyptiere (n = 40) untersucht. Die Versuche wurden in Anwesenheit von Indometacin (3 µmol/L) durchgeführt. In Wildtyptieren wurde zusätzlich N^o-nitro-L-Arginin (30 µmol/L; L-NA) appliziert. Nach Messung von Kontrolldilataationen wurde einmalig Iberiotoxin (0,1 µmol/L) für 10 Minuten superfundiert und die Versuchsserie wiederholt.

Der Ruhetonus der Arteriolen in Wildtyptieren nach Inhibition der Prostaglandin- und NO-Synthese betrug $0,22 \pm 0,03$. Ein ähnlicher Tonus wurde in eNOS-defizienten Tieren beobachtet ($0,24 \pm 0,02$). Die Blockade des BK_{Ca}-Kanals mit Iberiotoxin führte in Wildtyptieren zu einer signifikanten Abnahme des Ruhedurchmessers (von 6 ± 1 µm auf 5 ± 1 µm, $p < 0,05$). In eNOS-defizienten Tieren war ebenfalls eine Konstriktion auf Iberiotoxin zu beobachten (von 8 ± 1 µm auf 5 ± 1 µm, $p < 0,05$).

Die Acetylcholin-induzierte Dilatation nach Hemmung der NO-Synthase und der Zyklooxygenase wurde in Wildtyptieren durch Iberiotoxin signifikant reduziert. Bei 1 µmol/L Acetylcholin war die Dilatation komplett aufgehoben und bei höheren Konzentrationen stark eingeschränkt. In ähnlicher Weise schwächte Iberiotoxin die Dilatation nach Acetylcholin in eNOS-defizienten Tieren, die mit Indometacin vorbehandelt waren, deutlich ab (**Abbildung 3.9**). Die Dilatation auf SNP (10 µmol/L) blieb durch Iberiotoxin unverändert (79 ± 3 vs 78 ± 3 %).

Um zu untersuchen, ob Iberiotoxin auch bei intakter NO-Bildung eine Hemmung ausübt, wurde in einer weiteren Versuchsserie Iberiotoxin ohne die Applikation des NO-Synthase-Inhibitors L-NA untersucht. Auch bei intakter endogener NO-Bildung wurde die Acetylcholin-induzierte Dilatation durch Iberiotoxin signifikant reduziert.

Wurde dann zusätzlich die NO-Synthese durch L-NA gehemmt, so hatte dies keinen weiteren inhibitorischen Effekt (**Abbildung 3.9**).

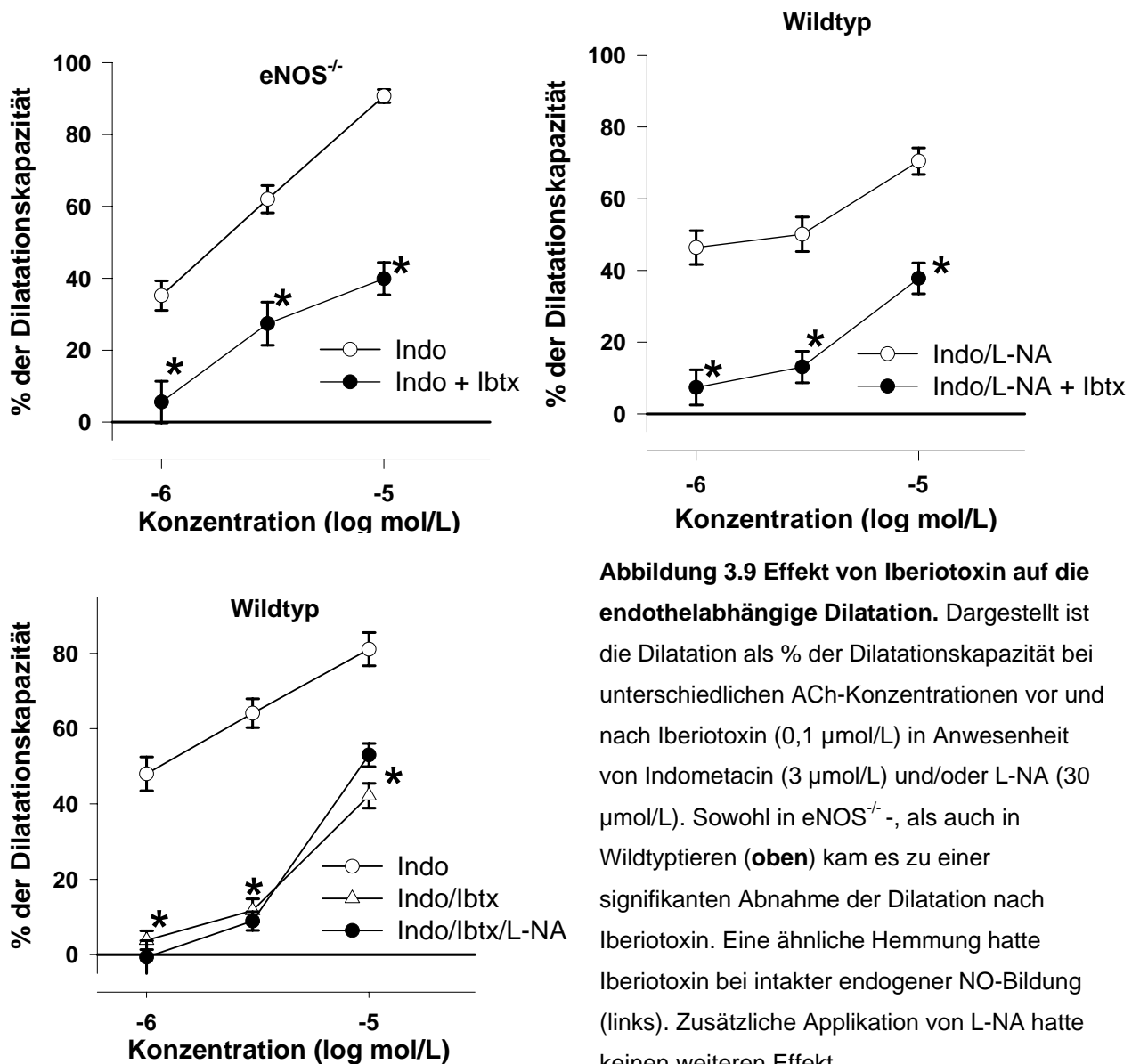


Abbildung 3.9 Effekt von Iberiotoxin auf die endothelabhängige Dilatation. Dargestellt ist die Dilatation als % der Dilatationskapazität bei unterschiedlichen ACh-Konzentrationen vor und nach Iberiotoxin ($0,1 \mu\text{mol/L}$) in Anwesenheit von Indometacin ($3 \mu\text{mol/L}$) und/oder L-NA ($30 \mu\text{mol/L}$). Sowohl in $eNOS^{-/-}$, als auch in Wildtyp-Tieren (**oben**) kam es zu einer signifikanten Abnahme der Dilatation nach Iberiotoxin. Eine ähnliche Hemmung hatte Iberiotoxin bei intakter endogener NO-Bildung (links). Zusätzliche Applikation von L-NA hatte keinen weiteren Effekt.

$eNOS^{-/-}$ $n = 41$ in vier Tieren; WT $n = 40$ bzw $n = 42$ in jeweils vier Tieren, * : $p < 0,05$ vs Kontrolle

3.5.2 Effekt des SK_{Ca} -Blockers Apamin

Neben dem BK_{Ca} -Kanal gibt es weitere Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle. In dieser Serie sollte der Einfluß des Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanals kleiner Leitfähigkeit (SK_{Ca}) untersucht werden. Hierzu wurde in vier Wildtyp-Tieren ($n = 41$) die Acetylcholin-Dilatation unter Kontrollbedingungen, nach Indometacin ($3 \mu\text{mol/L}$) und L-NA ($30 \mu\text{mol/L}$), sowie dann schrittweiser Applikation von Apamin ($0,1 \mu\text{mol/L}$) und Iberiotoxin ($0,1 \mu\text{mol/L}$) bestimmt.

Indometacin und L-NA bewirkten eine geringfügige, aber signifikante Abnahme der Dilatation auf Acetylcholin bei höheren Konzentrationen.

Nach Apamin-Applikation (0,1 $\mu\text{mol/L}$) kam es zwar weiterhin zu einer signifikanten Dilatation bei allen untersuchten Konzentrationen, diese waren aber im Vergleich zu Indometacin und L-NA deutlich reduziert. Wurde zusätzlich Iberiotoxin superfundiert, kam es zu einer weiteren Einschränkung der Dilatation auf Acetylcholin (**Abbildung 3.10**). Die verbleibende Dilatation unterschied sich nicht von derjenigen in Gefäßen, die nicht mit Apamin behandelt waren und in Abbildung 3.9 dargestellt sind. Die SNP-induzierte Dilatation (10 $\mu\text{mol/L}$) war weder nach Apamin ($84 \pm 2\%$) noch nach zusätzlicher Applikation von Iberiotoxin ($79 \pm 2\%$) im Vergleich zur Kontrolle ($79 \pm 3\%$) vermindert.

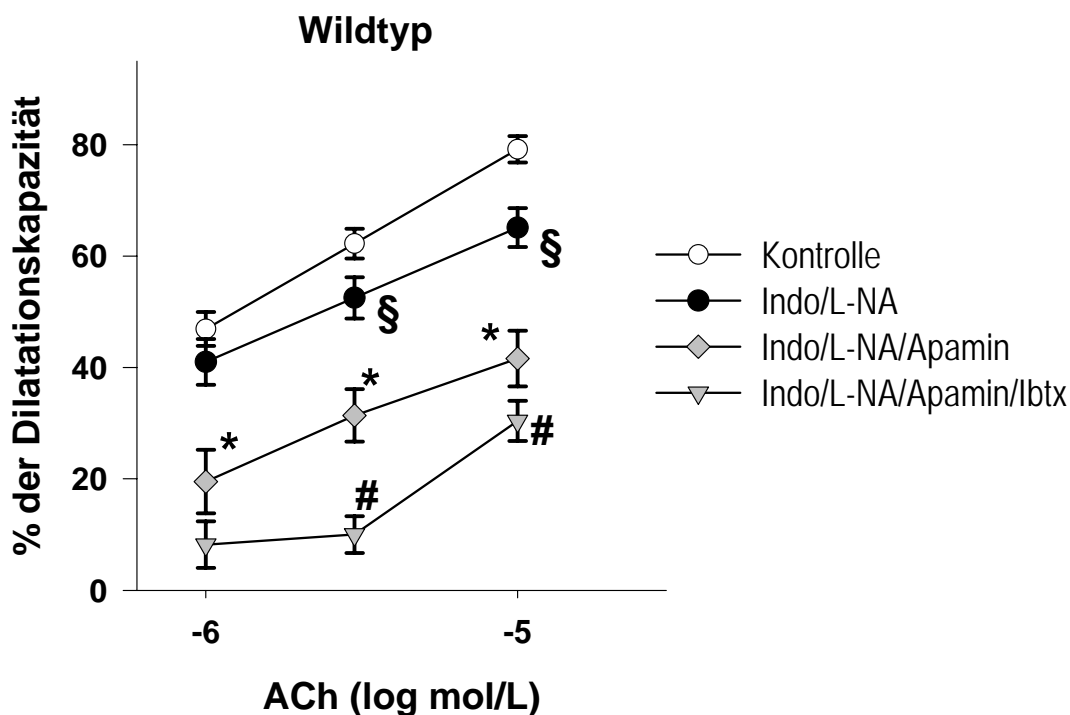


Abbildung 3.10 Effekt von Apamin und Iberiotoxin auf die endothelabhängige Dilatation

Dargestellt ist die Dilatation bei unterschiedlichen ACh-Konzentrationen in unbehandelten Präparationen, nach Indo (3 $\mu\text{mol/L}$) und L-NA (30 $\mu\text{mol/L}$), sowie schrittweisem Hinzufügen von Apamin (0,1 $\mu\text{mol/L}$) und Iberiotoxin (0,1 $\mu\text{mol/L}$) in Wildtyptieren. Indo/L-NA reduzierte die Dilatation nur wenig. Apamin hatte eine deutliche hemmende Wirkung. Iberiotoxin reduzierte die Dilatation weiter § = $p < 0,05$ vs Kontrolle; * = $p < 0,05$ vs. Indo/L-NA; # = $p < 0,05$ vs. Indo/L-NA/Apamin ; n = 41 in vier Tieren

4. Diskussion

4.1 Basale hämodynamische Parameter: Mittlerer arterieller Druck und Herzfrequenz

Die Messung des arteriellen Drucks ermöglicht die Beurteilung des peripheren Widerstandes und des Herzzeitvolumens. Beide Parameter gemeinsam determinieren den aktuellen Druck. Eine Änderung des einen Parameters, z.B. des peripheren Widerstandes, kann zu kompensatorischen Änderungen des anderen Parameters (Herzzeitvolumen) führen. Hierbei sind Regulationsmechanismen des autonomen Nervensystems beteiligt. Wird nun ebenfalls die Herzfrequenz gemessen, so bietet sie eine Information über den Aktivitätsgrad des autonomen Nervensystems am Herzen. Bleibt die Herzfrequenz unverändert, so ist wahrscheinlich die Kontraktionskraft des Herzens ebenfalls gleichgeblieben. Daher lassen Änderungen des arteriellen Drucks, die nicht mit einer Veränderung der Herzfrequenz vergesellschaftet sind, eine Alteration des peripheren Widerstands vermuten. Um eine exakte Aussage zu erhalten, müßte mit einem invasiveren Verfahren zusätzlich das Herzminutenvolumen gemessen werden. Dieses wurde in der aktuellen Arbeit nicht durchgeführt. Dieser Nachteil wird aber aufgewogen durch die Möglichkeit, den arteriellen Druck am wachen Tier zu messen. In der vorliegenden Arbeit erreichte der arterielle Druck nach Antagonisierung der Narkose in kurzer Zeit (weniger als 2 h) wieder ein Niveau, das auch nach längerer Beobachtungszeit (bis zu 6 h) konstant blieb, wie wir in Vorversuchen zeigen konnten.

Mattson konnte zeigen, dass der arterielle Mitteldruck zwischen unterschiedlichen Mausstämmen variieren kann (Mattson 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse mit unterschiedlichen genetischen Hintergrund zur Untersuchung herangezogen (eNOS^{-/-}: C57BL/6; WT und cGKI^{-/-}: 129Sv). Dieser Sachverhalt muß beim Vergleich der basalen hämodynamischen Parameter zwischen den verschiedenen Genotypen berücksichtigt werden.

Mäuse, die defizient für die endotheliale NO-Synthase waren, wiesen im Vergleich zu den Wildtyptieren eine arterielle Hypertonie auf (**Abbildung 3.1**). Dies wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen in der Vergangenheit beobachtet und war unabhängig

vom genetischen Hintergrund der eNOS^{-/-}-Tiere (Godecke *et al* 1998; Huang *et al* 1995; Shesely *et al* 1996). Die Ausprägung der arteriellen Hypertonie dieses Genotyps lässt sich allerdings in der vorliegenden Arbeit aufgrund des unterschiedlichen genetischen Hintergrunds der Vergleichstiere nicht exakt und damit nur in seiner Tendenz beurteilen. Vergleicht man Wildtyptiere mit eNOS-defizienten Mäusen in einem identischen genetischen Hintergrund (C57BL/6), so ist eine arterielle Hypertonie mit einer Erhöhung des mittleren Drucks von ca. 20 mmHg nachweisbar (unveröffentlichte Daten). Dies zeigt, dass die eNOS eine wesentliche Bedeutung für die Einstellung des arteriellen Drucks hat. Da die Herzfrequenz erniedrigt ist (**Abbildung 3.1**) (Godecke *et al* 1998; Stauss *et al* 1999), ist die Aktivität des sympathischen Nervensystem und damit das Herzzeitvolumen offensichtlich nicht gesteigert. Dies lässt vermuten, dass vorwiegend aus dem Endothel kontinuierlich Stickstoffmonoxid freigesetzt wird und zur Erniedrigung des peripheren Widerstands führt. Das Fehlen des vasodilatierenden Mediators im Vergleich zu genetisch unveränderten Tieren führt vermutlich zu einem erhöhten Tonus der Widerstandsgefäße. Allerdings gilt es zu bedenken, dass auch andere Isoenzyme der NO-Synthase vasoaktives NO freisetzen (Kurihara *et al* 1998) und damit Einfluß auf den Gefäßwiderstand nehmen können. Allerdings scheinen die anderen Isoformen den Verlust der eNOS nicht kompensieren zu können, wie der arterielle Druckanstieg zeigt. Die Überexpression des eNOS-Gens führt umgekehrt zu einer arteriellen Hypotonie (Ohashi *et al* 1998). Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass von der endothelialen NO-Synthase gebildetes NO einen Einfluß auf den Tonus der Gefäße hat und hier auch dilatierend wirksam ist.

In cGKI-defizienten Mäusen war der arterielle Mitteldruck, verglichen mit dem ihrer Wildtypwurfgeschwister, nicht erhöht (siehe **Abbildung 3.1**). Dieser Befund ist zunächst überraschend, deckt sich aber mit Ergebnissen einer vorangegangenen Studie (Pfeifer *et al* 1998). In dieser Studie wurde zwar gezeigt, dass bei sehr jungen Tieren dieses Genotyps (32 Tage) eine arterielle Hypertonie von 15 mmHg besteht, bei etwas älteren Tieren (ab 42 Tagen) jedoch ein normaler mittlerer arterieller Druck gefunden wurde. Pfeiffer *et al.* vermuten, dass Defekte in anderen Organsystemen, die sich über die Zeit in den cGKI-defizienten Tieren manifestieren, den Blutdruck beeinflussen. Die cGKI-defizienten Tiere weisen einen deutlich reduzierten Ernährungs- und Allgemeinzustand im Vergleich mit ihren Wildtypwurfgeschwistern

auf. Der Gendefekt führt zu einer Pylorusstenose und gleichzeitig einer herabgesetzten Motilität des gesamten Gastrointestinaltrakts, was eine schlechtere Resorption der Nahrungsbestandteile zur Folge hat (Pfeifer *et al* 1998). Daher leiden die Tiere unter einer Mangelernährung, was sich in einem reduzierten Gewicht der cGKI-defizienten Mäuse im Vergleich zu ihren Wildtypwurfgeschwistern niederschlägt. Dies könnte einen möglichen arteriellen Hypertonus, der durch den Gendefekt bedingt ist, verschleiern.

Vor dem Hintergrund der Bedeutung der cGMP-abhängigen Proteinkinase I als wichtiges Effektorprotein der NO-induzierten Vasodilatation (Hofmann *et al* 2000; Schlossmann *et al* 2003), die auch durch eigene Befunde belegt und im folgenden diskutiert wird, besteht eine Diskrepanz zu dem Hypertonus in eNOS-defizienten Tieren. Möglicherweise sind dafür NO-Effekte verantwortlich, die nicht über die cGKI, sondern andere Effektorproteine vermittelt werden, z.B. über die von dem Gendefekt nicht betroffene cGMP-Proteinkinase II. Über die Aktivierung der cGMP-Proteinkinase II hemmt NO die Reninsekretion (Wagner *et al* 1998). Diese Hemmung ist in cGKI-defizienten Tieren intakt, fehlt aber in eNOS-defizienten Mäusen. Somit könnte eine gesteigerte Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems zur arteriellen Hypertonie in eNOS-defizienten Tieren beitragen. Tatsächlich weisen eNOS-defiziente Tiere eine erhöhte Reninkonzentration im Plasma auf (Shesely *et al* 1996). Ausserdem induziert NO unabhängig von dem sGC/cGMP/cGKI-Signalweg direkt eine Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen und ruft eine Dilatation hervor, indem es die Kaliumkanäle großer Leitfähigkeit direkt öffnet (Faraci und Heistad 1998; Nelson und Quayle 1995). Ebenso denkbar ist, dass durch den Verlust des cGMP-Effektorproteins cGKI in den Widerstandsgefäßen ein alternatives vasodilatierendes Moment vermehrt gebildet wird.

4.2 Bedeutung der cGKI für die NO-induzierte Vasodilatation

Die Untersuchung der funktionellen Bedeutung der cGMP-abhängigen Proteinkinase I für die NO-induzierte Dilatation in Widerstandsgefäßen erfolgte zum einen durch intraarterielle Bolusapplikation des nicht-enzymatischen NO-Donors SNP und zum anderen durch Applikation von SNP bzw. des alternativen NO-Donors SNAP lokal

auf den Cremastermuskel und die Untersuchung der Gefäßreaktion mittels Intravitalmikroskopie.

Die Bolusapplikation von SNP in die Arteria carotis führte zu einem deutlichen Abfall des arteriellen Mitteldrucks in Wildtyp- und eNOS-defizienten Mäusen (siehe **Abbildung 3.2**). Die Injektion einer NO-freien Kontrollösung hatte keinen Effekt. Dies legt den Schluß nahe, dass das aus SNP freigesetzte NO in diesen Tieren zu einer Abnahme des totalen peripheren Widerstands geführt hat, ausgelöst durch eine Durchmesserzunahme in den Widerstandsgefäßen. Dies konnte durch die direkte visuelle Beobachtung dieser Widerstandsgefäße bestätigt werden: Es kam zu einer deutlichen, konzentrationsabhängigen Vasodilatation der Arteriolen nach Superfusion von nicht-enzymatischen NO-Donoren in diesen Tieren. Dabei waren zwei chemisch verschiedene Substanzen (SNP und SNAP) gleich effektiv (siehe **Abbildung 3.3 a + b**).

Im Gegensatz dazu war sowohl die Drucksenkung nach Injektion als auch die Dilatation nach lokaler Applikation der NO-Donoren in cGKI-defizienten Tieren stark abgeschwächt (siehe **Abbildung 3.2 b** und **Abbildung 3.3**). In der isolierten Aorta von Tieren dieses Genotyps induzierte die Applikation von NO-Donoren ebenfalls keine Dilatation (Pfeifer *et al* 1998). Dies zeigt, dass die cGKI ein essentieller Bestandteil des Signaltransduktionsweges bei der NO-induzierten Vasodilatation in Widerstandsgefäßen und großen Leitungsgefäßen wie der Aorta ist.

Der NO-Donor 2-(N,N-diethylamino)-diazennolat-2-oxid (DEA-NO) führte bei einer Konzentration von 10 µmol/L in kleinen Arterien (A. tibialis) (Sausbier *et al* 2000) zu Dilatationen. Ähnlich war auch in den hier untersuchten Widerstandsgefäßen bei hohen Konzentrationen der NO-Donoren (3 und 10 µmol/L) eine geringe Durchmesserzunahme zu beobachten (siehe **Abbildung 3.4**). Dies weist auf eine cGKI-unabhängige Dilatation in diesem Konzentrationsbereich hin. Da NO die lösliche Guanylatcyclase (sGC) aktiviert und bei hohen Konzentrationen auch eine hohe cGMP-Konzentration in den glatten Muskelzellen zu erwarten ist, könnte cGMP zu einer cGKI-unabhängigen Dilatation führen. So kann cGMP die cGMP-sensitive Phosphodiesterase 3 hemmen, die für den Abbau des anderen second messengers cAMP verantwortlich ist. Daraus resultiert ein Anstieg der cAMP-Konzentration

(Maurice und Haslam 1990). Die Erhöhung des cAMP-Spiegels aufgrund einer Verminderung des Abbaus, ausgelöst durch die cGMP-induzierte Hemmung der Phosphodiesterase, wird auch als Mechanismus der synergistischen Wirkung von cAMP- und cGMP-erhöhenden Substanzen in glatten Muskelzellen (de Wit *et al* 1994) und Plättchen vermutet (Maurice und Haslam 1990). Da in der verwendeten Versuchsanordnung die Bestimmung der intrazellulären cGMP- und cAMP-Konzentrationen in glatten Gefäßmuskelzellen nicht praktikabel ist, kann nicht mit absoluter Sicherheit beurteilt werden, ob die cAMP-Spiegel tatsächlich angestiegen waren.

Prinzipiell ist auch eine Kreuzaktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (Proteinkinase A) durch hohe cGMP-Spiegel denkbar. Sausbier *et al.* konnten zeigen, dass hohe cGMP-Konzentrationen die Proteinkinase A aktivieren (Sausbier *et al* 2000); sie vermuten eine Vasodilatation auf diesem Wege. Wie schon erwähnt, kann NO in hohen Konzentrationen auch cGKI-unabhängig Kaliumkanäle aktivieren. Somit bleibt der Mechanismus der Dilatation bei hohen, unphysiologischen NO-Konzentrationen unklar. Dennoch zeigen die Daten deutlich, dass die cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGKI) das Haupteffektorprotein der NO-induzierten Vasodilatation in Arteriolen ist.

Eine Reihe von intrazellulären Zielproteinen der cGKI werden phosphoryliert und können so zu einer Dilatation führen. Auf der Ebene des kontraktiven Apparats stellt die Myosin-bindende-Untereinheit der Myosin-Phosphatase ein Substrat dar (Bolz *et al* 2003). Durch die Interaktion mit dieser Untereinheit über einen Leucin-Zipper entsteht ein Multienzymkomplex, der durch die cGKI aktiviert wird, dann die Phosphorylierung des Myosins herabsetzt und die Interaktion mit Aktin vermindert (Surks *et al* 1999). Das kleine G-Protein RhoA, dessen Aktivierung zu einer Kontraktion führt, wird von der cGKI an einem Serinrest an Position 188 phosphoryliert. Hierdurch wird die Translokation an die Zellmembran und dadurch der kontraktionssteigernde Effekt blockiert (Sauzeau *et al* 2000; Sauzeau *et al* 2003). Da RhoA seine Aktivität über die Myosin Phosphatase entfaltet, werden beide Signaltransduktionswege als calciumunabhängig bezeichnet. Auf dieser gemeinsamen Endstrecke (Myosin Phosphatase) wird also die Ca²⁺-Sensitivität der kontraktiven Filamente herabgesetzt (Somlyo und Somlyo 2000), und NO kann so

ohne Änderung des Calciumspiegels zu einer Dilatation führen. Zusätzlich nimmt NO Einfluß auf den Calciumspiegel. Auch hierbei ist die cGKI beteiligt, indem sie das Inositol-1,4,5-trisphosphat-assoziierte-cGKI-Substrat (IRAG) phosphoryliert und die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischem Retikulum hemmt (Hofmann *et al* 2006; Schlossmann *et al* 2000). Die cGKI aktiviert desweiteren die Calcium-ATPase (SERCA) auf der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums, indem sie einen Phosphatrest auf das Regulatorprotein Phospholamban überträgt. Dadurch kommt es zu einer Disinhibition der SERCA, die vermehrt Calciumionen in das sarkoplasmatische Retikulum zurückpumpt und so die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration absenkt (Feil *et al* 2002). Zusammengenommen nimmt NO also über die cGMP-abhängige Proteinkinase I Einfluß auf calciumunabhängige und calciumabhängige Mechanismen der Vasodilatation.

4.3 Bedeutung des NO/cGMP/cGKI-Weges bei der endothelabhängigen Dilatation

Zur Untersuchung der rezeptorvermittelten Stimulation des Endothels wird sehr häufig Acetylcholin verwendet, von dem bereits seit 1980 bekannt ist, dass es nur in Anwesenheit eines intaktes Endothels eine Vasodilatation induziert (Furchgott und Zawadzki 1980). Daher bezeichnet man Acetylcholin auch als endothelabhängigen Vasodilatator. Acetylcholin dient u.a. auch als Transmitter an der motorischen Endplatte und den präsynaptischen vegetativen Ganglien, sowie in postsynaptischen Ganglien des Parasympathikus.

Die Rolle von NO bei der endothelabhängigen Dilatation wurde in den zwei genetischen Mutanten mit einem Defekt im NO-Signalweg untersucht. Die endothelabhängige Vasodilatation auf Acetylcholin wurde wie die NO-Donoren untersucht, nämlich durch Injektion von Acetylcholin in die Arteria carotis und durch Superfusion auf den präparierten Cremastermuskel. Die systemische Applikation von Acetylcholin führte sowohl in eNOS- als auch cGKI-defizienten Mäusen zu einer vergleichbaren, dosisabhängigen Abnahme des mittleren arteriellen Drucks (**Abbildung 3.5**) und unterschied sich nicht von Wildtyptieren. Die direkte Beobachtung der Arteriolen unter dem Mikroskop zeigte, dass diese Drucksenkung auf einer Zunahme des Durchmessers der Gefäße beruht (**Abbildung 3.6**). Auch

hierbei unterschied sich die Reaktion der Arteriolen in eNOS- und cGKI-defizienten Tieren nicht von derjenigen in Wildtyptieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die endothelabhängige Dilatation in Widerstandsgefäßen unabhängig von der NO-Signaltransduktionskaskade ist. Dieser Befund steht in deutlichem Gegensatz zu Ergebnissen, die an der Aorta und kleineren Leitungsgefäßen aus cGKI-defizienten Tieren erhoben wurden (Pfeifer *et al* 1998; Sausbier *et al* 2000). In diesen Gefäßen war die durch Acetylcholin hervorgerufene Vasodilatation in cGKI-defizienten Tieren nahezu aufgehoben, obwohl Acetylcholin in Wildtyptieren wirksam war. Ebenso war die Dilatation auf Acetylcholin in Leitungsgefäßen aus eNOS-defizienten Tieren deutlich vermindert (Chataigneau *et al* 1999; Faraci *et al* 1998; Huang *et al* 1995). Dies zeigt, dass in den Widerstandsgefäßen - im Gegensatz zu größeren Arterien - die endothelabhängige Vasodilatation zum größten Teil oder sogar komplett unabhängig von der NO/cGMP/cGKI-Signaltransduktionskaskade ist. Übereinstimmend mit diesem Befund war die Acetylcholin-induzierte Dilatation auch nach pharmakologischer Blockade der NO-Synthase in dieser Präparation nicht abgeschwächt (Wolfe und de Wit 2005).

Daher stellte sich die Frage, welcher Mediator und welcher Signaltransduktionsweg die Acetylcholin-induzierte Durchmesserzunahme in diesen Gefäßen vermittelt. In einer Reihe vorangegangener Studien wurde gezeigt, dass Prostaglandine als Mediator zur Dilatation beitragen können. Bei chronischem Mangel von Stickstoffmonoxid (eNOS-defiziente Tiere) scheinen Prostaglandine eine akzentuierte Rolle als Mediatoren einer endothelabhängigen Vasodilatation zu spielen. So waren Dilatationen in Koronararterien verschiedener Spezies und Arteriolen des Musculus gracilis nach Hemmung der Prostaglandinsynthese abgeschwächt (Godecke *et al* 1998; Sun *et al* 1999; Puybasset *et al* 1996). Die Autoren schlossen daraus, dass Prostaglandine nach Verlust des NO-Systems dessen Rolle bei der Acetylcholin-induzierten Vasodilatation zumindest teilweise übernehmen und in diesen Tieren eine wichtige Funktion im Gefäßbett ausüben. In anderen Spezies (Hamster) mediierten Prostaglandine die Acetylcholin-induzierte Dilatation auch in Anwesenheit von endogenem NO (de Wit *et al* 1993).

In der vorliegenden Arbeit schränkte die Hemmung der Zyklooxygenase mittels Indometacin die Vasodilatation nach Endothelstimulation in Wildtyptieren nur insofern

ein, als eine geringfügig höhere Konzentration von Acetylcholin notwendig war, um eine Dilatation auszulösen. Die Dilatation der Arteriolen in den cGKI-defizienten Tieren war nach Indometacin nicht eingeschränkt. In eNOS-defizienten Tieren war die maximale Dilatation leicht abgeschwächt, aber die deutliche konzentrationsabhängige Gefäßerweiterung verhinderte Indometacin nicht (**Abbildung 3.7**). Die in dieser Arbeit verwendete Konzentration des Inhibitors ist ausreichend (3 $\mu\text{mol/L}$), um die Prostaglandinsynthese zu hemmen, da bei gleichen Inhibitorkonzentrationen in einer ähnlichen Präparation eine ausreichende Wirkung erzielt wurde (de Wit *et al* 1999).

Dies zeigt, dass die durch die endotheliale Zyklooxygenase synthetisierten vasodilatierenden Prostaglandine, unter denen das Prostazyklin (PGI_2) eine dominierende Rolle einnimmt, nicht die hauptverantwortlichen Mediatoren einer endothelabhängigen Vasodilatation bei intakter oder defizienter endothelialer NO-Bildung in Widerstandsgefäßen der Maus sind. Die unterschiedliche Bedeutung der Prostaglandine bei der endothelabhängigen Gefäßerweiterung in den oben genannten Studien im Vergleich zur vorliegenden Arbeit kann durch unterschiedliche Faktoren bedingt sein. Einerseits wurden die Untersuchungen in verschiedenen Organsystemen (Koronarkreislauf gegenüber Skelettmuskelgefäßen) durchgeführt. Der Einfluß der Prostaglandine nach Endothelstimulation kann in NO-defizienten Systemen zwischen unterschiedlichen Gefäßsystemen variieren. Andererseits ist sicherlich auch die Größe und Funktion der untersuchten Gefäße von Bedeutung, wie es sich auch in der vorliegenden Arbeit für NO als Vasodilatator gezeigt hat.

Da eine ausgeprägte Dilatation verblieb (**Abbildung 3.7**), muss ein dritter endothelialer, gefäßerweiternder Mechanismus funktionell beteiligt sein, welcher unabhängig von der NO/cGMP/cGKI-Kaskade und Prostaglandinen eine Relaxation der vaskulären glatten Muskulatur hervorruft. Dies wurde in einer Reihe von Organen und Gefäßen gefunden. Unter der Annahme, dass es sich um einen Faktor handelt, wurde diese dritte Substanz Endothelium-derived-hyperpolarizing-factor (EDHF) genannt (Busse *et al* 2002; Fleming 2004; Mombouli und Vanhoutte 1997; Nagao und Vanhoutte 1992).

4.4 Derivate der Cytochrom-P450-Monooxygenase als möglicher EDHF

Vom Endothel gebildete Derivate der Cytochrom-P450-Monooxygenase wurden in der Literatur mehrfach als Mediatoren einer Stickstoffmonoxid- und Prostaglandin-unabhängigen Dilatation charakterisiert. Sie steigern die Öffnungswahrscheinlichkeit Ca^{2+} -abhängiger Kaliumkanäle und hyperpolarisieren die glatte Gefäßmuskulatur und relaxieren so Gefäße (Campbell *et al* 1996; Hecker *et al* 1994). Damit erfüllen sie einige Kriterien eines Endothelium-derived-hyperpolarizing-factor (EDHF). Viele Befunde weisen auf einen bestimmten Metaboliten des Arachidonsäurestoffwechsels hin, nämlich die 11,12 Epoxy-Eicosatriensäure (11,12 EET) (Pratt *et al* 2001). Die Cytochrom-P450-Monooxygenasen bilden eine heterogene Gruppe mit einer Reihe von Isoenzymen. In Gefäßen des Herzens (Ding *et al* 2002; Fisslthaler *et al* 1999) und des Skelettmuskels (Bolz *et al* 2000; Huang *et al* 2001) ließ sich die Isoform 2C8/9 als EDHF-Synthase nachweisen, denn die gezielte Ausschaltung mittels Antisensetechnik hob die NO- und Prostaglandin-unabhängige Dilatation auf. Aus diesem Grund wurde diese Isoform der Cytochrom-P450-Monooxygenase in Anwesenheit von Indometacin in eNOS-defizienten Mäusen durch Sulfaphenazol gehemmt (Mancy *et al* 1996). Dies führte aber nicht zu einer Abschwächung der Acetylcholin-induzierten Vasodilatation (**Abbildung 3.8**). Ein anderer Hemmstoff, der unterschiedliche Isoformen der Cytochrom-P450-Monooxygenase irreversibel deaktiviert und sich auch chemisch und in Bezug auf den Inhibitionsort am Enzym von Sulfaphenazol unterscheidet, beeinflusste die endothelabhängige Vasodilatation in eNOS-defizienten Tieren ebenfalls in keiner Weise (**Abbildung 3.8**). Bei beiden Inhibitoren ist eine zu geringe Konzentration als Ursache für einen fehlenden Effekt ausgeschlossen, da andere Autoren in den verwendeten Konzentrationen am Cremastermuskel des Hamsters eine hemmende Wirkung auf die NO- und Prostaglandin-unabhängige Dilatation beobachteten (de Wit *et al* 1999; Hoepfl *et al* 2002b; Welsh und Segal 2000).

Dies belegt, dass ein EDHF in den Widerstandsgefäßen der Maus nicht durch Katalyse der Cytochrom-P450-Monooxygenase entsteht. Ähnliche Befunde wurden am isoliert perfundierten Hinterlauf der Maus erhoben. Brandes und Mitarbeiter zeigten, dass weder Sulfaphenazol noch ODYA noch Miconazol (ein weiterer Cytochrom-P450-Monooxygenase-Hemmstoff) zu einer Abschwächung der

endothelabhängigen Dilatation führten (Brandes *et al* 2000). In dieser Studie wurde Bradykinin zur Stimulation des Endothels verwendet. Im Gegensatz dazu riefen die Cytochrom-P450-Monooxygenase-Inhibitoren Clotrimazol und Miconazol in isolierten Arteriolen des Musculus gracilis der Maus eine deutliche Abschwächung der Acetylcholin-induzierten Vasodilatation hervor (Huang *et al* 2000). Hierbei muß allerdings berücksichtigt werden, dass beide Substanzen neben der Hemmung der Cytochrom-P450-Monooxygenase auch Kaliumkanäle blockieren können (Vanheel *et al* 1999; Vanheel und de Van 1997). Insofern ist die Aussagekraft dieser Ergebnisse beschränkt. Eine Erklärung für diese sich widersprechenden Ergebnisse ist sicherlich die unterschiedliche Herkunft der Gefäße und die verwendete Methodik: einerseits isoliert perfundierter Hinterlauf, andererseits isolierte, nicht perfundierte Gefäße. In unterschiedlichen Gefäßen ist die Wertigkeit der Cytochrom-P450-Monooxygenase einerseits belegt, andererseits aber widerlegt. Die Literatur ist umfangreich, dennoch ergibt sich kein klares Bild. Als Substanzen, die ebenfalls als EDHF fungieren können, sind vorgeschlagen worden: Kaliumionen (Edwards *et al* 1998), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Matoba *et al* 2000; Shimokawa und Morikawa 2005), Anandamid (Randall und Kendall 1998) und C-Typ natriuretisches Peptid (CNP) (Ahluwalia und Hobbs 2005; Chauhan *et al* 2003).

4.5 Beteiligung von Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanälen bei der EDHF-Dilatation

Eine ganze Reihe von Untersuchungen belegt, dass die endothelabhängige Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen durch die Öffnung von Kaliumkanälen erfolgt. Der Efflux von Kaliumionen nach Acetylcholinapplikation aus vorher mit ^{42}K -Isotopen beladenen Arterien zeigt direkt, dass ein Ausstrom von Kaliumionen durch Acetylcholin ausgelöst wird (Chen *et al* 1988; Taylor *et al* 1988). Da vaskuläre Zellen normalerweise ein Membranpotential aufweisen, welches oberhalb des Kaliumgleichgewichtspotentials liegt, führt die Öffnung von Kaliumkanälen zu einem Kaliumausstrom und Hyperpolarisation. Wird das Kaliumgleichgewichtspotential durch die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentrationen experimentell verschoben, so hat die Öffnung der Kaliumkanäle keinen Effekt auf das Membranpotential. Chen und Mitarbeiter haben die extrazelluläre Kaliumkonzentration auf über 25 mmol/L angehoben und damit

eine Hyperpolarisation glatter Gefäßmuskelzellen erfolgreich unterbunden (Chen und Suzuki 1989). Auch der Anteil der Acetylcholin-induzierten Dilatation, der unabhängig von NO und Prostaglandinen ist, wird durch dieses experimentelle Manöver erfolgreich unterbunden (de Wit *et al* 1999). Dies läßt vermuten, dass die Hyperpolarisation und Dilatation tatsächlich durch Kaliumkanalöffnung zustande kam.

Aus der großen Gruppe der Kaliumkanäle stehen die Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanäle besonders im Fokus. Hiervon gibt es verschiedene Subtypen, die sich in ihrer Leitfähigkeit unterscheiden. In glatten Gefäßmuskelzellen sind vor allem Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit (BK_{Ca}) exprimiert (Brenner *et al* 2000). Daher sollte gezielt dieser Kanaltyp und sein Beitrag zur EDHF-abhängigen Vasodilatation analysiert werden. Iberiotoxin, ein spezifischer Inhibitor dieses Kanals (Galvez *et al* 1990), schwächte die Acetylcholin-induzierte Dilatation der Arteriolen in eNOS-defizienten Mäusen in Anwesenheit von Indometacin deutlich ab (**Abbildung 3.9**). Auch In Wildtyptieren führte Iberiotoxin zu einer deutlichen Reduktion der Dilatation. Dabei war es unerheblich, ob die endotheliale NO-Synthese unterdrückt war (**Abbildung 3.9**). Diese Befunde zeigen, dass eine Hyperpolarisation der Gefäßmuskelzellen in den Widerstandsgefäßen, hauptsächlich vermittelt durch die Öffnung der Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit (BK_{Ca}), die Dilatation induziert. Auch andere Untersucher finden eine entscheidende Rolle dieses Kanals bei der EDHF-vermittelten Dilatation (Huang *et al* 2000; Nishikawa *et al* 1999). Huang und Mitarbeiter sahen eine Relevanz des BK_{Ca} -Kanals für die EDHF-abhängige Vasodilatation allerdings nur in eNOS-defizienten Tieren. In Wildtypmäusen dagegen war die Acetylcholin-induzierte Dilatation vornehmlich durch Stickstoffmonoxid vermittelt (Huang *et al* 2000). In der vorliegenden Arbeit war die Effektivität des BK_{Ca} -Kanal-Inhibitors unabhängig davon, ob die endotheliale NO-Bildung intakt oder chronisch (eNOS-Defizienz) bzw. akut pharmakologisch unterbunden war. Dabei wurden Arteriolen in vivo beobachtet. Im Gegensatz dazu untersuchten Huang und Mitarbeiter isolierte Gefäße im Organbad. Dies führt zwangsläufig dazu, dass nur größere Gefäße untersucht werden können. So untersuchten Huang *et al.* kleine Arterien mit einem Durchmesser zwischen 70 und 80 μm , während die hier untersuchten Gefäße einen Durchmesser von 20 bis 30 μm aufwiesen. Zusammenfassend belegt dies, dass mit Abnahme des Gefäßdurchmessers die Bedeutung des NO/cGMP/cGKI-Weges bei der

endothelabhängigen Dilatation schwindet und die Hyperpolarisation diese Rolle mehr und mehr durch die Öffnung des BK_{Ca}-Kanals übernimmt.

Es werden verschiedene Aktivierungsmechanismen des BK_{Ca}-Kanals vorgeschlagen. Transiente, lokalisierte Anstiege der intrazellulären Calciumkonzentration (sogenannte „Calcium sparks“), die nach IP₃-vermittelter Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum entstehen können, führen zu einer Öffnung des Kanals (Jaggar *et al* 2000). Dieser Kanal wird ebenfalls durch die oben diskutierten Produkte der Cytochrom-P450-Monooxygenase (Epoxyeicosatriensäuren) aktiviert (Campbell *et al* 1996). NO kann den Kaliumstrom durch den BK_{Ca}-Kanal entweder direkt (Bolotina *et al* 1994) oder über Phosphorylierung durch die cGKI (Fukao *et al* 1999; Sausbier *et al* 2000) erhöhen.

In der vorliegenden Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass die NO/cGMP/cGKI – Signalkaskade oder NO direkt nicht für die Öffnung des BK_{Ca} von Bedeutung sind, da Iberiotoxin die NO-Dilatation nicht abschwächte. Weiterhin scheinen auch die durch die Cytochrom-P450-Monooxygenase synthetisierten Epoxyeicosatriensäuren in dieser Präparation nicht diesen Kanal bei der Acetylcholin-induzierten Dilatation zu aktivieren, weil Inhibitoren dieses Enzyms keinen Effekt hatten, Iberiotoxin aber die Dilatation abschwächte. Welcher Faktor in dieser Präparation als EDHF zur Öffnung des BK_{Ca}-Kanals führte, muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Im Gegensatz zu den glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert das Endothel vor allem Ca²⁺-abhängige Kaliumkanäle niedriger und mittlerer Leitfähigkeit (SK_{Ca} und IK_{Ca}) (Busse *et al* 2002). Seit langem ist bekannt, dass die Stimulation von Endothelzellen mit Acetylcholin zu einer Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration führt (Busse *et al* 1988), die die Aktivierung der SK_{Ca}- und IK_{Ca}-Kanäle zur Folge hat (Burnham *et al* 2002; Marchenko und Sage 1996). Dies führt zu einer Hyperpolarisation der Endothelzellen wie es auch in genau dieser Präparation gezeigt wurde (Siegl *et al* 2005). Daher sollte die Bedeutung des SK_{Ca} für die EDHF-abhängige Vasodilatation mittels des spezifischen Inhibitors Apamin untersucht werden.

Die Superfusion von Apamin schwächte Dilatationen nach Acetylcholin im Cremastermuskel von Wildtypmäusen signifikant ab, ohne sie jedoch komplett zu unterdrücken. Apamin unterdrückt somit weit weniger effektiv die endothelabhängige Dilatation als Iberiotoxin. Wurde Iberiotoxin anschließend hinzugefügt, führte dies zu einer weiteren deutlichen Abschwächung der Dilatation (**Abbildung 3.10**). Somit sind Apamin-sensitive Kaliumkanäle des Endothels bei der Acetylcholin-Dilatation involviert. Sie könnten durch die endotheliale Hyperpolarisation eine vermehrte Freisetzung dilatativer, hyperpolarisierender Mediatoren zur Folge haben. Diese Mediatoren entfalten ihre Wirkung aber über den in den glatten Gefäßmuskelzellen exprimierten BK_{Ca} -Kanal, denn es findet keine Addition der inhibitorischen Wirkung von Apamin und Iberiotoxin statt. Die Applikation von Apamin und Charybdotoxin, einem Inhibitor des IK_{Ca} – und BK_{Ca} -Kanals, hebt die Vasodilatation nach Acetylcholingabe vollständig auf (Doughty *et al* 1999). Da Apamin allein in der vorliegenden Arbeit die Dilatation nicht unterdrücken konnte, setzt das Endothel auch in Anwesenheit von Apamin weiterhin hyperpolarisierende Faktoren frei, die eine Aktivierung des BK_{Ca} -Kanals zur Folge haben.

4.6 Pathophysiologische Relevanz der BK_{Ca} - vermittelten EDHF-abhängigen Vasodilatation

Die kleinen Arterien und Arteriolen sind entscheidend für den arteriellen Mitteldruck. Damit kommt den Mechanismen, die eine Durchmesseränderung dieser Gefäße bewirken, unter physiologischen und pathophysiologischen Gesichtspunkten eine entscheidende Rolle zu. Unter physiologischen Bedingungen ist die cGMP-abhängige Proteinkinase I das Haupteffektorprotein des Stickstoffmonoxids. In großen Leitungsgefäßen ist dieser Signalweg ein wichtiger Mediator der endothelabhängigen Gefäßerweiterung. Allerdings nimmt die Bedeutung des EDHF entlang des Gefäßbaumes mit abnehmendem Gefäßdurchmesser zu und ist ein physiologisch wichtiger Mediator der endothelabhängigen Vasodilatation in den Widerstandsgefäßen. Eine Reihe von Untersuchungen verdeutlichen, dass EDHF auch im Menschen wichtig ist (Halcox *et al* 2001; Honing *et al* 2000; Inokuchi *et al* 2003; Miura *et al* 1999).

Unter pathophysiologischen Bedingungen, die zu vaskulären Erkrankungen führen, scheint nicht nur die NO-, sondern auch die EDHF-mediierte Vasodilatation verändert zu sein. In Tiermodellen mit primärer und sekundärer arterieller Hypertonie konnte gezeigt werden, dass der Anteil des EDHF an der endothelabhängigen Vasodilatation stark reduziert war (Bussemaker *et al* 2003; Fujii *et al* 1992; Sunano *et al* 1999). Dabei war die Ca^{2+} -bindende Untereinheit des BK_{Ca} -Kanals herabreguliert, was zu einer geringeren Calciumsensitivität des Kanals und einem vermindertem Kaliumstrom führte (Amberg und Santana 2003). Durch Therapie der Hypertonie konnte der Anteil des EDHF an der endothelabhängigen Vasodilatation wieder dem der normotensiven Kontrollgruppe angenähert werden (Onaka *et al* 1998).

Auch in Tiermodellen mit Diabetes mellitus zeigte sich, dass durch chronisch erhöhte Blutglucosewerte die EDHF-vermittelte Gefäßrelaxation reduziert war. Eine Insulintherapie verhinderte dies (Fukao *et al* 1997). Andere Gruppen konnten zeigen, dass durch das bei diabetischer Stoffwechsellage vermehrt gebildete Peroxynitrit eine Hemmung des BK_{Ca} -Kanals induziert wird (Elliott *et al* 1998; Liu *et al* 2002). Dies erklärt möglicherweise die Verminderung der EDHF-vermittelten Gefäßantwort unter diesen Bedingungen.

Daher ist denkbar, dass durch eine Schädigung des Endothels ein Verlust des physiologischen Vasodilatators EDHF bzw. seiner Effektivität auftritt. Somit könnte nicht nur der Mangel von NO, sondern ebenso eine Einschränkung der EDHF Effektivität von EDHF unter pathophysiologischen Bedingungen zur Entstehung von Sekundärerkrankungen wie Herzinfarkt, Schlaganfall und peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) führen. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang, dass EDHF, genau wie NO, auch die Plättchenaggregation hemmt (Krotz *et al* 2004). Inwieweit EDHF möglicherweise pharmakologisch ersetzt werden kann und sich eine therapeutische Konsequenz zur Behandlung von Risikopatienten ableiten lässt, muss die Zukunft zeigen.

5. Zusammenfassung

Die Regulation der Organdurchblutung erfolgt durch Eng- (Vasokonstriktion) bzw. Weitstellung (Vasodilatation) der Arteriolen (10 – 50 µm Durchmesser). Hierbei spielt das Endothel eine zentrale Rolle. Es nimmt im wesentlichen durch drei vasodilatierende Autakoide Einfluss auf den Kontraktionszustand der glatten Muskelzellen: Durch das von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) synthetisierte Stickstoffmonoxid (NO), welches die Bildung des second messengers cGMP stimuliert, durch das von der Zykllooxygenase gebildete Prostazyklin (PGI₂) und durch einen Endothelium-derived hyperpolarizing Faktor (EDHF). In der vorliegenden Arbeit wurde an der Maus untersucht, ob die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGKI) die dilatierende Wirkung von NO vermittelt, und welche der endothelialen Autakoide bei der ACh-induzierten Dilatation beteiligt sind. Hierzu wurden der arterielle Druck im wachen Tier und die arteriolen Durchmesser mittels Intravitalmikroskopie vor und nach Endothelstimulation gemessen. Es wurden Mäuse untersucht, die defizient für die eNOS- bzw. die cGKI waren, und mit Wildtyptieren verglichen.

Während eNOS-defiziente Tiere einen höheren arteriellen Druck aufwiesen, war dies in cGKI-defizienten Tieren nicht zu beobachten. Die intraarterielle Applikation von NO-Donoren führte in eNOS-defizienten und Wildtyptieren zu einem deutlichen Druckabfall, der in cGKI-defizienten Tieren nahezu aufgehoben war. Auch die Beobachtung der Arteriolen zeigte, dass NO-Dilatationen in cGKI-defizienten Tieren fast komplett verschwunden waren. Dies belegt, dass die NO-induzierte Vasodilatation über den cGMP/cGKI-Weg vermittelt ist. Die verbleibende Dilatation bei hohen NO-Konzentrationen ist eventuell cGKI unabhängig. Im Gegensatz zum NO, führte ACh in allen untersuchten Genotypen zu einem konzentrationsabhängigem Druckabfall und arteriolen Dilatationen. Es fand sich keine Abschwächung in eNOS- und cGKI-defizienten Tieren. Diese Dilatationen nach Endothelstimulation wurden durch Indometacin, einem Inhibitor der Zykllooxygenase, nur geringfügig abgeschwächt. Somit findet man in den Widerstandsgefäßen ACh-induzierte, endothelabhängige Dilatationen nicht vermittelt über die Bildung von NO oder Prostaglandinen, sondern mediiert über EDHF. Es handelt sich bei dem EDHF nicht um ein Syntheseprodukt der Cytochrom-P450-Monooxygenase, denn eine Inhibition dieses Enzyms hatte keinen Effekt. Bei dieser EDHF-vermittelten Dilatation

sind Calcium-abhängige Kaliumkanäle beteiligt, da Apamin, ein Inhibitor des in Endothelzellen exprimierten Kaliumkanals kleiner Leitfähigkeit (SK_{Ca}), die Dilatationen abschwächt. Iberiotoxin, ein spezifischer Inhibitor des Kaliumkanals großer Leitfähigkeit (BK_{Ca}), der in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert ist, hob die arterioläre Dilatation nahezu auf. Dies zeigt, dass der SK_{Ca} an der endothelabhängigen Dilatation beteiligt ist und die Antwort unterstützt bzw. verstärkt. Eine Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen, die letztendlich zur Vasodilatation führt, wird aber über den BK_{Ca} -Kanal induziert.

Zusammenfassend zeigt diese Untersuchung, dass NO in Arteriolen seine Wirkung hauptsächlich über den cGMP/cGKI-Signaltransduktionsweg auslöst. Allerdings wird die endothelabhängige Vasodilatation in Widerstandsgefäßen vor allem von einem hyperpolarisierenden Faktor vermittelt, der vermutlich kein Syntheseprodukt der Cytochrom-P450-Monooxygenase darstellt. Seine Wirkung entfaltet dieser EDHF über die Aktivierung des BK_{Ca} -Kanals in glatten Gefäßmuskelzellen.

6. Literaturverzeichnis

Ahluwalia, A. und Hobbs, A. J. (2005) Endothelium-derived C-type natriuretic peptide: more than just a hyperpolarizing factor *Trends Pharmacol.Sci.* **26**, 162-167

Alioua, A., Tanaka, Y., Wallner, M., Hofmann, F., Ruth, P., Meera, P., und Toro, L. (1998) The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo *J.Biol.Chem.* **273**, 32950-32956

Amberg, G. C. und Santana, L. F. (2003) Downregulation of the BK channel beta1 subunit in genetic hypertension *Circ.Res.* **93**, 965-971

Arribas, S., Galvan, R., Ferrer, M., Herguido, M. J., Marin, J., und Balfagon, G. (1991) Characterization of the subtype of presynaptic alpha 2-adrenoceptors modulating noradrenaline release in cat and bovine cerebral arteries *J.Pharm.Pharmacol.* **43**, 855-859

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

Baldwin, A. L. und Thurston, G. (2001) Mechanics of endothelial cell architecture and vascular permeability *Crit Rev.Biomed.Eng* **29**, 247-278

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

Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J., Pagano, P. J., und Cohen, R. A. (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle *Nature* **368**, 850-853

Bolz, S. S., Fisslthaler, B., Pieperhoff, S., de Wit, C., Fleming, I., Busse, R., und 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

Bolz, S. S., Vogel, L., Sollinger, D., Derwand, R., de Wit, C., Loirand, G., und Pohl, U. (2003) Nitric oxide-induced decrease in calcium sensitivity of resistance arteries is attributable to activation of the myosin light chain phosphatase and antagonized by the RhoA/Rho kinase pathway *Circulation* **107**, 3081-3087

Brandes, R. P., Schmitz-Winnenthal, F. H., Feletou, M., Godecke, A., Huang, P. L., Vanhoutte, P. M., Fleming, I., und Busse, R. (2000) An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 9747-9752

Brenner, R., Perez, G. J., Bonev, A. D., Eckman, D. M., Kosek, J. C., Wiler, S. W., Patterson, A. J., Nelson, M. T., und Aldrich, R. W. (2000) Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel *Nature* **407**, 870-876

Burnham, M. P., Bychkov, R., Feletou, M., Richards, G. R., Vanhoutte, P. M., Weston, A. H., und Edwards, G. (2002) Characterization of an apamin-sensitive small-conductance Ca(2⁺)-activated K(+) channel in porcine coronary artery endothelium: relevance to EDHF *Br.J.Pharmacol.* **135**, 1133-1143

Busse, R., Edwards, G., Feletou, M., Fleming, I., Vanhoutte, P. M., und Weston, A. H. (2002) EDHF: bringing the concepts together *Trends Pharmacol.Sci.* **23**, 374-380

- Busse, R., Fichtner, H., Luckhoff, A., und Kohlhardt, M. (1988) Hyperpolarization and increased free calcium in acetylcholine-stimulated endothelial cells *Am.J.Physiol* **255**, 965-969
- Busse, R., Luckhoff, A., und Mulsch, A. (1991) Cellular mechanisms controlling EDRF/NO formation in endothelial cells *Basic Res.Cardiol.* **86 Suppl 2**, 7-16
- Bussemaker, E., Popp, R., Fisslthaler, B., Larson, C. M., Fleming, I., Busse, R., und Brandes, R. P. (2003) Aged spontaneously hypertensive rats exhibit a selective loss of EDHF-mediated relaxation in the renal artery *Hypertension* **42**, 562-568
- Campbell, W. B., Gebremedhin, D., Pratt, P. F., und Harder, D. R. (1996) Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors *Circ.Res.* **78**, 415-423
- Chataigneau, T., Feletou, M., Huang, P. L., Fishman, M. C., Duhault, J., und Vanhoutte, P. M. (1999) Acetylcholine-induced relaxation in blood vessels from endothelial nitric oxide synthase knockout mice *Br.J.Pharmacol.* **126**, 219-226
- Chauhan, S. D., Nilsson, H., Ahluwalia, A., und Hobbs, A. J. (2003) Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **100**, 1426-1431
- Chen, G. und Suzuki, H. (1989) Some electrical properties of the endothelium-dependent hyperpolarization recorded from rat arterial smooth muscle cells *J.Physiol* **410**, 91-106
- Chen, G., Suzuki, H., und Weston, A. H. (1988) Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels *Br.J.Pharmacol.* **95**, 1165-1174
- Coleman, H. A., Tare, M., und Parkington, H. C. (2004) Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* **31**, 641-649
- Cowan, C. L. und Cohen, R. A. (1991) Two mechanisms mediate relaxation by bradykinin of pig coronary artery: NO-dependent and -independent responses *Am.J.Physiol* **261**, 830-835
- Cowan, C. L., Palacino, J. J., Najibi, S., und Cohen, R. A. (1993) Potassium channel-mediated relaxation to acetylcholine in rabbit arteries *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **266**, 1482-1489
- Davies, P. F., Olesen, S. P., Clapham, D. E., Morrel, E. M., und Schoen, F. J. (1988) Endothelial communication. State of the art lecture *Hypertension* **11**, 563-572
- Davis, M. J. und Hill, M. A. (1999) Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response *Physiol Rev.* **79**, 387-423
- de Wit, C., Esser, N., Lehr, H. A., Bolz, S. S., und Pohl, U. (1999) Pentobarbital-sensitive EDHF mediates ACh-induced arteriolar dilation in the hamster microcirculation *Am.J.Physiol* **276**, 1527-1534
- de Wit, C., Schafer, C., von Bismarck, P., Bolz, S. S., und Pohl, U. (1997) Elevation of plasma viscosity induces sustained NO-mediated dilation in the hamster cremaster microcirculation in vivo *Pflugers Arch.* **434**, 354-361
- de Wit, C., von Bismarck, P., und 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

- de Wit, C., von Bismarck, P., und Pohl, U. (1994) Synergistic action of vasodilators that increase cGMP and cAMP in the hamster cremaster microcirculation *Cardiovasc.Res.* **28**, 1513-1518
- Ding, Z., Godecke, A., und Schrader, J. (2002) Contribution of cytochrome P450 metabolites to bradykinin-induced vasodilation in endothelial NO synthase deficient mouse hearts *Br.J.Pharmacol.* **135**, 631-638
- Doughty, J. M., Plane, F., und Langton, P. D. (1999) Charybdotoxin and apamin block EDHF in rat mesenteric artery if selectively applied to the endothelium *Am.J.Physiol* **276**, 1107-1112
- Edwards, G., Dora, K. A., Gardener, M. J., Garland, C. J., und Weston, A. H. (1998) K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries *Nature.* **396**, 269-272
- Elliott, S. J., Lacey, D. J., Chilian, W. M., und Brzezinska, A. K. (1998) Peroxynitrite is a contractile agonist of cerebral artery smooth muscle cells *Am.J.Physiol* **275**, 1585-1591
- Evans, R. J. und Surprenant, A. (1992) Vasoconstriction of guinea-pig submucosal arterioles following sympathetic nerve stimulation is mediated by the release of ATP *Br.J.Pharmacol.* **106**, 242-249
- Faraci, F. M. und Heistad, D. D. (1998) Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels *Physiol Rev.* **78**, 53-97
- Faraci, F. M., Sigmund, C. D., Shesely, E. G., Maeda, N., und Heistad, D. D. (1998) Responses of carotid artery in mice deficient in expression of the gene for endothelial NO synthase *Am.J.Physiol* **274**, 564-570
- Feil, R., Gappa, N., Rutz, M., Schlossmann, J., Rose, C. R., Konnerth, A., Brummer, S., Kuhbandner, S., und Hofmann, F. (2002) Functional reconstitution of vascular smooth muscle cells with cGMP-dependent protein kinase I isoforms *Circ.Res.* **90**, 1080-1086
- Fisslthaler, B., Popp, R., Kiss, L., Potente, M., Harder, D. R., Fleming, I., und Busse, R. (1999) Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries *Nature* **401**, 493-497
- Fleming, I. (2004) Cytochrome P450 epoxygenases as EDHF synthase(s) *Pharmacol.Res.* **49**, 525-533
- Fujii, K., Tominaga, M., Ohmori, S., Kobayashi, K., Koga, T., Takata, Y., und Fujishima, M. (1992) Decreased endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in smooth muscle of the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats *Circ.Res.* **70**, 660-669
- Fukao, M., Hattori, Y., Kanno, M., Sakuma, I., und Kitabatake, A. (1997) Alterations in endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries from streptozotocin-induced diabetic rats *Br.J.Pharmacol.* **121**, 1383-1391
- Fukao, M., Mason, H. S., Britton, F. C., Kenyon, J. L., Horowitz, B., und Keef, K. D. (1999) Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072 *J.Biol.Chem.* **274**, 10927-10935
- Furchgott, R. F. (1983) Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle *Circ.Res.* **53**, 557-573
- Furchgott, R. F. und Zawadzki, J. V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine *Nature* **288**, 373-376

- Galvez, A., Gimenez-Gallego, G., Reuben, J. P., Roy-Contancin, L., Feigenbaum, P., Kaczorowski, G. J., und Garcia, M. L. (1990) Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus* *J.Biol.Chem.* **265**, 11083-11090
- Godecke, A., Decking, U. K., Ding, Z., Hirchenhain, J., Bidmon, H. J., Godecke, S., und Schrader, J. (1998) Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice *Circ.Res.* **82**, 186-194
- Gustafsson, H. (1993) Vasomotion and underlying mechanisms in small arteries. An in vitro study of rat blood vessels *Acta Physiol Scand.Suppl* **614**, 1-44
- Haas, T. L. und Duling, B. R. (1997) Morphology favors an endothelial cell pathway for longitudinal conduction within arterioles *Microvasc.Res.* **53**, 113-120
- Halcox, J. P., Narayanan, S., Cramer-Joyce, L., Mincemoyer, R., und Quyyumi, A. A. (2001) Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the human forearm microcirculation *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **280**, 2470-2477
- Hecker, M., Bara, A. T., Bauersachs, J., und Busse, R. (1994) Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals *J.Physiol* **481**, 407-414
- Hoepfl, B., Rodenwaldt, B., Pohl, U., und de Wit, C. (2002) 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**, 996-1004
- Hofmann, F., Ammendola, A., und Schlossmann, J. (2000) Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases *J.Cell Sci.* **113**, 1671-1676
- Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T., und Schlossmann, J. (2006) Function of cGMP-Dependent Protein Kinases as Revealed by Gene Deletion *Physiol Rev.* **86**, 1-23
- Honing, M. L., Smits, P., Morrison, P. J., und Rabelink, T. J. (2000) Bradykinin-induced vasodilation of human forearm resistance vessels is primarily mediated by endothelium-dependent hyperpolarization *Hypertension* **35**, 1314-1318
- Huang, A., Sun, D., Carroll, M. A., Jiang, H., Smith, C. J., Connetta, J. A., Falck, J. R., Shesely, E. G., Koller, A., und Kaley, G. (2001) EDHF mediates flow-induced dilation in skeletal muscle arterioles of female eNOS-KO mice *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **280**, 2462-2469
- Huang, A., Sun, D., Smith, C. J., Connetta, J. A., Shesely, E. G., Koller, A., und Kaley, G. (2000) In eNOS knockout mice skeletal muscle arteriolar dilation to acetylcholine is mediated by EDHF *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **278**, 762-768
- Huang, P. L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K. D., Moskowitz, M. A., Bevan, J. A., und Fishman, M. C. (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase *Nature* **377**, 239-242
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., und Chaudhuri, G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**, 9265-9269

- Ignarro, L. J., Lipton, H., Edwards, J. C., Baricos, W. H., Hyman, A. L., Kadowitz, P. J., und Gruetter, C. A. (1981) Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **218**, 739-749
- Inokuchi, K., Hirooka, Y., Shimokawa, H., Sakai, K., Kishi, T., Ito, K., Kimura, Y., und Takeshita, A. (2003) Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human forearm circulation *Hypertension* **42**, 919-924
- Jackson, W. F. (1993) Arteriolar tone is determined by activity of ATP-sensitive potassium channels *Am.J.Physiol* **265**, 1797-1803
- Jackson, W. F. (2000) Ion channels and vascular tone *Hypertension* **35**, 173-178
- Jackson, W. F., Konig, A., Dambacher, T., und Busse, R. (1993) Prostacyclin-induced vasodilation in rabbit heart is mediated by ATP-sensitive potassium channels *Am.J.Physiol* **264**, 238-243
- Jaggard, J. H., Porter, V. A., Lederer, W. J., und Nelson, M. T. (2000) Calcium sparks in smooth muscle *Am.J.Physiol Cell Physiol* **278**, 235-256
- Krotz, F., Riexinger, T., Buerkle, M. A., Nithipatikom, K., Gloe, T., Sohn, H. Y., Campbell, W. B., und Pohl, U. (2004) Membrane-potential-dependent inhibition of platelet adhesion to endothelial cells by epoxyeicosatrienoic acids *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **24**, 595-600
- Kruger, O., Plum, A., Kim, J. S., Winterhager, E., Maxeiner, S., Hallas, G., Kirchhoff, S., Traub, O., Lamers, W. H., und Willecke, K. (2000) Defective vascular development in connexin 45-deficient mice *Development* **127**, 4179-4193
- Kumar, N. M. und Gilula, N. B. (1996) The gap junction communication channel *Cell* **84**, 381-388
- Kurihara, N., Alfie, M. E., Sigmon, D. H., Rhaleb, N. E., Shesely, E. G., und Carretero, O. A. (1998) Role of nNOS in blood pressure regulation in eNOS null mutant mice *Hypertension* **32**, 856-861
- Little, T. L., Beyer, E. C., und Duling, B. R. (1995) Connexin 43 and connexin 40 gap junctional proteins are present in arteriolar smooth muscle and endothelium in vivo *Am.J.Physiol* **268**, 729-739
- Liu, Y., Terata, K., Chai, Q., Li, H., Kleinman, L. H., und Gutterman, D. D. (2002) Peroxynitrite inhibits Ca²⁺-activated K⁺ channel activity in smooth muscle of human coronary arterioles *Circ.Res.* **91**, 1070-1076
- Mancy, A., Dijols, S., Poli, S., Guengerich, P., und 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
- Marchenko, S. M. und Sage, S. O. (1996) Calcium-activated potassium channels in the endothelium of intact rat aorta *J.Physiol* **492**, 53-60
- Marshall, J. M. (2000) Adenosine and muscle vasodilatation in acute systemic hypoxia *Acta Physiol Scand.* **168**, 561-573
- Matoba, T. und Shimokawa, H. (2003) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans *J.Pharmacol.Sci.* **92**, 1-6

- Matoba, T., Shimokawa, H., Nakashima, M., Hirakawa, Y., Mukai, Y., Hirano, K., Kanaide, H., und Takeshita, A. (2000) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice *J.Clin.Invest* **106**, 1521-1530
- Mattson, D. L. (2001) Comparison of arterial blood pressure in different strains of mice *Am.J.Hypertens.* **14**, 405-408
- Maurice, D. H. und Haslam, R. J. (1990) Molecular basis of the synergistic inhibition of platelet function by nitrovasodilators and activators of adenylate cyclase: inhibition of cyclic AMP breakdown by cyclic GMP *Mol.Pharmacol.* **37**, 671-681
- McGillivray-Anderson, K. M. und Faber, J. E. (1990) Effect of acidosis on contraction of microvascular smooth muscle by alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors. Implications for neural and metabolic regulation *Circ.Res.* **66**, 1643-1657
- Meddings, J. B., Scott, R. B., und Fick, G. H. (1989) Analysis and comparison of sigmoidal curves: application to dose-response data *Am.J.Physiol.* **257**, 982-989
- Miura, H., Liu, Y., und Gutterman, D. D. (1999) Human coronary arteriolar dilation to bradykinin depends on membrane hyperpolarization: contribution of nitric oxide and Ca²⁺-activated K⁺ channels *Circulation* **99**, 3132-3138
- Mombouli, J. V. und Vanhoutte, P. M. (1997) Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown *Trends Pharmacol.Sci.* **18**, 252-256
- Mori, K., Nakaya, Y., Sakamoto, S., Hayabuchi, Y., Matsuoka, S., und Kuroda, Y. (1998) Lactate-induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca²⁺-activated K⁺ channels *J.Mol.Cell Cardiol.* **30**, 349-356
- Munzel, T., Feil, R., Mulsch, A., Lohmann, S. M., Hofmann, F., und Walter, U. (2003) Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected] *Circulation* **108**, 2172-2183
- Murphy, M. E. und Brayden, J. E. (1995) Apamin-sensitive K⁺ channels mediate an endothelium-dependent hyperpolarization in rabbit mesenteric arteries *J.Physiol* **489**, 723-734
- Nagao, T. und Vanhoutte, P. M. (1992) Hyperpolarization as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery *J.Physiol* **445**, 355-367
- Napoli, C. und Ignarro, L. J. (2003) Nitric oxide-releasing drugs *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **43**, 97-123
- Nelson, M. T. und Quayle, J. M. (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle *Am.J.Physiol* **268**, 799-822
- Nilius, B. und Droogmans, G. (2001) Ion channels and their functional role in vascular endothelium *Physiol Rev.* **81**, 1415-1459
- Nishigaki, K., Faber, J. E., und Ohyanagi, M. (1991) Interactions between alpha-adrenoceptors and adenosine receptors on microvascular smooth muscle *Am.J.Physiol* **260**, 1655-1666
- Nishikawa, Y., Stepp, D. W., und Chilian, W. M. (1999) In vivo location and mechanism of EDHF-mediated vasodilation in canine coronary microcirculation *Am.J.Physiol* **277**, 1252-1259

- Ohashi, Y., Kawashima, S., Hirata, K., Yamashita, T., Ishida, T., Inoue, N., Sakoda, T., Kurihara, H., Yazaki, Y., und Yokoyama, M. (1998) Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase *J.Clin.Invest* **102**, 2061-2071
- Onaka, U., Fujii, K., Abe, I., und Fujishima, M. (1998) Antihypertensive treatment improves endothelium-dependent hyperpolarization in the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats *Circulation* **98**, 175-182
- Palmer, R. M., Ashton, D. S., und Moncada, S. (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine *Nature* **333**, 664-666
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G., und Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor *Nature* **327**, 524-526
- Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiss, C., Wang, G. X., Korth, M., Aszodi, A., Andersson, K. E., Krombach, F., Mayerhofer, A., Ruth, P., Fassler, R., und Hofmann, F. (1998) Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice *EMBO J.* **17**, 3045-3051
- Pratt, P. F., Li, P., Hillard, C. J., Kurian, J., und Campbell, W. B. (2001) Endothelium-independent, ouabain-sensitive relaxation of bovine coronary arteries by EETs *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **280**, 1113-1121
- Puybasset, L., Bea, M. L., Ghaleh, B., Giudicelli, J. F., und Berdeaux, A. (1996) Coronary and systemic hemodynamic effects of sustained inhibition of nitric oxide synthesis in conscious dogs. Evidence for cross talk between nitric oxide and cyclooxygenase in coronary vessels *Circ.Res.* **79**, 343-357
- Quilley, J., Fulton, D., und Mcgiff, J. C. (1997) Hyperpolarizing factors *Biochem.Pharmacol.* **54**, 1059-1070
- Randall, M. D. und Kendall, D. A. (1998) Anandamide and endothelium-derived hyperpolarizing factor act via a common vasorelaxant mechanism in rat mesentery *Eur.J.Pharmacol.* **346**, 51-53
- Rapoport, R. M., Draznin, M. B., und Murad, F. (1983) Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation *Nature* **306**, 174-176
- Sadow, S. L. und Hill, C. E. (2000) Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses *Circ.Res.* **86**, 341-346
- Sausbier, M., Schubert, R., Voigt, V., Hirneiss, C., Pfeifer, A., Korth, M., Kleppisch, T., Ruth, P., und Hofmann, F. (2000) Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation *Circ.Res.* **87**, 825-830
- Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Smolenski, A., Lohmann, S. M., Bertoglio, J., Chardin, P., Pacaud, P., und Loirand, G. (2000) Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle *J.Biol.Chem.* **275**, 21722-21729
- Sauzeau, V., Rolli-Derkinderen, M., Marionneau, C., Loirand, G., und Pacaud, P. (2003) RhoA expression is controlled by nitric oxide through cGMP-dependent protein kinase activation *J.Biol.Chem.* **278**, 9472-9480

- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G. X., Allescher, H. D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F., und Ruth, P. (2000) Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta *Nature* **404**, 197-201
- Schlossmann, J., Feil, R., und Hofmann, F. (2003) Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases *Ann.Med.* **35**, 21-27
- Segal, S. S. und Kurjiaka, D. T. (1995) Coordination of blood flow control in the resistance vasculature of skeletal muscle *Med.Sci.Sports Exerc.* **27**, 1158-1164
- Shaul, P. W., Farrar, M. A., und 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
- Shesely, E. G., Maeda, N., Kim, H. S., Desai, K. M., Krege, J. H., Laubach, V. E., Sherman, P. A., Sessa, W. C., und Smithies, O. (1996) Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 13176-13181
- Shimokawa, H. und Morikawa, K. (2005) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans *J.Mol.Cell Cardiol.* **39**, 725-732
- Siegl, D., Koeppen, M., Wolfle, S. E., Pohl, U., und de Wit, C. (2005) Myoendothelial coupling is not prominent in arterioles within the mouse cremaster microcirculation in vivo *Circ.Res.* **97**, 781-788
- Smyth, E. M. und FitzGerald, G. A. (2002) Human prostacyclin receptor *Vitam.Horm.* **65:149-65.**, 149-165
- Sobey, C. G. (2001) Potassium channel function in vascular disease *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **21**, 28-38
- Somlyo, A. P. und Somlyo, A. V. (2000) Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II *J.Physiol* **522**, 177-185
- Stauss, H. M., Godecke, A., Mrowka, R., Schrader, J., und Persson, P. B. (1999) Enhanced blood pressure variability in eNOS knockout mice *Hypertension.* **33**, 1359-1363
- Stone, J. R. und Marletta, M. A. (1996) Spectral and kinetic studies on the activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide *Biochemistry* **35**, 1093-1099
- Sun, D., Huang, A., Smith, C. J., Stackpole, C. J., Connetta, J. A., Shesely, E. G., Koller, A., und Kaley, G. (1999) Enhanced release of prostaglandins contributes to flow-induced arteriolar dilation in eNOS knockout mice *Circ.Res.* **85**, 288-293
- Sunano, S., Watanabe, H., Tanaka, S., Sekiguchi, F., und Shimamura, K. (1999) Endothelium-derived relaxing, contracting and hyperpolarizing factors of mesenteric arteries of hypertensive and normotensive rats *Br.J.Pharmacol.* **126**, 709-716
- Surks, H. K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S. P., Tang, K. M., Ito, M., Lincoln, T. M., und Mendelsohn, M. E. (1999) Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase Ialpha *Science* **286**, 1583-1587
- Taylor, S. G., Southerton, J. S., Weston, A. H., und Baker, J. R. (1988) Endothelium-dependent effects of acetylcholine in rat aorta: a comparison with sodium nitroprusside and cromakalim *Br.J.Pharmacol.* **94**, 853-863

Van Itallie, C. M. und Anderson, J. M. (2004) The molecular physiology of tight junction pores *Physiology.(Bethesda.)* **19**, 331-338

Van Rijen, H., van Kempen, M. J., Analbers, L. J., Rook, M. B., van Ginneken, A. C., Gros, D., und Jongasma, H. J. (1997) Gap junctions in human umbilical cord endothelial cells contain multiple connexins *Am.J.Physiol* **272**, C117-C130

Vanheel, B., Calders, P., Van, den Bossche, I, und Van, de, V (1999) Influence of some phospholipase A2 and cytochrome P450 inhibitors on rat arterial smooth muscle K⁺ currents *Can.J.Physiol Pharmacol.* **77**, 481-489

Vanheel, B. und Van, de, V (1997) Evidence against the involvement of cytochrome P450 metabolites in endothelium-dependent hyperpolarization of the rat main mesenteric artery *J.Physiol.* **501**, 331-341

Wagner, C., Pfeifer, A., Ruth, P., Hofmann, F., und Kurtz, A. (1998) Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression *J.Clin.Invest* **102**, 1576-1582

Wang, M. H., Brand-Schieber, E., Zand, B. A., Nguyen, X., Falck, J. R., Balu, N., und Schwartzman, M. L. (1998) Cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolism in the rat kidney: characterization of selective inhibitors *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **284**, 966-973

Welsh, D. G. und Segal, S. S. (2000) Role of EDHF in conduction of vasodilation along hamster cheek pouch arterioles in vivo *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **278**, 1832-1839

Wofle, S. E. und de Wit, C. (2005) Intact endothelium-dependent dilation and conducted responses in resistance vessels of hypercholesterolemic mice in vivo *J.Vasc.Res.* **42**, 475-482

7. Anhang

Die Versuchsdurchführung erfolgte nach den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes und war durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ211-2531-12/99).

8. Publikationen

Originalarbeiten

Koeppe M, Feil R, Siegl D, Feil S, Hofmann F, Pohl U, de Wit C
cGMP-dependent protein kinase mediates NO- but not acetylcholine-induced dilations in resistance vessels in vivo
Hypertension 44: 952-955, 2004

Siegl D, **Koeppe M**, Wölfle SE, Pohl U, de Wit C
Myoendothelial coupling is not prominent in arterioles within the mouse cremaster microcirculation in vivo
Circ.Res. 97: 781-788, 2005

Kongressbeiträge als Abstractpublikationen

Koeppe KBM, Feil R, Feil S, Hofmann F, Pohl U, de Wit C
NO-, but not acetylcholine-induced arteriolar dilations are impaired in cGMP-dependent protein kinase-deficient mice
J.Vasc.Res. 40: 203, 2003
Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Mikrozirkulation, München, 10.-12.10.2002

Koeppe KBM, Feil R, Feil S, Hofmann F, Pohl U, de Wit C
NO-, but not ACh-induced dilations are impaired in cGMP-dependent protein kinase k.o. mice
Pflügers Arch. 445 (Suppl 1): S19, 2003

de Wit C, **Koeppe KBM**, Feil R, Feil S, Hofmann F, Pohl U
NO-, but not ACh-induced arteriolar dilations are impaired in cGMP-dependent protein kinase deficient mice
FASEB J. 17 (Suppl.): A130, 2003
Experimental Biology 2003, San Diego, 11.-15.04.2003

de Wit C, **Koeppe KBM**, Feil R, Feil S, Hofmann F, Pohl U
Beschränkte Bedeutung der cGMP-abhängigen Proteinkinase für die endothelabhängige Kontrolle des Gefäßtonus in der Mikrozirkulation der Maus in vivo
Z.Kardiol. 92 (Suppl.): I-374, 2003
69. Tagung d. Dtsch. Ges. f. Herz- und Kreislaufforsch., Mannheim, 24.-26.4.2003

Koeppe KBM, Feil R, Feil S, Hofmann F, Pohl U, de Wit C
ACh dilates arterioles in mice in vivo primarily by the activation of BKCa Channels, whereas NO acts via the cGMP/cGKI
J.Vasc.Res. 41: 101, 2004
Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Mikrozirkulation, München, 16.-18.10.2003

de Wit C, Siegl D, **Koeppe KBM**, Pohl U
BKCa mediate VSM hyperpolarisation and dilation upon ACh in the murine microcirculation in vivo
Pflügers Arch. 447 (Suppl 1): S44, 2004
83. Tagung der Dtsch. Physiol. Ges., Leipzig, 14.-17.3.2004

Feil R, **Koeppen KBM**, Feil S, Pohl U, Hofmann F, de Wit C
Role of the NO/cGMP/cGKI pathway in blood pressure regulation
Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 369 (Suppl. 1): R37, 2004
45th Spring Meeting, Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie
und Toxikologie Mainz, March 9 -11, 2004

de Wit C, Siegl D, **Koeppen KBM**, Pohl U
Myoendothelial coupling is not prominent in murine arterioles in vivo
J.Vasc.Res. 41 (Suppl. 2): 35, 2004
European Society for Microcirculation 2004, Lisbon, 8.-11.09.2004

9. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Physiologischen Institut der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München am Lehrstuhl für vegetative Physiologie (Direktor: Prof. Dr. U. Pohl) in der Arbeitsgruppe von Herrn Priv. Doz. Dr.habil. C. de Wit durchgeführt.

Herrn Priv. Doz. Dr.med. C. de Wit möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas danken. Neben seiner großartigen fachlichen Betreuung, ohne die diese Arbeit nicht fertiggestellt worden wäre, verstand er es durch sein Engagement, seine Kompetenz und Diskussionsbereitschaft, die Begeisterung am wissenschaftlichen Arbeiten weiterzugeben. Dabei war die Zusammenarbeit immer von einer sehr freundlichen und freundschaftlichen Atmosphäre geprägt, die mir eine bleibende Erinnerung sein wird.

Herrn Prof. Dr. U. Pohl möchte ich stellvertretend für alle Mitarbeiter des Physiologischen Instituts der LMU für die freundliche Aufnahme danken. Die konstruktive Kritik während des experimentellen Teils und der Vorbereitung auf Vorträge boten mir die Möglichkeit, Erfahrungen zu sammeln, die für meine berufliche Zukunft sehr wertvoll sein werden.

Herrn Priv. Doz. Dr. R. Feil möchte ich für die Überlassung des cGKI-defizienten Mäusstammes danken, durch die meine Arbeit in dieser Form erst möglich wurde.

Sehr herzlich möchte ich mich bei den anderen Doktoranden der Arbeitsgruppe Hanna Boye, Stephanie Wölfle und Daniel Siegl für gute Zusammenarbeit und freundschaftlichen Umgang bedanken. Sie standen immer mit Rat und Tat zur Seite und haben so mit dafür gesorgt, dass die Arbeit im Labor menschlich eine große Bereicherung war.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder Stephan und meinen Freunden, allen voran Ruth Hecker und Gisela Machatschek, die mich nicht nur während der Dissertation immer sehr unterstützt haben. Ohne sie wäre diese Arbeit schlicht nicht möglich gewesen.

10. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Klaus Bernd Michael Köppen
Geburtstag und –ort: 22.03.1977 in München, Bayern
Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULBILDUNG

1983 - 1987 Grund- und Hauptschule Stetten, Leinfelden-
Echterdingen, Baden-Württemberg
1987 – 1988 Eduard-Spranger-Gymnasium, Filderstadt,
Baden-Württemberg
1988 - 1997 Gymnasium Vilshofen, Bayern
06/1997 Allgemeine Hochschulreife

STUDIUM

seit 05/1999 Immatrikulation an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität, München, Bayern
03/2001 Physikum
03/2002 1. Staatsexamen
09/2004 2. Staatsexamen
04/2005 – 03/2006 Praktisches Jahr
ca. 05/2006 3. Staatsexamen (Prüfungszeitraum 15.04.06 –
15.06.06)

DISSERTATION

04/2002 – 11/2003 Experimentelle Arbeiten am Institut für Physiologie
der LMU, München, Lehrstuhl vegetative Physiologie
(Leitung: Prof. Dr. U. Pohl)