

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

**Charakteristische Unterschiede der
Acetylcholin-induzierten Hyperpolarisation
in Endothel und glattem Muskel in der
Mikrozirkulation der Maus *in vivo* – Evidenz
für geringe myoendotheliale Kopplung**

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

vorgelegt von
Daniel Siegl
aus
Trostberg

Lübeck 2006

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. C. de Wit
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Dendorfer
3. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. net. Ralf Köhler

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	21
2.1	Material	21
2.1.1	Versuchstiere	21
2.1.2	Narkotika	21
2.1.3	Substanzen zur lokalen Applikation	22
2.1.4	Substanzen für die Superfusionslösung	22
2.1.5	Sonstige Materialien	22
2.2	Methoden	23
2.2.1	Versuchsvorbereitung	23
2.2.1.1	Anästhesie	23
2.2.1.2	Intubation der Trachea	24
2.2.1.3	Katheterisierung von V. jugularis und A. carotis	24
2.2.1.4	Präparation des M. cremaster	25
2.2.2	Apparativer Versuchsaufbau	28
2.2.2.1	Messung von Blutdruck und Herzfrequenz	28
2.2.2.2	Intravitalmikroskopie	29
2.2.2.3	Membranpotentialmessung	31
2.2.3	Prinzipieller Versuchsablauf	34
2.2.4	Versuchsprotokolle	36
2.2.4.1	Wirkung von vasoaktiven Substanzen	36
2.2.4.2	Untersuchung der beteiligten K_{Ca} -Kanäle	37
2.2.4.3	Ausbreitung der Hyperpolarisation	37
2.2.5	Statistik und Datenverarbeitung	38
2.2.6	Verwendete Software zur Erstellung der Dissertation	38
3	ERGEBNISSE	39
3.1	Membranpotential und Farbstoffkopplung der Endothelzellen (EC) und glatten Gefäßmuskelzellen (VSM) unter Ruhebedingungen	39
3.1.1	Identifizierung der Zellen der Gefäßwand	39
3.1.2	Farbstoffkopplung zwischen den Zellen	40
3.1.3	Membranpotential in EC und VSM	40

3.2	Effekt der lokalen Applikation vasoaktiver Substanzen auf das Membranpotential von Gefäßzellen	41
3.2.1	Effekt der lokalen Applikation von Acetylcholin auf das MP in EC	41
3.2.2	Effekt der lokalen Applikation von Acetylcholin auf das MP in VSM	44
3.2.3	Vergleich der Hyperpolarisationen in EC und VSM	46
3.2.4	Effekt von NO (SNP) auf das Membranpotential in EC	49
3.2.5	Effekt von NO (SNP) auf das Membranpotential in VSM	51
3.2.6	Lokale Stimulation von EC und VSM in eNOS-defizienten Mäusen (eNOS ^{-/-}) mit Acetylcholin	52
3.3	Lokale Stimulation mit Acetylcholin nach selektiver Blockade Ca²⁺-abhängiger K⁺-Kanäle	54
3.3.1	Blockade von BK _{Ca} - und IK _{Ca} -Kanälen mit Charybdotoxin (ChTx)	54
3.3.1.1	Effekt von ChTx auf endotheliale Hyperpolarisationen	54
3.3.1.2	Effekt von ChTx auf Hyperpolarisationen in VSM	55
3.3.2	Blockade von BK _{Ca} -Kanälen mit Iberiotoxin (IbTx)	56
3.3.2.1	Effekt von IbTx auf endotheliale Hyperpolarisationen	57
3.3.2.2	Effekt von IbTx auf Hyperpolarisationen in VSM	58
3.3.3	Blockade von SK _{Ca} -Kanälen mit Apamin	59
3.3.3.1	Effekt von Apamin auf endotheliale Hyperpolarisationen	59
3.3.3.2	Effekt von Apamin auf Hyperpolarisationen in VSM	60
3.3.4	Membranpotential nach Behandlung mit K ⁺ -Kanalblockern	61
3.4	Ausbreitung ACh-induzierter Hyperpolarisationen entlang der Arteriole	63
3.4.1	Endotheliale Membranpotentialänderungen nach Acetylcholin in Abhängigkeit von der Entfernung	63
3.4.2	Membranpotentialänderungen in VSM nach Acetylcholin in Abhängigkeit von der Entfernung	66

4	DISKUSSION	68
4.1	Intravitale Membranpotentialmessung in der Mikrozirkulation der Maus – Farbstoffkopplung und Membranpotential	68
4.2	Effekt der lokalen Applikation vasoaktiver Substanzen auf das Membranpotential von Endothelzellen und glatten Muskelzellen	72
4.3	Lokale Stimulation mit Acetylcholin nach selektiver Blockade von K_{Ca}-Kanälen	81
4.4	Ausbreitung ACh-induzierter Hyperpolarisationen entlang der Arteriolen	86
5	ZUSAMMENFASSUNG	92
6	LITERATURVERZEICHNIS	95
7	ANHANG	112
8	PUBLIKATIONEN	113
9	DANKSAGUNG	114
10	LEBENS LAUF	115

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AD	Außendurchmesser
ADH	Antidiuretisches Hormon
ADP	Adenosin-Diphosphat
AgCl	Silberchlorid
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
ATP	Adenosin-Triphosphat
Ba ²⁺	Barium-Ion
BK _{Ca}	K _{Ca} mit hoher Leitfähigkeit
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalzium-Konzentration
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CB	Cannabinoid
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
ChTx	Charybdotoxin
Cl ⁻	Chlorid-Ion
CNP	C-Typ Natriuretisches Peptid
CO ₂	Kohlendioxid
Cx	Connexin
CYP ₄₅₀	Cytochrom-P ₄₅₀ -Epoxygenase
EC	Endothelzelle
EDH	Endothelium-Derived-Hyperpolarization
EDHF	Endothelium-Derived-Hyperpolarizing-Faktor
EDRF	Endothelium-Derived-Relaxing-Faktor
EET	Epoxyeicosatriensäure
E _{ion}	Gleichgewichtspotential eines Ions
E _m	Membranpotential
eNOS	endotheliale NO-Synthase
eNOS ^{-/-}	Mäuse, defizient für die endotheliale NO-Synthase

GTP	Guanosin-Triphosphat
H ⁺	Wasserstoff-Ion
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat-Ion
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoff-Peroxid
Hz	Hertz
IbTx	Iberiotoxin
IK _{Ca}	K _{Ca} mit mittlerer Leitfähigkeit
ID	Innendurchmesser
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K ⁺	Kalium-Ion
[K ⁺] _e	extrazelluläre Kalium-Konzentration
K _{ATP}	ATP-abhängiger Kalium-Kanal
K _{Ca}	Kalzium-abhängiger Kalium-Kanal
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
K _{IR}	einwärts gleichrichtender Kalium-Kanal
K _V	spannungsabhängiger Kalium-Kanal
L-NA	N [?] -nitro- <i>L</i> -Arginin, NO-Synthasehemmer
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MP	Membranpotential
MP ₀	Membranpotential vor Behandlung mit Blockern
n	Anzahl der Beobachtungen
N ₂	Stickstoff
Na ⁺	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
nNOS	neuronale NO-Synthase

NO	Stickstoffmonoxid
NPR	natriuretisches Peptid Rezeptor
O ₂	Sauerstoff
ODYA	17-Octadecynolsäure, Hemmstoff der CYP ₄₅₀
PGI ₂	Prostazyklin
pH	pH-Wert
PLC	Phospholipase C
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SK _{Ca}	K _{Ca} mit geringer Leitfähigkeit
SNP	Nitroprussid-Natrium (sodium nitruresside)
TEA	Tetraethylammonium
VSM	glatte Gefäßmuskelzelle

1 EINLEITUNG

Die Aufgabe des Kreislaufsystems besteht vor allem darin, die Organe durch An- und Abtransport von Atemgasen, Nährstoffen und deren Metaboliten über weite Strecken im Organismus zu versorgen, um die Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen zu gewährleisten. Innerhalb des Kreislaufs sind die verschiedenen Organkreisläufe parallel zueinander geschaltet. Um jedes dieser Organgebiete ständig maximal zu perfundieren, würde das Blutvolumen nicht ausreichen bzw. die Auswurfleistung des Herzens würde bei weitem überschritten werden. Eine solche Luxusversorgung ist auch gar nicht nötig, da dem Körper eine Reihe unterschiedlicher Regulationsmechanismen für eine bedarfsorientierte Organdurchblutung zur Verfügung steht.

Analog zum Ohmschen-Gesetz ist die Stromstärke, die im Kreislauf dem Strom-Zeitvolumen bzw. der Durchblutung entspricht, proportional zur treibenden Druckdifferenz (Blutdruck) und umgekehrt proportional zum Stömungswiderstand (peripherer Gefäßwiderstand). Nach dem Hagen-Poiseuille-Gesetz ist der Widerstand umgekehrt proportional zur 4. Potenz des Gefäßradius, die Durchblutung steigt somit mit der 4. Potenz des Radius an. Daraus ergibt sich, dass in den kleinen Gefäßen der Mikrozirkulation (kleine Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venolen, Lymphgefäße) der größte Widerstand zu finden ist. Der Gesamtquerschnitt der Kapillaren im menschlichen Körper ist etwa 500 – 800-mal größer als der Querschnitt der Aorta ascendens. Da die Kapillaren ihren Durchmesser nur in geringem Ausmaß ändern können, erfolgt die effektivste Regulation der Organdurchblutung in den ihnen vorgeschalteten kleinen Arterien und Arteriolen (Widerstandsgefäße). Über eine Änderung des Kontraktionszustandes ihrer glatten Muskulatur können sich die Gefäße erweitern (Vasodilatation) und verengen (Vasokonstriktion). Je höher der Gefäßtonus (Dauerspannung) in Ruhe ist, desto größer ist das Potential der Gefäßerweiterung und damit die Steigerung der Durchblutung. Besonders Organe mit stark wechselnden funktionellen Anforderungen wie Skelettmuskulatur, Gastrointestinaltrakt oder Haut haben einen hohen Basaltonus. In der Skelettmuskulatur kann während starker Arbeit die

Durchblutung um das 20 – 30 fache der Ruhedurchblutung zunehmen und es ist damit das Organ mit der relativ höchstmöglichen Durchblutungssteigerung. Um eine rasche Erhöhung der Durchblutung während Muskelarbeit zu erzielen, ist im Gefäßbett eine koordinierte Erweiterung der zuführenden Strecke zum Kapillarstromgebiet notwendig (Lash, 1996).

Kreislaufregulation

Der Gefäßtonus wird durch multiple Faktoren beeinflusst. Diese Faktoren haben in den jeweiligen Organsystemen eine teilweise unterschiedliche Gewichtung. In dieser Arbeit wurden Mechanismen in den Gefäßen der Skelettmuskulatur untersucht, weshalb in erster Linie die dort vorzufindenden Regulationsmechanismen beschrieben werden. Diese sind jedoch auch in anderen Organgebieten von Bedeutung.

Funktionell kann man zentrale und lokale Regulationsmechanismen unterscheiden, die *in vivo* eng miteinander verzahnt sind. Zentrale Mechanismen, die eher dazu dienen einen ausreichenden Blutdruck aufrechtzuerhalten und den Gesamtkreislauf zu kontrollieren, umfassen nervale (Sympathikus und Parasympathikus) und hormonelle Faktoren (z.B. Adrenalin, Noradrenalin, Renin, Angiotensin, Aldosteron, ANP, ADH, etc.). Verglichen mit den neuralen Mechanismen spielt die hormonelle Beeinflussung für die kurzfristige Regulation eine untergeordnete Rolle. Die vasokonstriktorisches Fasern des Sympathikus tragen zum hohen Gefäßtonus in der ruhenden Skelettmuskulatur bei. Ihre Nervenendigungen (Varikositäten) enthalten u. a. Noradrenalin, welches über α_1 -Rezeptoren an der glatten Muskulatur zur Kontraktion führt. Der Parasympathikus hat in den Gefäßen der Skelettmuskulatur wesentlich weniger Nervenendigungen, weshalb sein vasodilatatorischer Einfluss auch vergleichsweise gering ist. Im Gegensatz dazu, dienen lokale Mechanismen der Durchblutungsregulation der einzelnen Organkreisläufe und sind für eine bedarfsadaptierte Organperfusion von größter Bedeutung.

Lokale Regulation

Myogener Tonus

Für den hohen Gefäßtonus im ruhenden Skelettmuskel ist neben dem Sympathikus hauptsächlich der myogene Tonus verantwortlich. Das Prinzip des myogenen Tonus beruht auf der intrinsischen Eigenschaft des glatten Muskels, einer permanenten passiven Dehnung durch den transmuralen Druck mit einer Kontraktion entgegenzuwirken und einen Tonus aufzubauen. Erhöht sich der transmurale Druck rasch, so wird das Gefäß vermehrt gedehnt und der glatte Muskel der terminalen Arterien und Arteriolen kontrahiert (myogene Antwort, *Bayliss-Effekt*). Die myogene Antwort beruht auf der Öffnung dehnungsabhängiger Ionenkanäle, was zum Kationen-Einstrom und einer Depolarisation des glatten Muskels führt. Daraufhin öffnen sich spannungsabhängige Kalzium-Kanäle und es kommt zu einem sekundären Anstieg des intrazellulären Kalzium-Spiegels was letztendlich die Kontraktion auslöst (Davis *et al.*, 1992). Bei einer Erniedrigung des transmuralen Drucks laufen diese Mechanismen in umgekehrter Reihenfolge ab und der Muskeltonus nimmt ab. Durch die gleichsinnige Änderung des Strömungswiderstands mit dem Perfusionsdruck werden der kapillare Filtrationsdruck und die Durchblutung trotz Änderung des Blutdrucks konstant gehalten (myogene Autoregulation). Die Grenzen des autoregulatorischen Bereichs sind in den verschiedenen Organen unterschiedlich und damit auch das Ausmaß der Durchblutungskonstanz.

Metabolische Faktoren

In Organen mit stark wechselnder metabolischer Aktivität wie der Skelettmuskulatur besteht eine nahezu lineare Beziehung zwischen Stoffwechselaktivität und Durchblutung. Diese funktionelle (metabolische) Hyperämie wird u. a. durch die Akkumulation von lokal-chemischen Mediatoren vermittelt. Vasodilatatorisch wirken neben einer Erhöhung des CO₂-Partialdrucks bzw. der H⁺-Konzentration auch eine Erhöhung der K⁺-Konzentration, eine Steigerung der Gewebeosmolarität, Adenosin oder ein Absinken des O₂-Partialdrucks. Diese Faktoren haben nicht nur eine direkte relaxierende Wirkung auf den glatten Muskel sondern können auch indirekt die Noradrenalinfreisetzung aus den sympathischen Nervenendigungen hemmen. Die Wirkung der verschiedenen metabolischen Faktoren ist unterschiedlich stark und

organabhängig. Am ehesten kommt der Änderung des O₂-Partialdrucks eine größere Bedeutung zu.

Endothelabhängige Mechanismen

Bei der Regulation der lokalen Durchblutung kommt dem Endothel als Grenzschicht zwischen Blut und Gefäßwand eine zentrale Bedeutung zu. Daneben hat es auch andere wichtige Funktionen z. B. bei der Kontrolle der Homöostase, dem Stoffaustausch zwischen Intra- und Extravasalraum oder beim Ablauf von Entzündungsreaktionen und immunologischen Prozessen. Seine vasoaktiven Eigenschaften übt es einerseits durch Modulation der Konzentration im Blut zirkulierender vasoaktiver Substanzen mittels Metabolisierung und/oder Aufnahme aus. Andererseits kann das Endothel vasoaktive Gewebshormone (*Autakoide*) freisetzen. Endotheliale Autakoide werden nach Stimulation mit endogenen Substanzen wie Acetylcholin (ACh), Bradykinin, Serotonin, Histamin, Substanz P, ATP, ADP etc. freigesetzt. Nach der Bindung am Rezeptor steigt die intrazelluläre Kalzium-Konzentration an und Enzyme, die die Synthese der endothelialen Autakoide kontrollieren, werden aktiviert (Furchgott und Vanhoutte, 1989). Auch physikalische Stimuli wie Änderung der Wandschubspannung oder des O₂-Partialdrucks lösen die Bildung endothelialer Autakoide aus (Pohl *et al.*, 1986; Pohl und Busse, 1989; Pohl *et al.*, 1991, de Wit *et al.*, 1997). Zu den wichtigsten vasodilatatorischen endothelialen Autakoiden gehört neben Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin (PGI₂) auch der *endothelium-derived hyperpolarizing factor* (EDHF, siehe Abschnitt EDHF). Vasokonstriktorisches hingegen wirken z.B. Endothelin-1, Thromboxan A₂ oder reaktive Sauerstoffradikale wie Superoxidanionen (Stankevicius *et al.*, 2003). Im Folgenden werden die Mechanismen der endothelabhängigen Vasodilatation genauer erläutert.

NO und Prostazyklin

Furchgott und Zawadzki haben 1980 mit der Entdeckung der gefäßerweiternden Funktion des Endothels eine neue Ära in der Kreislaufforschung eingeleitet (Furchgott und Zawadzki, 1980). Kurze Zeit später wurde der für die Vasodilatation verantwortliche Faktor, der bis dato als *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) bezeichnet wurde, als

Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert (Palmer *et al.*, 1987, Ignarro *et al.*, 1987). Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) spaltet unter Bildung von L-Citrullin aus L-Arginin NO ab (Palmer *et al.*, 1988). NO aktiviert die glattmuskuläre Guanylatzyklase, wodurch die intrazelluläre Konzentration von zyklischem Guanosinmonophosphat (3'5'-cGMP) ansteigt. Über eine Signalkaskade, in der mehrere Proteine phosphoryliert werden, kommt es schließlich zum Abfall der Kalzium-Konzentration und einer Relaxation des glatten Muskels (Rapoport und Murat, 1983; Rapoport *et al.*, 1983).

Vasoaktive Prostaglandine entstehen durch Einwirkung der Phospholipase A₂, die aus Phospholipiden der endothelialen Zellmembran Arachidonsäure abspaltet. Daraus wird mit Hilfe der Zyklooxygenase zunächst Prostaglandin H₂ gebildet, das dann in weiteren Schritten in die verschiedenen Prostaglandine umgewandelt wird. Als bedeutendster Vasodilatator unter den Prostaglandinen ist das Prostazyklin (PGI₂) zu nennen (Moncada *et al.*, 1976). Es aktiviert die glattmuskuläre Adenylatzyklase wodurch der intrazelluläre Spiegel von zyklischem Adenosinmonophosphat ansteigt (cAMP). cAMP führt über die Aktivierung der Proteinkinase A zur Phosphorylierung von bestimmten Enzymen die ähnlich wie bei cGMP den intrazellulären Kalzium-Spiegel absenken, wodurch der Muskel erschlafft (Shaul *et al.*, 1992).

EDHF

Endothelzellen setzen als Antwort auf chemische oder physikalische Stimuli nicht nur NO und Prostaglandine frei, sondern können zusätzlich zu einer NO- und Prostaglandin-unabhängigen Hyperpolarisation (EDH, endothelium-derived hyperpolarization) und anschließender Dilatation der glatten Muskelzellen führen. In zahlreichen Gefäßen können endothelabhängige Relaxationen von endothelabhängigen Hyperpolarisationen des glatten Muskels begleitet sein. Erstmals wurde dies in Arteriolen von Meerschweinchen, Schweinen und Kaninchen (Bolton *et al.*, 1984; Bény und Brunet, 1988; Chen *et al.*, 1988; Feletou und Vanhoutte, 1988) beobachtet. Die Suche nach einem „universellen“ Faktor, der zu einer solchen endothelabhängigen Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen führt, prägte den Begriff des EDHF (endothelium derived hyperpolarizing factor). Eine andere Hypothese beschreibt die Möglichkeit, dass

eine endotheliale Hyperpolarisation nach ACh (Busse *et al.*, 1988; Chen und Cheung, 1992; Marchenko und Sage, 1994) über myoendotheliale Zellkopplung elektrotonisch auf die glatten Muskelzellen übertragen wird (Sandow und Hill, 2000). Zwar wurde EDHF noch nicht eindeutig isoliert, das Wissen über diesen dritten „pathway“ hat sich jedoch enorm erweitert und sollte nicht zuletzt durch diese Arbeit ergänzt werden.

Potential vaskulärer Zellen

Das Ruhemembranpotential einer Zelle wird durch die Gleichgewichtspotentiale für die verschiedenen Ionen bestimmt. Diffundieren Ionen wie zum Beispiel K^+ , Na^+ oder Cl^- entlang ihres Konzentrationsgefälles zwischen Intra- und Extrazellulärraum durch selektive Kanäle, so wird mit jedem Ion auch eine positive bzw. negative Elementarladung transportiert. Dabei wird eine elektrische Spannung über der Membran aufgebaut, die der Diffusion des Ions entlang des chemischen Gradienten entgegenwirkt. Sobald das aufgebaute elektrische Feld den von der Konzentrationsdifferenz erzeugten chemischen Gradienten kompensiert, bewegen sich in beide Richtungen gleich viele Ionen. Somit hat sich ein *Gleichgewichtspotential* (E_{ion}) eingestellt, das durch die Nernst-Gleichung für jedes Ion berechnet werden kann. In glatten Muskelzellen wurden ungefähr -84 mV für E_K , -31 mV für E_{Cl} , +58 mV für E_{Na} und +150 mV für E_{Ca} berechnet (Nelson *et al.*, 1995). Damit die intrazellulären Ionenkonzentrationen jedoch dauerhaft stabil bleiben, sind aktive Pumpmechanismen notwendig. So werden die chemischen Gradienten für Na^+ und K^+ durch die elektrogene Na^+/K^+ -Pumpe hergestellt bzw. erhalten. Dieser Ionenaustauscher transportiert unter Verbrauch eines ATP-Moleküls und entgegen eines Konzentrationsgradienten 3 Na^+ -Ionen aus der Zelle und 2 K^+ -Ionen in das Zellinnere. Die Pumpe ist für mehr als 1/3 des zellulären Energieverbrauchs verantwortlich. Das Membranpotential einer Zelle wird von den spezifischen Gleichgewichtspotentialen der einzelnen Ionen bestimmt. Bleibt das Membranpotential von ruhenden Zellen über eine längere Zeit konstant wird es als *Ruhemembranpotential* bezeichnet. In glatten Muskelzellen und Endothelzellen liegt es nahe dem K^+ -Gleichgewichtspotential E_K , da in der ruhenden Membran geöffnete K^+ -Kanäle weitaus am häufigsten sind, d.h. die Membran für K^+ -Ionen am durchlässigsten ist. Das Membranpotential ändert sich, wenn sich die Ionenkonzentrationsverhältnisse

zwischen Intra- und Extrazellulärraum ändern, sich Ionenkanäle öffnen oder schließen, oder Strom von benachbarten Zellen durch die Membran fließt. Definitionsgemäß werden Membranpotentiale immer relativ zwischen dem Intra- zum Extrazellulärraum gemessen. Ein Ruhemembranpotential von -40 mV bedeutet, dass die Membraninnenseite gegenüber der Membranaußenseite um 40 mV negativer geladen ist. Öffnen sich zum Beispiel K^+ -Kanäle, fließen K^+ -Ionen entlang ihres Konzentrationsgradienten aus der Zelle und nehmen dabei positive Elementarladungen mit, die Membraninnenseite verliert positive Ladung und das Membranpotential wird negativer (*Hyperpolarisation*) und gleicht sich dem E_K mehr oder weniger an. Umgekehrt vermindert das Schließen von K^+ -Kanälen den Ausstrom von K^+ -Ionen, es fließen weniger positive Elementarladungen nach Außen, das Membranpotential entfernt sich von E_K und wird positiver (*Depolarisation*). Zwar haben auch andere Ionen wie Na^+ , Cl^- und HCO_3^- Einfluss auf das Membranpotential, K^+ -Kanäle nehmen jedoch wegen der mit Abstand in Ruhe größten Öffnungswahrscheinlichkeit gegenüber anderen Ionenkanälen sowohl bei der Einstellung des Ruhemembranpotentials als auch bei der Hyperpolarisation des Membranpotentials eine zentrale Rolle ein und sollten deshalb in dieser Arbeit genauer untersucht werden. Je nach Bedingungen und Ionenkonzentrationsverhältnissen kommen an Zellen von Warmblütern Ruhemembranpotentiale von -30 bis -120 mV vor (innen negativ zur Außenlösung). Ruhemembranpotentiale glatter Muskelzellen wurden *in vitro* mit -60 bis -70 mV (Nelson *et al.*, 1990; Knot und Nelson, 1995; Xia *et al.*, 1995) und *in vivo* mit -40 bis -55 mV (Neild und Keef, 1985; Welsh und Segal, 1998; Bartlett *et al.*, 2000) gemessen. Dies zeigt, dass das Ruhemembranpotential zwischen E_K und E_{Cl} liegt, weil beide Kanäle in Ruhe die höchste Leitfähigkeit aufweisen und auf das Membranpotential einen größeren Einfluss haben als E_{Na} und E_{Ca} . Sowohl Endothelzellen als auch glatte Muskelzellen können hyperpolarisieren. Wie bereits erwähnt, beeinflusst in diesen Zellen vor allem die Öffnungswahrscheinlichkeit der K^+ -Kanäle das Membranpotential.

Ionenkanäle und K⁺-Kanäle

Durch zelluläre Lipidmembranen können vor allem Wasser, gelöste Gase wie O₂ und CO₂, lipidlösliche Stoffe, aber auch kleine polare Moleküle wie Ethanol und Harnstoff frei diffundieren. Damit geladene Moleküle und anorganische Ionen passieren können, besitzen Zellmembranen Ionenkanäle und Connexine (siehe unten). Ionenkanäle sind Poren, die von Proteinen gebildet werden, und einen mit Wasser gefüllten Kanal von weniger als 1 nm Durchmesser besitzen. Diese Membrankanäle weisen meist eine relativ hohe Selektivität hinsichtlich der Ionen auf, die sie durchtreten lassen. Es gibt z. B. Natrium-, Kalzium-, und Kalium-Kanäle. Um diese Selektivität zu erreichen, sind die Kanalwände mit Ladungen oder Bindungsstellen besetzt, die den Durchtritt für die permeierenden Moleküle erleichtern und andere Stoffe von der Permeation ausschließen. Ionenkanäle sind keine starren Röhren sondern hochdynamische, pulsierende Gebilde, dessen sich schnell bewegende Molekülgruppen und Ladungen über den offenen oder geschlossenen Zustand der Kanäle bestimmen.

K⁺-Kanäle sind wichtige Ionenkanäle in vaskulären Zellen. Ihre Aktivität trägt entscheidend zur Entstehung und Regulation des Membranpotentials und des Gefäßtonus bei. Bei den K⁺-Kanälen in vaskulärem Gewebe unterscheidet man vier Haupttypen: Kalzium-abhängige K⁺-Kanäle (K_{Ca}), spannungsabhängige K⁺-Kanäle (K_V, voltage), ATP-sensitive K⁺-Kanäle (K_{ATP}) und einwärts gleichrichtende K⁺-Kanäle (K_{IR}, inwardly rectifying). Bei den K_{Ca}-Kanälen wiederum unterscheidet man die verschiedenen Typen nach ihrer Leitfähigkeit für K⁺-Ionen: BK_{Ca} mit hoher Leitfähigkeit („large/big conductance“), IK_{Ca} mit mittlerer Leitfähigkeit („intermediate conductance“) und SK_{Ca} mit geringer Leitfähigkeit („small conductance“) (Jackson, 2000). Vorkommen und Verteilung dieser Kanäle in EC und VSM sind in verschiedenen Spezies und Gefäßen oft uneinheitlich (Nilius, 1997). So zeigten in situ Aufnahmen von Endothelzellen aus Ratten nur SK_{Ca}-Kanäle (Marchenko und Sage, 1996), während frisch isolierte Endothelzellen aus der Aorta von Hasen auch BK_{Ca}-Kanäle exprimierten (Rusko *et al.*, 1992). Die funktionelle Bedeutung der verschiedenen Kanäle für die EDHF-Dilatation kann durch selektive pharmakologische Blockade untersucht werden. Apamin blockiert selektiv SK_{Ca}-Kanäle, während Charybdotoxin IK_{Ca}⁻, BK_{Ca}⁻ und

K_V -Kanäle blockiert (Edwards und Weston, 2001). Zygmunt und Högestätt sowie Doughty *et al.* zeigten, dass EDHF-Antworten durch gleichzeitige Präsenz von Apamin und Charybdotoxin, aber nicht durch jedes Toxin alleine, blockiert werden können (Zygmunt und Högestätt, 1996; Doughty *et al.*, 1999). Dies lässt vermuten, dass nicht alle K_{Ca} blockiert werden müssen, um die Dilatation aufzuheben. In einigen Untersuchungen konnte jedoch auch Apamin alleine eine EDHF-Antwort aufheben (Yamakawa *et al.*, 1997; Ayajiki *et al.*, 2000; Murphy und Brayden 1995; Miura *et al.*, 1999; Gluais *et al.*, 2005). Iberiotoxin, ein selektiver Blocker von BK_{Ca} -Kanälen, kann in einigen Arteriolen selbst in Kombination mit Apamin ineffektiv bleiben, z. B. in Mesenterial-, Leber-, und Nierenarterien von Ratten und in Koronarien und Basilararterien von Meerschweinchen (Rapacon *et al.*, 1996; Petersson *et al.*, 1997; Plane *et al.*, 1997; Chataigneau *et al.*, 1998; Eckman *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 1998; Yamanaka *et al.*, 1998). Dies weist auf die Bedeutung des IK_{Ca} hin. Es gibt aber auch Ausnahmen von der Regel, nur SK_{Ca} - und IK_{Ca} -Kanäle seien an der EDH beteiligt. So zeigten Versuche in Nieren- und Femoralarterien von Hasen, dass Iberiotoxin auch alleine eine Relaxation vom EDHF-Typ blockieren konnte (Kwon *et al.*, 1999; Yousif *et al.*, 2002). Untersuchungen mit 1-EBIO, einem Aktivator von IK_{Ca} -Kanälen (und möglicherweise auch von SK_{Ca} -, aber nicht BK_{Ca} -Kanälen), der zu einer endothelialen Hyperpolarisation und einer endothelabhängigen Hyperpolarisation des glatten Muskels führt, haben ergeben, dass diese Hyperpolarisationen mit Charybdotoxin, nicht aber mit Iberiotoxin zu blockieren waren (Edwards *et al.*, 1999; Coleman *et al.*, 2001). Zusammengefasst zeigt die Mehrzahl der Untersuchungen, dass SK_{Ca} -Kanäle hauptsächlich in Endothelzellen vorkommen (Marchenko und Sage, 1996; Cai *et al.*, 1998; Burnham *et al.*, 2002), während BK_{Ca} - und IK_{Ca} -Kanäle vorzugsweise in glatten Muskelzellen nachzuweisen sind (Neylon *et al.*, 1999; Burnham *et al.*, 2002). Die funktionelle Bedeutung der verschiedenen K_{Ca} bei der EDHF-Dilatation ist stark variierend.

BK_{Ca} -Kanäle tragen in kleinen Arteriolen zum Ruhemembranpotential von glatten Muskelzellen bei. Ihre Blockade durch Iberiotoxin oder Tetraethylammonium-(TEA) Ionen führten zu Membrandepolarisation und Vasokonstriktion (Nelson *et al.*, 1990; 1995; Brayden und Nelson 1992). BK_{Ca} -

Kanäle werden durch einen Anstieg des intrazellulären Kalziums und durch Membrandepolarisation aktiviert. Da bei der Aktivierung hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel von 3 – 10 $\mu\text{mol/L}$ erforderlich sind (Jackson *et al.*, 1998), kommt den BK_{Ca} -Kanälen möglicherweise eine Rolle im Sinne einer negativen Rückkopplung zu, um aktive Vasokonstriktion zu limitieren und vor Vasospasmen zu schützen. Diese Hypothese wird durch Untersuchungen während chronischer Hypertension unterstützt, in denen eine vermehrte Expression von BK_{Ca} -Kanälen im glatten Muskel nachgewiesen werden konnte (Rusch *et al.*, 1992; Asano *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1997; Rusch *et al.*, 1997). Endotheliale IK_{Ca} - und SK_{Ca} -Kanäle werden ebenso durch die Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aktiviert, sind aber gänzlich spannungsunabhängig. Der Begriff „EDHF-vermittelte Antwort“ steht für einen Mechanismus, bei dem die beschriebene Hyperpolarisation von Endothelzellen auf glatte Muskelzellen übertragen wird. Dabei werden aktuell verschiedene Hypothesen diskutiert, bei denen prinzipiell zwischen einer elektronischen Signalübertragung *via* Gap Junctions und der Diffusion eines freien Mediators über den extrazellulären Raum unterschieden wird (Griffith, 2004). Einige Untersuchungen konnten zeigen, dass parallel zu endothelialen Hyperpolarisationen auch glattmuskuläre Hyperpolarisationen zu messen sind. Öffnen sich K^+ -Kanäle in der Membran glatter Muskelzellen, so strömt Kalium entlang seines Gradienten aus der Zelle und das Membranpotential wird negativer (Hyperpolarisation). Daraufhin schließen sich spannungsaktivierte L-Typ Ca^{2+} -Kanäle, das intrazelluläre Kalzium sinkt ab und eine Relaxation folgt. Umgekehrt führt ein Schließen der K^+ -Kanäle zu einer Depolarisation, einem Öffnen der spannungsaktivierten L-Typ Ca^{2+} -Kanäle und einem daraus resultierenden Anstieg des zytosolischen Kalziums, was zu einer Kontraktion des glatten Muskels führt (**Abbildung I.1**) (Nelson, 1990; Sobey, 2001).

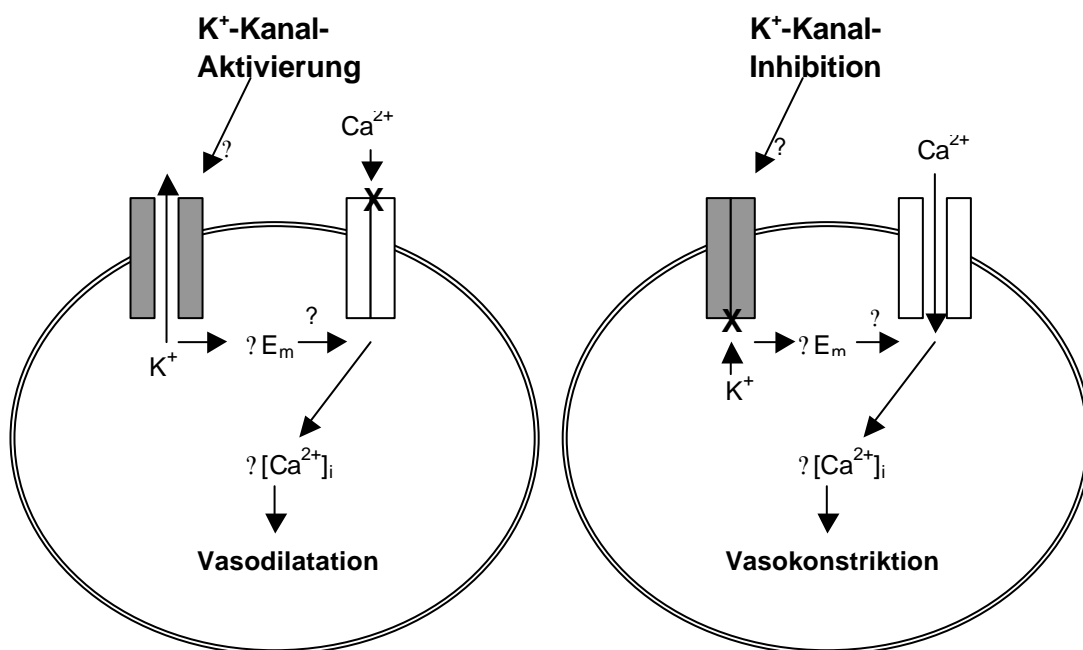


Abbildung I.1 Schematische Darstellung der Antwort glatter Muskelzellen nach Aktivierung (links) oder Inhibition (rechts) von K⁺-Kanälen

Links: Die Aktivierung (Öffnung) von K⁺-Kanälen (grau) führt zum Ausstrom von K⁺-Ionen, was zur Hyperpolarisation der Zelle führt. Daraufhin schließen sich spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle (weiß), der intrazelluläre Ca²⁺-Spiegel sinkt und der glatte Gefäßmuskel relaxiert (Vasodilatation).
Rechts: Im umgekehrten Fall führt ein Schließen der K⁺-Kanäle zu einer Reduktion des K⁺-Ausstroms mit konsekutiver Depolarisation. Spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle öffnen sich, die intrazelluläre $[Ca^{2+}]_i$ steigt an und es resultiert eine Kontraktion des glatten Muskels (Vasokonstriktion).

Agonisten, welche eine Relaxation vom EDHF-Typ auslösen, führen zu einem raschen Abfall des Membranpotentials in Endothelzellen in Richtung des K⁺-Gleichgewichtspotentials (ca. -80 mV), gefolgt von einer Plateauphase, in der das Membranpotential bis zu -20 mV unterhalb des Ausgangspotentials liegt und einer anschließend teilweise vorhandenen überschießenden Depolarisation (Mehrke und Daut, 1990; Marchenko und Sage, 1993; Ohashi *et al.*, 1999). Als Substanzen, die EDHF freisetzen und über eine Öffnung von K⁺-Kanälen zur Hyperpolarisation führen, werden unter anderem Acetylcholin und Bradykinin (Chen und Cheung, 1992; Nakashima *et al.*, 1993; Edwards *et al.*, 1998; 2000), EETs (Campbell *et al.*, 1996; Li und Campbell, 1997; Gebremedhin *et al.*, 1998) oder Substanz P (Bény und Brunet, 1988) diskutiert (**Abbildung I.2**). Es gibt zahlreiche Untersuchungen, die zeigen konnten, dass die Aktivierung

endothelialer K_{Ca} -Kanäle, die zur EDHF-vermittelten Relaxation führt, durch kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom ausgelöst wird (Doughty *et al.*, 1999; Dora *et al.*, 2001). Wurde dieser Signalweg durch Inhibitoren der Phospholipase C blockiert, konnten subintimale Hyperpolarisationen nach ACh in Mesenterialarterien von Ratten (Fukao *et al.*, 1997) und Relaxationen vom EDHF-Typ in Koronararterien von Schweinen, Mesenterialarterien von Hasen, Karotiden von Meerschweinchen und Cerebralarterien von Ratten abgeschwächt werden (Weintraub *et al.*, 1995; Hutcheson *et al.*, 1999; Quignard *et al.*, 2002; You *et al.*, 2002). Jedoch konnte in Cerebralarterien von Ratten auch gezeigt werden, dass der IK_{Ca} -Agonist 1-EBIO, der PLC-unabhängig wirkt, EDHF-Typ Relaxationen verursacht, ohne das endotheliale $[Ca^{2+}]_i$ über das Ruheniveau zu erhöhen (Quignard *et al.*, 2002; Marrelli *et al.*, 2003). In diesem Fall würde eine „EDHF-Synthase“ nicht durch einen intrazellulären $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg aktiviert werden, sondern über einen Ca^{2+} -unabhängigen Signalweg.

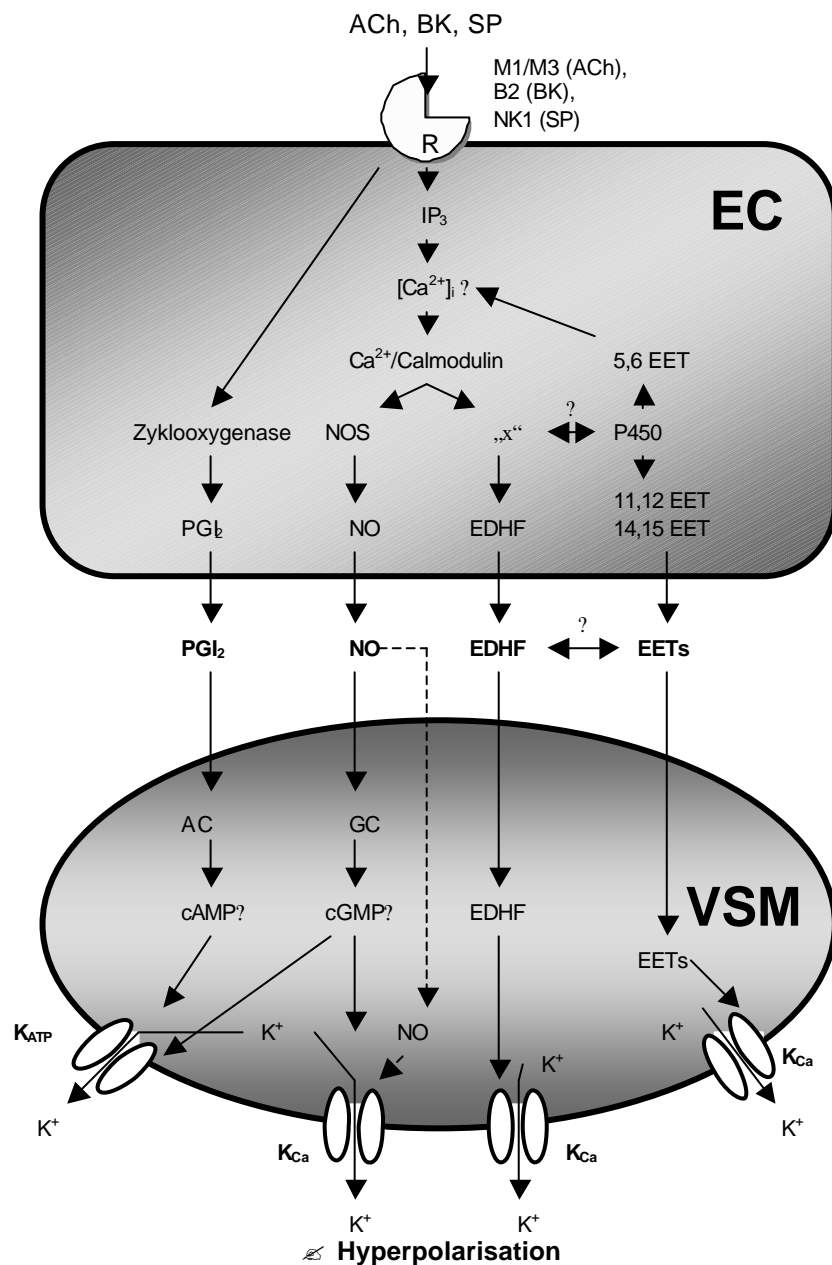


Abbildung I.2 Mögliche Signalwege der endothelvermittelten Hyperpolarisation

Illustriert sind Signalwege, die zur endothelvermittelten Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen führen. Der wichtigste Signaltransduktionsweg ist die EDHF-vermittelte Hyperpolarisation, auf die sich die vorliegende Arbeit konzentriert.

ACh: Acetylcholin; BK: Bradykinin; SP: Substanz P; M1 und M3: muskarinerge Rezeptoren; B₂: Bradykininrezeptor; NK1 Neurokininrezeptor; R: Rezeptor; NOS: NO-Synthase; P450: Cytochrom-P450-Monooxygenase; NO: Stickstoffmonoxid; PGI₂: Prostazyklin; EETs: Epoxyeicosatrien-Säuren; AC: Adenylatzyklase; GC: Guanylatzyklase; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat; IP₃: Inositoltrisphosphat; K_{Ca}: Kalzium-abhängige Kalium-Kanäle

Übertragbare EDHFs

Als vasoaktive Substanzen, die vom Endothel freigesetzt werden und über den extrazellulären Raum zu glatten Muskelzellen diffundieren und so zum EDHF-Phänomen beitragen, werden zur Zeit K^+ -Ionen, Arachidonsäurederivate (Eicosanoide und das Endocannabinoid Anandamid), H_2O_2 und C-Typ Natriuretisches Peptid diskutiert. Kontroversen bestehen hinsichtlich der Herkunft und der physiologischen Relevanz dieser Agenzien, insbesondere ob ihrer Fähigkeit die Öffnungswahrscheinlichkeit von glattmuskulären K_{Ca} -Kanälen in der EDHF-Antwort zu erhöhen.

K^+ -Ionen

Extrazelluläre K^+ -Ionen können Zellmembranen durch Öffnen von K_{IR} -Kanälen oder Stimulation von Na^+/K^+ -ATPase-Isoenzymen hyperpolarisieren (Blanco und Mercer, 1998; Zaritsky *et al.*, 2000; Weston *et al.*, 2002, Quilley und Qiu, 2005). Edwards *et al.* konnten in Mesenterialarterien von Ratten zeigen, dass nach Stimulation mit Acetylcholin (ACh) die extrazelluläre K^+ -Konzentration $[K^+]_e$ im „myoendothelialen Spalt“ durch Öffnung endothelialer K_{Ca} -Kanäle anstieg und über die oben genannten Mechanismen zur Hyperpolarisation und Relaxation der glatten Muskelzellen führte (Edwards *et al.*, 1998). Jedoch gibt es zahlreiche Untersuchungen, deren Ergebnisse gegen die Hypothese EDHF sei endotheliales K^+ sprechen. Deren Befunde konnten eine Abschwächung der ACh-induzierten EDHF-Antworten durch Ba^{2+} -Ionen (hemmen K_{IR} -Kanäle) und Ouabain (hemmt die Na^+/K^+ -ATPase) wie bei Edwards *et al.* nicht nachweisen (Doughty *et al.*, 2000; Coleman *et al.*, 2001a; Lacy *et al.*, 2000; McIntyre *et al.*, 2001). Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz sehen Dora und Garland sowie Richards *et al.* im Einfluss der glattmuskulären Aktivität auf die Fähigkeit endothelialer K^+ -Ionen als EDHF zu fungieren (Dora und Garland, 2001; Richards *et al.*, 2001). Demnach würde eine Vasokonstriktion durch hohe Agonistenkonzentrationen zu einer Depolarisation führen mit konsekutiver Verminderung von K^+ -Auswärtsströmen durch K_{IR} -Kanäle und Efflux von K^+ *via* glattmuskulärer K_{Ca} -Kanäle. Die dadurch entstehende extrazelluläre „ K^+ -Wolke“ würde dann eine Aktivierung der Na^+/K^+ -ATPase durch zusätzliche K^+ -Quellen maskieren bzw. behindern. Obwohl diese Hypothese einige Diskrepanzen erklären könnte, lassen auch elektrophysiologische Untersuchungen Zweifel an der Rolle von K^+ als

EDHF. In Mesenterialarteriolen von Meerschweinchen, in denen Endothelzellen und glatte Muskelzellen ein elektrisches Synzytium bilden, aktivierte exogenes K^+ einen „einwärtsgleichrichtenden“ Ba^{2+} -sensitiven Strom, während Acetylcholin oder Substanz P zu „auswärtsgleichrichtenden“ Strömen führte (Coleman *et al.*, 2001a,b). Dies zeigt, dass hier zwei grundsätzlich verschiedene Kanäle beteiligt sind und daher auch kein gemeinsamer „EDHF“ vorliegt.

EETs

Epoxyeicosatriensäuren (EETs) sind Produkte der Cytochrom P450 Epoxygenasen (CYP_{450}) aus Arachidonsäure und scheinen bei der Regulation der vaskulären Homöostase eine wichtige Rolle zu spielen (Fleming *et al.*, 2001). Endothelzellen können über CYP_{450} (hauptsächlich über die Subtypen CYP 1A, 2C und 2J) vier EET-Regioisomere synthetisieren (5,6-, 8,9-, 11,12-, und 14,15-EET). In Koronararterien von Rindern (Hecker *et al.*, 1994; Campbell *et al.*, 1996; Gauthier *et al.*, 2005), Schweinen (Popp *et al.*, 1996), Kaninchen (Widmann *et al.*, 1998) und Menschen (Quilley und McGiff, 2000) führten CYP_{450} -Inhibitoren (z.B. Sulfaphenazol, ODYA) zu einer Hemmung der EDHF-vermittelten Antwort. Durch Antisense-Oligonukleotide gegen $CYP_{450}2C$ konnten in Koronararteriolen von Schweinen und in Arteriolen von Hamstern endothelabhängige Hyperpolarisationen und Relaxationen des glatten Muskels blockiert werden (Fisslthaler *et al.*, 1999; Bolz *et al.*, 2000). Umgekehrt konnten Substanzen, die die CYP_{450} -Epoxygenasen hochregulieren (z.B. Nifedipin oder β -Naphthoflavone), EDHF-Antworten verstärken (Fisslthaler *et al.*, 1999; Gauthier *et al.*, 2002). Möglicherweise können EETs über spezielle Membranrezeptoren auf glatten Muskelzellen zu einer Öffnung von BK_{Ca} -Kanälen führen. Jedoch gibt es Zweifel daran, ob Endothelzellen in der Lage sind solch große Mengen an EETs zu synthetisieren, die für eine Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen notwendig sind (Fisslthaler *et al.*, 2000; Archer *et al.*, 2003). Weiterhin zeigten einige Untersuchungen, dass EETs den endothelialen Ca^{2+} -Influx modulieren und die Aktivierung endothelialer K^+ -Kanäle durch Erhöhung ihrer Ca^{2+} -Sensitivität erleichtern können (Li und Campbell, 1997; Baron *et al.*, 1997). Popp *et al.* konnten zeigen, dass EETs auch die interendotheliale Kommunikation über Gap Junctions modulieren können (Popp *et al.*, 2002). Schließlich gibt es Anhaltspunkte dafür, dass EETs die endotheliale Kopplung über eine Aktivierung

der Adenylatzyklase und der cAMP-Synthese steigern können (Li *et al.*, 1999; Node *et al.*, 2001). Auch bei den EETs gibt es zahlreiche Untersuchungen, die eine Beteiligung von EETs am EDHF-Phänomen widerlegen, da z. B. eine Blockierung der CYP₄₅₀-Epoxygenase keinen Effekt auf die EDHF-Antwort hatte (Zygmunt *et al.*, 1996; Drummond *et al.*, 2000; Quignard *et al.*, 2002; Koeppen *et al.*, 2004). Die Möglichkeit, dass EETs direkt als EDHF fungieren, scheint stark von Spezies und Gefäßbett abhängig zu sein. Die Mehrheit der Untersuchungen deutet darauf hin, dass EETs einen eher modulierenden Einfluss auf die endothelabhängige Hyperpolarisation haben.

Anandamid

N-Arachidonylethanolamid (Anandamid) ist ein weiteres Arachidonsäurederivat und gehört zu den endogenen Cannabinoiden. Einige Untersuchungen zeigten, dass Anandamid eine Hyperpolarisation und Relaxation von glatten Muskelzellen auslösen kann, die durch den BK_{Ca}-Kanalblocker Iberiotoxin aufgehoben werden konnten (Randall *et al.*, 1996; Deutsch *et al.*, 1997; Plane *et al.*, 1997). Möglicherweise kann Anandamid über endotheliale CB₂-Rezeptoren *via* IP₃ zu einem kapazitiven Ca²⁺-Eintritt führen (Zoratti *et al.*, 2003). Es wurde jedoch bald gezeigt, dass Anandamid wahrscheinlich kein relevanter Teilnehmer an einer endothelvermittelten Hyperpolarisation ist, denn in weiteren Untersuchungen in hepatischen Arterien von Ratten, in denen das Endothel entfernt wurde, zeigte sich nach Anandamid eine Relaxation der glatten Muskelzellen ohne Hyperpolarisation (Zygmunt *et al.*, 1997; Chataigneau *et al.*, 1998b). Auch *in vivo* führten in Experimenten mit Hasen CB₁-Rezeptor-Agonisten zu keiner EDHF-Antwort, nachdem die NO-Synthase und Zyklooxygenase gehemmt waren (Niederhoffer und Szabo, 1999).

H₂O₂

Wasserstoffperoxyd (H₂O₂) wird als ein möglicher EDHF postuliert (Shimokawa und Morikawa, 2005). In isolierten Mesenterialarterien von Menschen und Mäusen waren NO- und Prostaglandin-unabhängige Hyperpolarisation nach ACh-Stimulation abgeschwächt, nachdem Katalase, ein H₂O₂ spaltendes Enzym, zugegeben wurde (Matoba *et al.*, 2000; 2002; Rabelo *et al.*, 2003, Fujiki *et al.*, 2005). Katalase konnte auch EDHF-Typ Relaxationen

durch Bradykinin und ein Zytokin in Mesenterialarterien von Ratten und Piaarterien von Schweinen abschwächen (Kimura *et al.*, 2002; Lacza *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu zeigte Katalase in humanen Radialarterien keine Abschwächung der ACh-Antwort (Hamilton *et al.*, 2001) ebenso wenig wie in Koronararterien von Schweinen, Gefäßen im Auge von Rindern, sowie Mesenterialarterien von Ratten und Mäusen (Bény und von der Weid, 1991; Pomposiello *et al.*, 1999; Brandes *et al.*, 2000; McNeish *et al.*, 2002). Die Beispiele zeigen, dass die Wirkung von H_2O_2 sehr stark gefäß- und speziesabhängig ist. Auch bei H_2O_2 gibt es Hinweise dafür, dass eine direkte Hyperpolarisation und Relaxation des glatten Muskels nur mit „supraphysiologisch“ hohen Konzentrationen ausgelöst wird (Gao *et al.*, 2003; Hattori *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2003). In Arterien von Hasen kommt dem H_2O_2 eher eine Funktion als „relaxing factor“ zu, weil es dort die Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktile Apparates beeinflusst ohne eine Hyperpolarisation zu verursachen (Chaytor *et al.*, 2003; Itoh *et al.*, 2003). Die endogene Herkunft von H_2O_2 wird kontrovers diskutiert. Es wurden Vorschläge gemacht, H_2O_2 stamme aus umgewandelten Superoxid-Anionen der eNOS (Matoba *et al.*, 2000), aus Komplex I der mitochondrialen Elektronentransportkette (Liu *et al.*, 2003) oder aus der Xanthin-Oxidase (McNally *et al.*, 2003).

CNP

Endothelzellen sind in der Lage G-Typ Natriuretisches Peptid (CNP) zu synthetisieren und zu speichern. Dieses ist strukturell verwandt mit den natriuretischen Peptiden ANP („atrial natriuretic peptide“) und BNP („brain natriuretic peptide“). CNP kann durch endothelabhängige Agonisten wie Acetylcholin oder Bradykinin freigesetzt werden und über spezifische Rezeptoren (NPR) auf glatten Muskelzellen deren Tonus modulieren (Wennberg *et al.*, 1999). Der NPR-B Subtyp ist mit einer Guanylatzyklase gekoppelt und kann nach Stimulation über einen NO-unabhängigen Weg cGMP-Spiegel erhöhen und zu einer Relaxation führen (Tao *et al.*, 1995; Mori *et al.*, 1997; Barber *et al.*, 1998). Über cGMP-abhängige Phosphorylierung von K_{Ca} - und K_{ATP} -Kanälen könnte CNP als EDHF fungieren (Barber *et al.*, 1998; Honing *et al.*, 2001; Ahluwalia *et al.*, 2005). Chauhan *et al.* konnten in Mesenterialarterien von Ratten zeigen, dass CNP über einen NPR-C Rezeptor auch K_{IR} -Kanäle öffnen kann. Letztendlich ist

die Datenlage jedoch derzeit noch zu gering, um CNP abschließend als einen EDHF bezeichnen zu können (Chauhan *et al.*, 2003).

Gap Junctions

Lokal ausgelöste Vasodilatationen und –konstriktionen nach bestimmten Stimuli bleiben nicht auf den Stimulationsort begrenzt, sondern breiten sich entlang des Gefäßes mit hoher Geschwindigkeit aus. Dies ist mit der Ausbreitung eines elektrischen Signals (elektrotonische Membranpotentialänderung) vereinbar (Segal *et al.*, 1989). Dieser Ausbreitung kommt eine außerordentlich wichtige Rolle bei der Koordinierung des Gefäßverhaltens in der Mikrozirkulation zu und beruht auf der interzellulären Kommunikation durch Gap Junctions (Kontaktzone, Nexus). Sie bestehen aus zwei Halbkanälen (Connexone), die wiederum aus sechs Proteinuntereinheiten (Connexine, Cx) aufgebaut sind (Kumar und Gilula, 1996). In homotypischen Gap Junctions besteht jedes Connexon aus denselben Connexin-Subtypen, während in heterotypischen Gap Junctions die Connexone aus zwei unterschiedlichen Connexin-Subtypen zusammengesetzt sind. Enthalten die Connexone eine Mischung aus verschiedenen Connexinen, so wird die Gap Junction als heteromer klassifiziert. Connexine (Cx) werden nach ihrem Molekulargewicht eingeteilt (z.B. Cx32 mit einem Molekulargewicht von 32 kDa). Gap Junctions ermöglichen die interzelluläre passive Diffusion von Ionen, H₂O, hydrophilen Metaboliten und Signalmolekülen mit einem Durchmesser bis 1,5 nm und einer molekularen Masse bis 1 kDa. Weiterhin lassen sie Ionen hindurchtreten, die sich dann entsprechend der elektrochemischen Gradienten verteilen und so elektrische Impulse weitergeben (Simpson *et al.*, 1977; Kumar und Gilula, 1996; Alexander und Goldberg, 2003). Dass Zellen auf diese Weise miteinander kommunizieren, wurde erstmals 1959 gezeigt (Furspan und Potter, 1959). Heute sind im Genom von Mäusen 20 und im menschlichen Genom 21 verschiedene Connexin-Gene bekannt (Sohl und Willecke, 2004). In Gefäßen von Säugetieren kommen die vier „kardiovaskulären“ Connexine Cx37, Cx40, Cx43 und Cx45 vor. Davon exprimieren Endothelzellen hauptsächlich Cx37, Cx40 und teilweise auch Cx43. In glatten Muskelzellen dominieren Cx43 und Cx45, manche Gefäße zeigen in diesen Zellen aber auch Cx37 und Cx40 (Haeflinger *et al.*, 2004). Gap Junctions aggregieren zu so genannten „Plaques“ die fokale *Cluster* von bis zu mehreren hundert

Connexinkanälen beinhalten (Spagnoli *et al.*, 1982; Sandow *et al.*, 2000). Gap Junctions durchlaufen einen raschen Zyklus zwischen Auf- und Abbau. So konnten Laird *et al.* darstellen, dass Cx32 und Cx43 *in vivo* eine Halbwertszeit von nur 1,5 – 3,5 Stunden haben (Laird *et al.*, 1995).

Gap Junctions können Endothelzellen oder glatte Muskelzellen nicht nur homozellulär (zwischen zwei Endothelzellen oder zwischen zwei glatten Muskelzellen) sondern auch heterozellulär, also myoendothelial (zwischen einer Endothelzelle und einer glatten Muskelzelle) koppeln. (Christ *et al.*, 1996; Chaytor *et al.*, 2005). Einige Untersuchungen konnten zeigen, dass sich EDHF-induzierte Hyperpolarisationen in glatten Muskelzellen zeitgleich in Endothelzellen ausbreiteten und führten zu der Schlussfolgerung, dass die Zellen durch myoendotheliale Gap Junctions elektrisch gekoppelt sind und ein funktionelles Synzytium bilden (Bény 1990; Yamamoto *et al.*, 1999; Coleman *et al.*, 2001b). Emerson und Segal konnten in Arteriolen von Hamstern zeigen, dass sich Hyperpolarisationen bidirektional zwischen Intima und Media ausbreiten und sich so eine Hyperpolarisation einer Endothelzelle entlang eines Gefäßabschnittes ausbreitet und zu einer Relaxation des glatten Muskels führt (Emerson und Segal, 2000; 2001). In Mesenterialarteriolen von Meerschweinchen wurde jedoch ein Verlust der Amplitude von 10 – 20 % beim Übertritt zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen in beiden Richtungen gemessen, was zu der Annahme führt, dass sich myoendotheliale Gap Junctions wie ein ohmscher Widerstand verhalten (Yamamoto *et al.*, 2001). Aktuell wird eher die Hypothese favorisiert, dass Gap Junctions über die Ausbreitung elektrischen Stroms am EDHF-Phänomen beteiligt sind, als über die Weiterleitung von Signalmolekülen. Es gibt Hinweise dafür, dass cAMP an der Regulierung von Gap Junctions beteiligt ist (Popp *et al.*, 2002).

Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten Membranpotentialänderungen in Endothelzellen und glatten Muskelzellen und die zu Grunde liegenden Mechanismen untersucht werden. Das Membranpotential spielt eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle des Gefäßtonus und stellt neben Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandinen einen wichtigen Mechanismus der endothelabhängigen

Tonusregulation dar. Da Untersuchungen *in vitro* nicht alle natürlichen Faktoren, die das Membranpotential beeinflussen, berücksichtigen können, wurde eine Methode entwickelt um Membranpotentialmessungen *in vivo* durchzuführen. Mittels Mikroelektroden und unter intravitalmikroskopischer Beobachtung konnte das Membranpotential in Zellen der Gefäßwand der freigelegten Skelettmuskulatur von Mäusen registriert werden. Zunächst sollte gezeigt werden, dass eine intravitale Membranpotentialmessung reliabel durchführbar ist. Neben der Messung der Membranpotentiale von Endothelzellen und glatten Muskelzellen in Ruhe sollte im Weiteren Membranpotentialänderungen nach Stimulation mit Acetylcholin untersucht werden. Kalium-Kanäle spielen eine zentrale Rolle bei der Änderung des Membranpotentials von Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Um die Rolle der beteiligten Kalzium-abhängigen Kalium-Kanäle zu studieren, wurde der Effekt verschiedener K_{Ca} -Blocker auf die ACh-Hyperpolarisation untersucht. Schließlich sollte die Ausbreitung von Hyperpolarisationen, die eine Koordination der Vasodilatation im Gefäßbaum ermöglicht und möglicherweise auf einer elektrotonischen Fortleitung des Signals über Gap Junctions beruht, untersucht werden. Hierzu wurde das endotheliale und glattmuskuläre Membranpotential in verschiedenen Entfernungen von der Stimulationsstelle registriert.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden ausschließlich männliche Mäuse verwendet. Diese wurden in der eigenen Tierhaltung des Institutes gezüchtet und in Makrolon-Käfigen, Typ 2, in Gruppen bis zu je 6 Tieren aufgezogen. Die Tiere hatten freien Zugang zu Standardfutter und Trinkwasser. Das Alter der Tiere zum Versuchszeitpunkt lag zwischen 2 und 7 Monaten, ihr Gewicht variierte zwischen 19 und 42 g. Alle Versuche wurden durch die Regierung Oberbayern genehmigt (AZ 211-2531-12/99) und erfüllten die Vorschriften des Deutschen Tierschutzgesetzes.

Insgesamt wurden 128 Tiere untersucht. Hiervon war eine Reihe von Versuchen notwendig um die Messung zu etablieren. In die Auswertung der Daten wurden 45 Versuchstiere einbezogen. Der Großteil (43 Tiere) kam aus einem Mausstamm von C57BL/6 Tieren. 2 Tiere waren homozygot defizient für die endotheliale NO-Synthase (eNOS^{-/-}) und wurden freundlicherweise von Prof. A. Gödecke, Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Narkotika

Die Narkose wurde mit den Substanzen Fentanyl (Fentanyl-0,5mg-Curamed[®]) von der Firma Cura-Med, Karlsruhe, Midazolam (Midazolam-ratiopharm[®]) von der Firma Ratiopharm GmbH, Ulm und Medetomidin (Domitor[®]) von der Firma Pfizer, Karlsruhe, durchgeführt. Isotonische Natriumchloridlösung wurde von der Firma Delta Pharma, Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, geliefert. Zur Euthanasie der Tiere wurde Pentobarbital (Narcoren[®]) von der Firma Merial GmbH, Hallbergmoos, eingesetzt.

2.1.3 Substanzen zur lokalen Applikation

Carboxyfluorescein zum Färben der Gefäßzellen, sowie Acetylcholin (ACh) und Nitroprussid-Natrium (sodium-nitroprusside, SNP) für die Stimulation der Arteriolen, wurden von der Firma Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, bezogen. Während Carboxyfluorescein in 3 mol/L KCl gelöst wurde, wurde ACh in H₂O gelöst. Nitroprussid-Natrium wurde in 1 mmol/L Natrium-Acetat-Lösung (10 mmol/L) gelöst. Charybdotoxin, Iberiotoxin und Apamin, zur Blockade von K_{Ca}-Kanälen, lieferte die Firma Bachem AG, Bubendorf, Schweiz.

2.1.4 Substanzen für die Superfusionslösung

Für die Superfusion des Cremastermuskels wurde eine Krebs-Pufferlösung mit folgenden Bestandteilen hergestellt:

Na ⁺	143	mmol/L
Cl ⁻	128	mmol/L
K ⁺	6	mmol/L
HCO ₃ ⁻	16	mmol/L
Ca ²⁺	2,5	mmol/L
Mg ²⁺	1,2	mmol/L
H ₂ PO ₄ ⁻	1,2	mmol/L
SO ₄ ²⁻	1,2	mmol/L

Für die Herstellung der Lösung wurden die Salze NaCl, KCl, MgSO₄, NaHCO₃, KH₂PO₄ und CaCl₂ der Firma Merck, Darmstadt, in entionisiertem Wasser (Millipore, Billerica, USA) gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit einem Gemisch aus 95% Stickstoff (N₂) und 5% Kohlendioxid (CO₂) der Firma Linde, München, begast.

2.1.5 Sonstige Materialien

Stimulationspipetten und Mikroelektroden wurden mit einem Glaspipettenpuller (P-2000, Sutter Instrument Company, Novato, California, USA) aus filamenthaltigen Borosilikatglaskapillaren (GB-100F, Länge 10cm, ID: 0,58

mm; AD: 1,0 mm) der Firma Science Products GmbH, Hofheim, hergestellt. Diese wurden mittels Mikrolader (Eppendorf, Hamburg) mit den verschiedenen Substanzen befüllt. Als Transportmedium für die Druckpulsapplikation der Substanzen in den Mikropipetten wurde Stickstoff (N₂) der Firma Linde, München, verwendet. Für die Katheterisierung der V. jugularis und A. carotis wurden Polyethylenkatheter vom Typ PE 10 (ID: 0,28 mm; AD: 0,61 mm) und PE 50 (ID: 0,5 mm; AD: 1,0 mm) von der Firma Schubert, München, geliefert. Diese Firma lieferte auch die Polyethylenkatheter (ID: 0,86 mm; AD: 1,27 mm) aus denen der Tubus für die Trachea gefertigt wurde. Das chirurgische Nahtmaterial für die Präparation des M. Cremaster (atraumatischer monofiler Polypropylenfaden 6/0, Prolene[®]) lieferte die Firma Ethicon, Hamburg.

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsvorbereitung

2.2.1.1 Anästhesie

Die Tiere wurden initial durch eine intraperitoneale Injektion von Medetomidin (0,2 mg/kg, α_2 -Agonist), Midazolam (1,8 mg/kg, Benzodiazepin) und Fentanyl (0,2 mg/kg, Opiat) anästhesiert. Das Toleranzstadium wurde nach ca. 10 Minuten erreicht. Nachdem in der darauf folgenden Präparation die rechte V. jugularis kanüliert war, wurde über diesen Zugang die Narkose während des gesamten Versuches aufrechterhalten. Dazu wurden die Substanzen Medetomidin (0,008 mg/h), Midazolam (0,072 mg/h) und Fentanyl (0,008 mg/h) mittels einer Infusionspumpe (Typ 540101, Technical und Scientific Equipment GmbH, Bad Homburg) infundiert. Die Tiefe der Narkose wurde während der gesamten Versuchsdauer in regelmäßigen Abständen anhand des arteriellen Mitteldruckes, der Herzfrequenz und der Reaktion auf mechanische Reize (Drücken der Pfoten mit einer Pinzette) überprüft. Die Infusionsgeschwindigkeit der Anästhetika wurde dann ggf. angepasst. Nach Beendigung des Versuches wurden die Tiere durch eine intrakardiale Injektion von 0,25 ml Pentobarbital (16mg/100ml) euthanasiert.

2.2.1.2 Intubation der Trachea

Zunächst wurde das Tier in der Hals- und Thoraxregion sowie in der Inguinal- und Genitalregion mit einem Tierhaarrasiergerät rasiert. Über einen medianen Hautschnitt am Hals des Tieres wurde die Trachea dargestellt und mit zwei Baumwollfäden aufgespannt. Dann wurde sie mit einer Schere zwischen zwei Knorpelspangen im oberen Drittel inzidiert und ein etwa 2 cm langer Polyethylenschlauch als Tubus eingeführt, der mit den beiden Fäden fixiert wurde. Der Tubus sicherte die Spontanatmung der Maus und verhinderte eine Verlegung der Atemwege. Außerdem konnte das Tier über den Tubus mit einer Beatmungsmaschine (7025 Rodent Ventilator, Hugo Sachs Elektronik, Freiburg) mit einer Atemfrequenz von 120 - 130 Zügen pro Minute und einem Beatmungsdruck von 3 - 6 cm H₂O mechanisch ventiliert werden. Die mechanische Beatmung hatte zwei wesentliche Vorteile: Erstens konnte das Tier bei einer auftretenden Ateminsuffizienz maschinell beatmet werden und zweitens eine evtl. vorhandene Übertragung ausgeprägter Bewegungen durch tiefe Spontanatmung auf das Cremasterpräparat verringert werden.

2.2.1.3 Katheterisierung von V. jugularis und A. carotis

Über denselben Zugang am Hals wurde die rechte V. jugularis dargestellt und freigelegt. Nach Inzision wurde sie mit einem Polyethylenschlauch (PE 10), der mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gefüllt war, katheterisiert (**Abbildung 2.1**). Die korrekte Lage wurde durch eine Aspiration von Blut überprüft und der Katheter mit drei Baumwollfäden festgeknotet. Nun wurde der venöse Katheter mit dem Infusionsgerät verbunden und darüber die Narkotika appliziert.

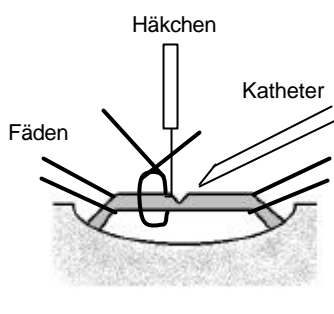


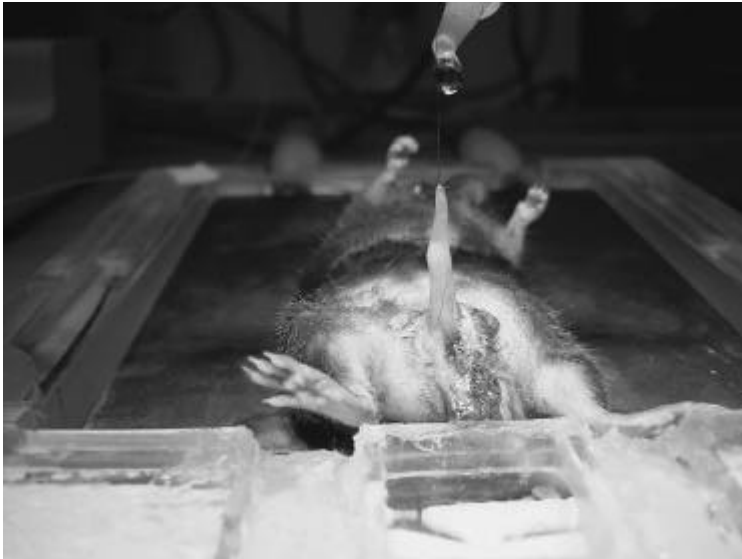
Abbildung 2.1 Hals mit Gefäß, seitliche Ansicht

Das Schema zeigt den Vorgang der Kanülierung eines Halsgefäßes. Mit einer Mikroschere wurde im oberen Drittel des mit Fäden aufgespannten Gefäßes eingeschnitten. Dann wurde die Gefäßwand mit einem Häkchen angehoben und der Katheter in das Gefäß vorgeschoben. Anschließend wurde der Katheter mit den Fäden fixiert.

Bei einigen Tieren wurde auch die rechte A. carotis freipräpariert und kanüliert. Der arterielle Katheter, gefüllt mit 0,9 %iger NaCl-Lösung, wurde mit einem Druckaufnehmer (Bell und Howell, Pasadena, California, USA) verbunden. Durch Lagerung auf einer heizbaren Platte (Werkstatt des Institutes) wurde die Körpertemperatur der Maus bei ca. 36° - 37°C konstant gehalten und mit einer Temperatursonde (GTH 1150, Greisinger Elektronik, Regenstauf) kontrolliert.

2.2.1.4 Präparation des M. cremaster

Die Präparation des Cremastermuskels zur Intravitalmikroskopie wurde nach der von Baez beschriebenen Methode (Baez, 1973) mit geringfügigen Modifikationen durchgeführt. Hierzu wurde das Versuchstier rücklings auf eine für die Intravitalmikroskopie angefertigte Plexiglasplatte mit Heizelement (Mikroskopierbühne, Werkstatt des Instituts) gelegt. Zunächst wurde das rasierte rechte Skrotum an seiner Apex mit einem kleinen Schnitt eröffnet und dieser anschließend nach kranial paramedian rechts bis in die Inguinalregion verlängert. Ab dem Zeitpunkt der Skrotumeröffnung wurde der Cremastermuskel kontinuierlich mit 37°C warmer Krebs-Pufferlösung (**Abschnitt 2.1.4**) superfundiert um eine Austrocknung des Muskels während der Präparation zu verhindern. Jetzt wurde die Spitze des rechten M. cremaster mit chirurgischem Nahtmaterial fixiert, vertikal aufgespannt und das ihn umgebende Bindegewebe vorsichtig entfernt (**Abbildung 2.2**).

**Abbildung 2.2 Präparation des M. cremaster I**

Der Cremastermuskel wurde an seiner Apex kurzzeitig vertikal aufgespannt und das ihn umhüllende Bindegewebe entfernt. Am oberen Bildrand sieht man die Applikation der Superfusionslösung.

Anschließend wurde der Muskelsack vertikal zwischen den Hinterbeinen der Maus über ein Deckglas am Ende der Platte gezogen und an einem Silikonring mit dem Faden fixiert. Danach wurde der Muskel von seinem Pol bis zur Basis ventromedial eröffnet. Die Seitenränder wurden mit je zwei bis drei Einzelnähten am Silikonring befestigt, so dass der Muskel flach über dem Deckglas zu liegen kam (**Abbildung 2.3**). Die bindegewebige Verbindung zwischen Nebenhoden, Hoden und Cremastermuskel wurde durchtrennt und Hoden mit Nebenhoden in die Bauchhöhle zurückgeschoben. Dabei wurden sichtbare Gefäße geschont. Hierdurch wurde das beobachtbare Feld im Muskel vergrößert und die Erreichbarkeit des Präparats mit Mikropipetten erleichtert. Anschließend wurden zwei zusätzliche Einzelknopfnähte jeweils links und rechts von der Basis des Muskels gesetzt und am Silikonring fixiert (Zügelung). Distal dieser Nähte wurde der Cremastermuskel von beiden Seiten nach medial bis kurz vor die ihn versorgenden Blutgefäße eingeschnitten. Wurden diese beiden Einzelknopfnähte nun unter Zugspannung genommen, wurde eine Übertragung der Atembewegung auf das zu untersuchende Präparat verhindert.

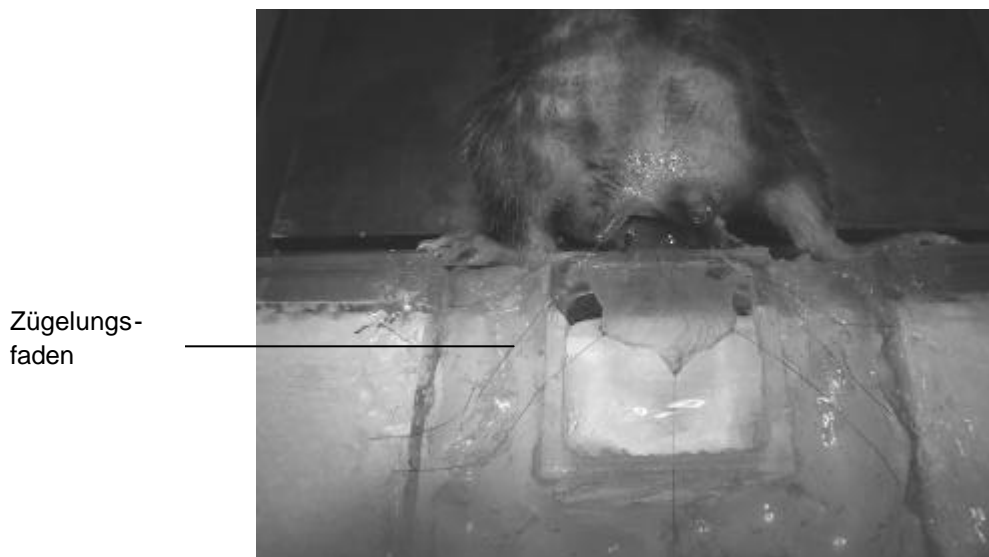
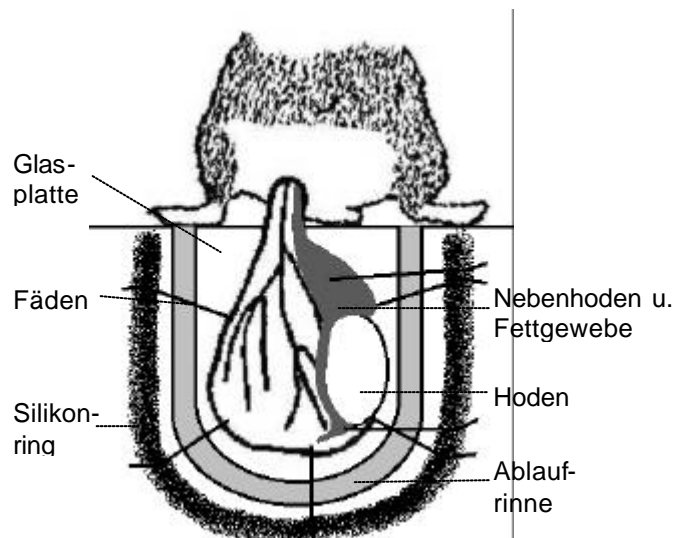


Abbildung 2.3 Präparation des M. cremaster II

Skizze: Der M. cremaster wurde locker über dem Deckglas aufgespannt und mit Einzelknopfnähten am Silikonring fixiert.

Originalbild: Hoden, Nebenhoden und Fettgewebe wurden wieder in die Bauchhöhle zurückgeschoben. Zusätzlich wurden zwei Zügelungsfäden angebracht, um die Bewegungsübertragungen der Atemexkursionen zu verhindern (**Abschnitt 2.2.3**).

Unter einem Präparationsmikroskop (Typ 778293, Leitz, Wetzlar) mit 25-facher Vergrößerung wurden 2 - 4 Arteriolen vorsichtig über eine Länge von einigen Millimetern mit einer Mikroschere von der umgebenden Skelettmuskulatur abgesetzt (**Abbildung 2.4**). Zuletzt wurde der präparierte Muskel auf evtl. vorhandene Blutungen untersucht. Am Rand des Präparats auftretende

Blutungen wurden mit einem LötKolben (Ersa®, Sprint 860, München) kauterisiert.

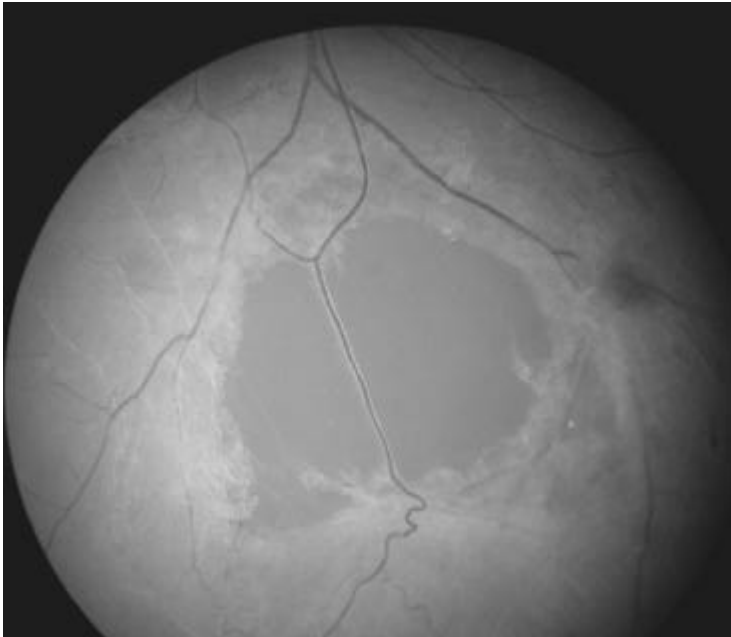


Abbildung 2.4 Isolierung einer Arteriole

Abgebildet ist ein Ausschnitt aus der Cremastermikrozirkulation unter einem Präparationsmikroskop. Bei 25-facher Vergrößerung wurde eine Arteriole (ca. 50µm Durchmesser) auf einer Länge von ca. 2 mm von der umgebenden Skelettmuskulatur abgesetzt. Dies ermöglichte einen ungehinderten Zugang zu den Gefäßzellen mit der Mikroelektrode.

2.2.2 Apparativer Versuchsaufbau

2.2.2.1 Messung von Blutdruck und Herzfrequenz

Über den arteriellen Katheter konnte der mittlere arterielle Druck und die Herzfrequenz der Tiere während eines Versuches gemessen werden. Dazu wurde der Katheter mit einem Druckaufnehmer (Bell & Howell, Pasadena, California, USA) verbunden. Das umgewandelte elektronische Signal wurde digital verstärkt (Elektronikwerkstatt des Institutes) und der arterielle Druck konnte abgelesen werden. Das Signal wurde über ein Oszilloskop (Digitale Storage Oscilloscope OS4000, Gould Advance, Hainault, Essex, England) dargestellt und die Pulsationen dort beobachtet. Der arterielle Mitteldruck bewegte sich in einem Bereich von 60 – 90 mmHg, die Herzfrequenz lag bei 250 – 300 Schlägen/min. Die Messung des arteriellen Mitteldrucks sowie der Herzfrequenz diente in erster Linie der Narkoseüberwachung. Die Daten wurden in dieser Arbeit nicht weiter ausgewertet.

2.2.2.2 Intravitalmikroskopie

Wie bereits bei der Präparation, wurde der Cremastermuskel auch während der gesamten Dauer des Versuches mit Krebs-Pufferlösung superfundiert. Die Pufferlösung befand sich in einem Vorratsgefäß, welches über ein Ausgleichsrohr eine freie Verbindung zur Umgebung besaß, wodurch das Volumen der austretenden Krebs-Lösung durch Raumluft ersetzt wurde. In einem zweiten doppelwandigen Gefäß zwischen Vorratsgefäß und Präparat wurde die Pufferlösung erwärmt und über eine Glasfritte mit einem Gasgemisch (95% N_2 und 5% CO_2) equilibriert. Hierdurch wurde bei der vorhandenen Bikarbonatkonzentration ein pH-Wert von 7,40 erreicht. Der Flüssigkeitsspiegel in diesem Gefäß wurde während der gesamten Versuchsdauer durch das Ausgleichsrohr im Vorratsgefäß auf einem konstanten Niveau gehalten. Das Niveau wurde durch die Höhe der unteren Öffnung des Ausgleichsrohres bestimmt. Hierdurch wurde gewährleistet, dass ein konstanter Perfusionsdruck herrschte und eine konstante Fließgeschwindigkeit eingestellt werden konnte. Das genaue Fließvolumen wurde durch einen Drehregler im nachfolgenden Schlauch auf 8 ml/min eingestellt. Zusätzlich wurde die Superfusionslösung in einem nachgeschalteten Durchlauferwärmer angewärmt, so dass die Lösung bei Erreichen des Präparates eine Temperatur von 36°C aufwies (**Abbildung 2.5**). Die ummantelten Glasgefäße wurden von einem Wärmebad (Haake FE, Haake, Karlsruhe) mit Umwälzpumpe aus beheizt. Der O_2 -Partialdruck der Superfusion auf dem Präparat betrug 30 mmHg. Diese Kontamination mit O_2 ist bedingt durch die umgebende Raumluft und die Verwendung von gasdurchlässigen Schläuchen im Superfusionssystem kurz vor dem Präparat.

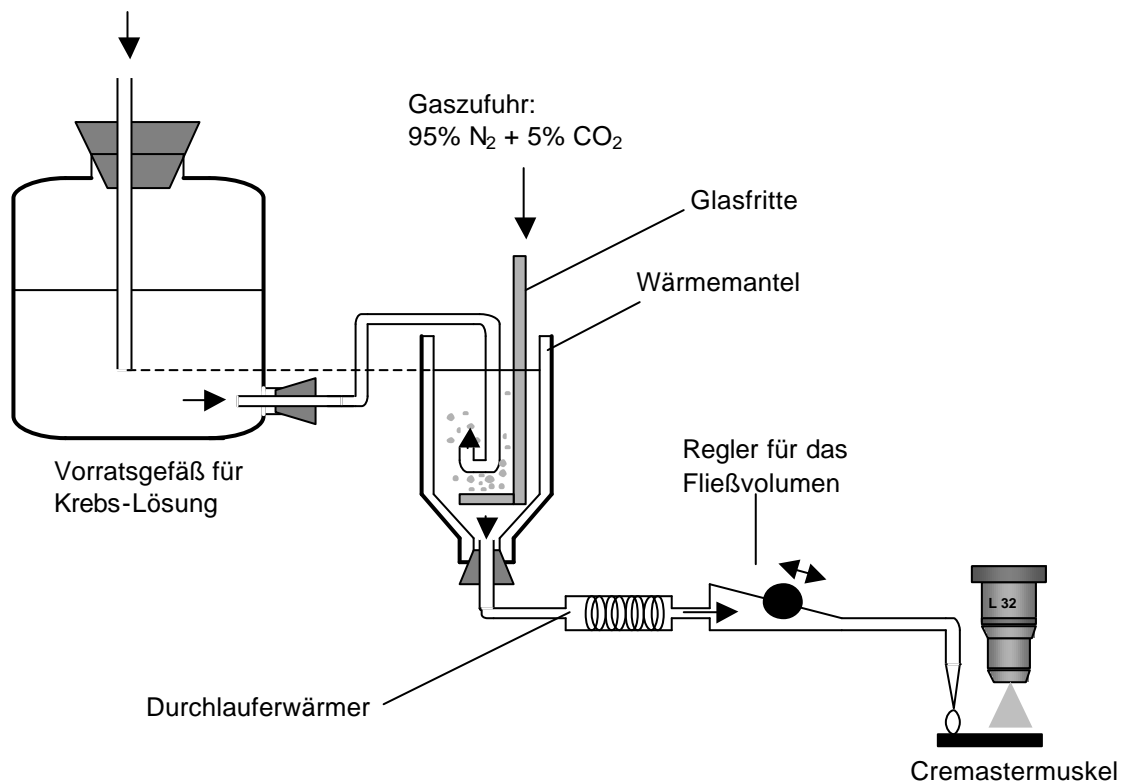


Abbildung 2.5 Superfusionssystem der Intravitalmikroskopie

Das Schema zeigt vereinfacht das Prinzip des Superfusionssystems, das während der Intravitalmikroskopie verwendet wurde. Die Superfusion verhinderte ein Austrocknen und Auskühlen des Cremastermuskels und ermöglichte zugleich das Mikroskopieren mit der Immersionstechnik. Aus dem Vorratsgefäß wurde die Krebs-Lösung in ein zweites Gefäß geleitet, wo es mit einem Gasmischgas equilibriert wurde, um den pH-Wert konstant bei 7,40 zu halten und einen niedrigen O₂-Gehalt zu erreichen. Durch den Wärmemantel um das zweite Gefäß und den Durchlauferwärmer konnte die Lösung mit einer Temperatur von 36°C über das Präparat träufeln. Über einen vorgeschalteten Infusionsregler wurde die Menge der Superfusion konstant auf 8 ml/min eingestellt.

Die Mikrozirkulation des M. cremaster wurde mit einem binokularen Durchlichtmikroskop (ZEISS Axioskop ZFS, Zeiss, Jena) beobachtet. Dieses Mikroskop besitzt eine fixierte Arbeitsplattform („fixed stage“, FS). Die Mikroskopierbühne mit dem Versuchstier, die Messelektrode und die Glaspipetten zur Substanzapplikation sind über Stative fest mit dem ruhenden Tisch verbunden, während das Mikroskop auf einer beweglichen Bühne (Luigs & Neumann, Ratingen) steht. Zur Durchmusterung des Präparats wird hierbei nicht wie normalerweise üblich das Objekt, sondern das Mikroskop verschoben. Somit bleibt die Position des Präparats, der Messelektrode und der Glaspipetten zueinander bei Beobachtung verschiedener Positionen im Präparat unverändert. Dieses Vorgehen ist eine unabdingbare Voraussetzung für elektrophysiologische

Messungen, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde. Zur Beobachtung wurden Wasserimmersionsobjektive mit einem weiten Arbeitsabstand mit einer 10-fachen (numerische Apertur: 0,3) bzw. einer 40-fachen Vergrößerung (numerische Apertur: 0,8) verwendet. Der Kondensor hatte ebenfalls einen weiten Arbeitsabstand und wies eine Apertur von 0,32 auf. Die verwendeten Okulare hatten eine 10-fache Vergrößerung. Zur Durchlichtmikroskopie wurde eine Halogenleuchte mit 100 W verwendet. Zusätzlich bot das Mikroskop die Möglichkeit zur Fluoreszenzmikroskopie. Hierbei wurde eine Quecksilberlampe (Typ HBO 100 Watt, Osram, München) und ein Filtersatz zur Beobachtung von Fluoreszenz mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm (Filtersatz Nr. 9, ZEISS) verwendet. Hierdurch konnten mit Fluoreszenzfarbstoff beladene Zellen identifiziert werden. Das Bild wurde über eine Schwarz-Weiß-Videokamera (CCD TV Camera C3077, Hamamatsu Photonics K.K.) bei Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung eines Bildverstärkers (M4314-01, Hamamatsu Photonics K.K.) auf einen Bildschirm (TC-14S1RC, Panasonic) dargestellt und mit einem Videorekorder (VCR 5700, Panasonic) auf Videoband (S-VHS, Panasonic) aufgezeichnet.

2.2.2.3 Membranpotentialmessung

Beim Aufbau der Membranpotentialmessung wurde großer Wert darauf gelegt, Störfaktoren so weit wie möglich zu reduzieren. In erster Linie seien hier Störfaktoren mechanischer und elektrischer Art zu nennen. Der Mikroskoptisch wurde auf ein Luftfedersystem zur Schwingungsisolierung (Einfaltenbalg FS 70-7, Druck: 3 bar, ContiTech, Hannover) gestellt, um zu verhindern, dass mechanische Schwingungen der Umgebung auf das Präparat übertragen wurden. Sämtliche Geräte, die Vibrationen erzeugten (z. B. Wärmebad und Beatmungsgerät), wurden auf Tische neben dem Mikroskoptisch gestellt. Um Vibrationen von Seiten des Experimentators während der Punktion der Zellen nicht zu übertragen, wurde ein motorbetriebener Mikromanipulator mit Piezoelement und Fernsteuerung (PM 20H, Samwoo Scientific Co., Seoul, Korea) verwendet (**Abschnitt 2.2.3**). Um die Messelektrode und den Vorverstärker (Headstage) vor elektromagnetischer Strahlung zu isolieren, wurde das Mikroskop von einem Faraday-Käfig (Werkstatt des Institutes), der nur nach

vorne geöffnet war, abgeschirmt. Alle Quellen für elektrische Strahlung, wie z. B. Netzgeräte, Steckdosen etc., wurden außerhalb des Käfigs platziert. Um keine elektromagnetischen Ströme zu induzieren, wurde darauf geachtet, dass elektrische Kabel keine Schlingen bildeten und nur über kurze Strecken im Faraday-Käfig verliefen. Zusätzlich wurden alle metallischen Abschirmungen und elektrischen Geräte zentral an einer Erdung in einer Steckdose verbunden (**Abbildung 2.6**).

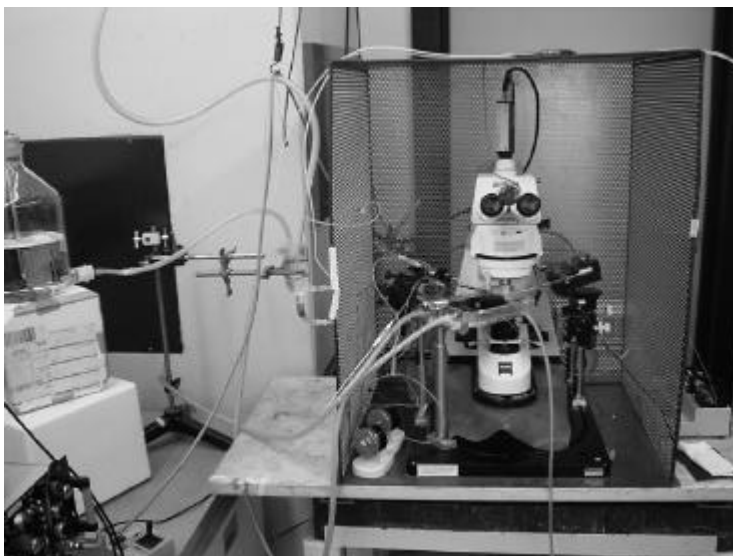


Abbildung 2.6
Mikroskopierplatz

Das Mikroskop wird von einem Faraday-Käfig elektromagnetisch abgeschirmt. Links im Bild ist das Superfusionsystem zu sehen.

Zur Membranpotentialmessung wurde die Spitze der Mikroelektrode mit 5% Carboxyfluorescein-Farbstoff (in 3 mol/L KCl gelöst) beladen und dann mit KCl-Lösung (3 mol/L) gefüllt. Die Mikroelektrode war in einem Mikroelektrodenhalter befestigt, dessen Silberdraht in die KCl-Lösung der Elektrode eintauchte und das Signal an den Vorverstärker (Headstage) weiterleitete. Der Silberdraht wurde regelmäßig in einer HCl-Lösung (0,1 mol/L) mittels Anlegen einer Gleichstromspannung (9V) chloriert.



Die Referenzelektrode wurde im Gewebe an der Basis des Cremastermuskels positioniert und hatte Kontakt mit dem Tier über die Superfusionslösung. Das Membranpotential wurde mit einem Potentialverstärker

(SEC 1L, NPI Advanced Electronics, Tamm) gemessen, an dem das Membranpotential auch digital abgelesen werden konnte.

Die Technik zur intrazellulären Membranpotentialregistrierung, die in dieser Arbeit angewendet wurde, wird auch als „bridge“-Technik bezeichnet. Die Mikroelektrode ist dabei über einen Vorverstärker mit dem Verstärker verbunden, der einen Eingangswiderstand hat, welcher um ein vielfaches größer ist als derjenige der Mikropipette und der Zelle. Der Ausgang des Verstärkers folgt dem Potential an der Spitze der Mikroelektrode und kann somit das Membranpotential wiedergeben. Der Strom durch die Elektrode wird dabei auf null „geklemmt“. Zur Orientierung im Gewebe wurde ein Stromimpuls generiert, der durch spezielle Kompensationskreisläufe des Verstärkers subtrahiert werden konnte und damit nicht mit der Messung interferierte. Diese Technik wird auch als „Bridge Balance“ bezeichnet, weil dazu eine Brückenschaltung verwendet wird („Wheatstone-Brücke“).

Mit einem Impulsgenerator (Anapulse Stimulator Model 302-T, W-P Instruments, New Haven, USA) wurde ein rechteckförmiges repetitives Signal von 25 ms Dauer, einer Verzögerung von 10 ms und einem Intervall von 65 ms erzeugt. Dieses Signal wurde zum Verstärker geleitet, der darauf einen Stromimpuls von +0,3 nA für die gleiche Dauer generierte. Auf einem externen Oszilloskop (HM 205-3, HAMEG, Frankfurt/Main) wurde sowohl der elektrische Impuls, als auch das Membranpotential der Mikroelektrode dargestellt. Über einen Drehregler am Verstärker konnte nun der Spannungsabfall, der sich aus dem Produkt des Stromimpulses und des Widerstands der Mikroelektrode ergab, abgeglichen werden. Gleichzeitig konnte der Widerstand der Mikroelektrode am Drehregler abgelesen werden.

Nach der Brückenkompensation erfolgte der Kapazitätsausgleich. Die Kapazität am Verstärkereingang hat mehrere Quellen: die Kapazität über der Glaswand der Mikroelektrode, die Kapazität von dem Teil der Mikroelektrode, der in die Superfusion eintaucht, die Streukapazität des Mikroelektrodenhalters et cetera. Am Verstärker wurden diese Kapazitäten ausgeglichen oder konnten sogar überkompensiert werden, was die Penetration der Zellen etwas

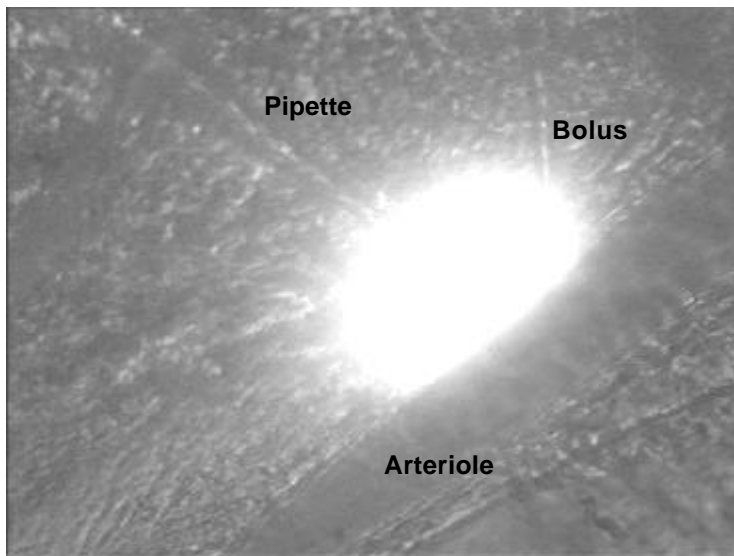
erleichterte. Widerstandsänderungen bei Kontakt der Elektrode mit der Zellmembran konnten als Spannungsänderungen auf dem Oszilloskop beobachtet werden. Eine Penetration der Zellmembran erfolgte durch kurze und schnelle Vorwärtsbewegungen der Mikroelektrode mit Hilfe des Piezoelements des Mikromanipulators nach Berühren der Zellmembran. In manchen Fällen war die Applikation eines kurzen hochfrequent-oszillierenden Stroms durch die Mikroelektrode notwendig, um die Penetration zu erleichtern („Buzzing“). Dabei wird eine Anziehungskraft zwischen der Ladung an der Mikroelektroden spitze und den gebundenen Ladungen der Innenseite der Zellmembran erzeugt.

Das Membranpotential wurde über eine Schnittstellenbox (Elektronikwerkstatt des Instituts) in einen Computer (Celsius 400, Siemens) eingespeist und mit dem Datenverarbeitungsprogramm XmAD (siehe 2.2.6) auf der Festplatte mit einer Frequenz von 1000 Hz aufgezeichnet. Vor der Messung erfolgte eine Kalibrierung des Datenverarbeitungsprogramms.

2.2.3 Prinzipieller Versuchsaufbau

Nachdem das Präparat korrekt auf dem Mikroskopisch ausgerichtet war, wurde zunächst mit dem 10-fach Objektiv eine geeignete Stelle aufgesucht, an der zuvor eine Arteriole von der umgebenden Skelettmuskulatur frei präpariert wurde. Der nächste Schritt bestand darin, mögliche Bewegungen des Präparats zu minimieren, die die Membranpotentialmessung empfindlich gestört hätten. Die Übertragung der Atemexkursionen konnte durch mechanische Beatmung verringert werden. Zudem konnte mit Hilfe der Zügelungsfäden eine weitere mechanische Isolierung des Muskels von der Maus erreicht werden.

Um die Änderung des Membranpotentials nach lokaler Stimulation mit den genannten Pharmaka zu untersuchen, wurde eine Stimulationspipette zur Applikation mit einem Spitzendurchmesser von 1 – 2 μm am stromabwärts gelegenen Ende der präparierten Arteriole mit einem mechanischen Mikromanipulator (M-152, Narishige, Tokio) platziert. Das Membranpotential wurde stets proximal von der Stimulationsstelle gemessen und somit konnte ein konvektiver Transport der Substanzen mit dem Blutfluss ausgeschlossen werden.

**Abbildung 2.7 Lokale Bolusapplikation**

Eine Arteriole mit ca. 40 μm Durchmesser wurde strikt lokal stimuliert. Durch Zusatz von Carboxyfluorescein konnte die Bolusapplikation visualisiert, und die Durchgängigkeit der Mikropipette geprüft werden.

Über ein in der institutseigenen Elektronikwerkstatt entwickeltes Gerät konnten Pharmaka durch Druckpulse (1,5 bar) lokal appliziert werden. Durch Variieren der Druckpulsdauer (10 – 3000 ms) konnten unterschiedliche Konzentrationen erreicht werden. Zur Kontrolle der Durchgängigkeit der Stimulationspipette wurde dieser eine kleine Menge Carboxyfluorescein (ca. 1:1000) beigemischt. Unter Fluoreszenzmikroskopie konnte die Ejektion somit beobachtet werden (**Abbildung 2.7**). Nun wurde die Mikroelektrode von der gegenüberliegenden Seite am Gefäß positioniert. Die Mikroelektroden hatten einen Spitzendurchmesser $< 1 \mu\text{m}$ und einen elektrischen Widerstand von ca. 80 - 120 M Ω . Ihre Spitzen waren lang und flexibel, so dass sie sich mit der Gefäßwand bewegen konnten. Mit Hilfe eines elektronisch gesteuerten Mikromanipulators (PM 20H, Samwoo Scientific Co., Seoul, Korea) wurde die Mikroelektrode in einem Winkel von 45 – 90° zum Gefäßverlauf an die Gefäßwand herangebracht. Nach zunächst grober Positionierung der Mikroelektrode und der Stimulationspipette wurden diese nun unter dem 40-fach Objektiv exakt eingestellt. Die Stimulationspipette wurde mit einem ölhydraulischen System am Mikromanipulator in Längsrichtung vorgeschoben, bis sie einen Abstand von etwa 5 – 10 μm vor der Arteriole erreichte. Die Mikroelektrode wurde über einen Joystick gesteuert und proximal der Stimulationspipette an die Gefäßwand herangefahren. Erreichte die Elektrodenspitze eine Zellmembran, zeigte das Oszilloskop einen Spannungsabfall über der Membran. Durch das Piezoelement konnte diese Mikroelektrode jetzt in schnellen Schritten von 1 μm vorwärts

bewegt werden. Hierdurch drang die Messelektrode entweder spontan oder nach Oszillation der Elektrode (siehe oben) in die Zelle ein. Kriterien für eine erfolgreiche Punktion waren 1) eine steile negative Auslenkung des Potentials, 2) ein geringer Widerstand über der Zellmembran, 3) ein stabiles Potential über mindestens 30 s, sowie 4) eine rasche positive Ablenkung des Potentials nach dem Austritt der Elektrode aus der Zelle. Sobald die Mikroelektrode die Zellmembran penetriert hatte, wurde der Stromimpuls am Verstärker ausgeschaltet und die Messung begonnen.

2.2.4 Versuchsprotokolle

2.2.4.1 Wirkung von vasoaktiven Substanzen

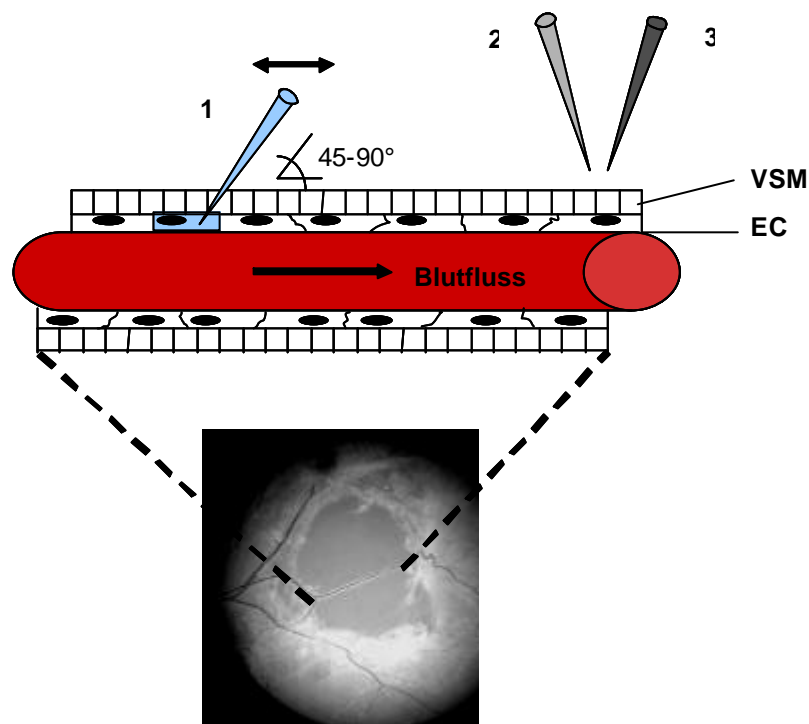


Abbildung 2.8 Schematische Darstellung der Messanordnung

Die Messelektrode (1) steckt in einem Winkel von 45 – 90° zur Gefäßwand in einer Endothelzelle. Über eine Stimulationspipette (2) wurden Pharmaka zur Endothelstimulation appliziert. Über eine weitere Applikationspipette (3) konnte das Gefäß lokal an der Stimulationsstelle mit K_{Ca} -Kanalblockern behandelt werden (Abschnitt 2.2.4.2). Um eine Konvektion der Stimulationssubstanzen mit dem Blutfluss zur Messelektrode zu vermeiden, wurde die Stimulationspipette (3) stromabwärts von der Messelektrode platziert. Wenn die Signalausbreitung untersucht wurde (Abschnitt 2.2.4.3), wurde die Messelektrode (1) relativ zur Stimulationspipette (3) nach stromaufwärts verschoben (0 – 1500 μm).

In dieser Versuchsreihe wurde die Wirkung von Pharmaka auf das Membranpotential von Endothelzellen und glatten Muskelzellen untersucht. Hierzu wurde die Arteriole über die Applikationspipette lokal mit Acetylcholin (10 mmol/L) und SNP (sodium-nitroprusside, 10 mmol/L) stimuliert. Die lokale Konzentration des Pharmakons wurde durch die Dauer des Druckpulses (10 – 3000 ms) variiert. Das Membranpotential wurde in einem definierten Abstand stromaufwärts von der Applikationspipette registriert (**Abbildung 2.8**). Direkt im Anschluss an die Messung, wurde die beobachtete Zelle identifiziert (**Abschnitt 3.1.1**).

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Arteriolen von Tieren, die defizient für die endotheliale NO-Synthase (eNOS^{-/-}) waren, mit Acetylcholin stimuliert, um die Beteiligung von NO bei der Auslösung von Hyperpolarisationen zu untersuchen (**Abschnitt 3.2.6**).

2.2.4.2 Untersuchung der beteiligten K_{Ca}-Kanäle

Hier wurde die Bedeutung von K_{Ca}-Kanälen für die Auslösung von Hyperpolarisationen nach ACh-Stimulation untersucht. Dazu wurden über eine zweite Applikationspipette (**Abbildung 2.8**), die in unmittelbarer Nähe der ACh-Stimulationspipette platziert wurde, verschiedene K_{Ca}-Kanalblocker appliziert (Charybdotoxin, Iberitoxin, Apamin). Mit 5 bis 10 Druckejektionen (Dauer jeweils 1 s) wurde der Gefäßabschnitt lokal um die Stimulationspipette mit den Kanalblockern behandelt. Anschließend wurde erneut eine Zelle punktiert, über die Stimulationspipette Acetylcholin appliziert und das Membranpotential registriert (**Abschnitt 3.3**).

2.2.4.3 Ausbreitung der Hyperpolarisation

In dieser Versuchsreihe wurde der Frage nachgegangen, ob und wie sich die Hyperpolarisation auf Acetylcholin entlang des Gefäßes ausbreitet. Dafür wurde der Abstand der Messelektrode zum Stimulationsort verändert (0 – 1500 µm), indem die Messelektrode stromaufwärts verschoben wurde (**Abbildung 2.8**).

und Abschnitt 3.4). Anschließend wurde wie oben beschrieben mit Acetylcholin in unterschiedlichen Konzentrationen (durch Variation der Stimulationsdauer) stimuliert und das Membranpotential in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen registriert.

2.2.5 Statistik und Datenbearbeitung

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben (SEM). Für statistische Vergleiche zweier Behandlungen wurde der t-Test nach Student verwendet (für gepaarte oder ungepaarte Werte). Unterschiede wurden als signifikant erachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5% ($p < 0,05$) war. Die p-Werte von Mehrfachvergleichen wurden nach Bonferroni korrigiert.

2.2.6 Verwendete Software zur Erstellung der Dissertation

Das Membranpotential wurde mit dem Datenverarbeitungsprogramm XmAD (<http://www.ibiblio.org/pub/Linux/science/lab>) unter Linux aufgezeichnet (Pentium III, Siemens, München) und mit dem Programm XmANA (<http://www.ibiblio.org/pub/Linux/science/lab>) analysiert. Die Daten wurden mit dem Statistikprogramm Stata 6,0[®] (Stata Corporation, College Station, Texas, USA) weiterverarbeitet, indem Größen abgeleitet und statistische Vergleiche durchgeführt wurden. Die graphischen Darstellungen der berechneten Daten wurde mit SigmaPlot[®] (Ver. 7.0, SPSS Inc., 2001, Richmond, California, USA) erstellt. Einige Skizzen und Abbildungen wurden mit dem Programm PowerPoint2002[®] (Microsoft, München) angefertigt. Als Textverarbeitungsprogramm diente Word2002[®] (Microsoft, München), ergänzt durch das Literaturbearbeitungsprogramm Reference Manager 9.5[®] (Research Information System, Carlsbad, California, USA).

3 ERGEBNISSE

3.1 Membranpotential und Farbstoffkopplung der Endothelzellen (EC) und glatten Gefäßmuskelzellen (VSM) unter Ruhebedingungen

3.1.1 Identifizierung der Zellen der Gefäßwand

Das Kriterium zur Unterscheidung von EC und VSM war die charakteristische Anordnung der Zellen in der Gefäßwand. Um die gemessenen Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen, wurden sie mit dem anionischen Farbstoff Carboxyfluorescein angefärbt. Carboxyfluorescein diffundierte während der Messung aus der Spitze der Mikroelektrode in die Zellen, die treibende Kraft für diesen Vorgang war das Konzentrationsgefälle. Zusätzlich lag bis kurz vor und teilweise nach der Messung ein Strom von +0,3 nA über der Messelektrode an, der den Farbstoff iontophoretisch in die Zellen beförderte.

Welsh und Segal konnten zeigen, dass Endothelzellen parallel zur Gefäßlängsachse angeordnet sind, während glatte Muskelzellen quer zur Gefäßlängsachse liegen (Welsh und Segal, 1998). Somit konnten in dieser Arbeit je nach Darstellung der Zellen, längs angeordnete Zellen als Endothelzellen (**Abbildung 3.1A**) und quer angeordnete Zellen als glatte Muskelzellen (**Abbildung 3.1B**) identifiziert werden.

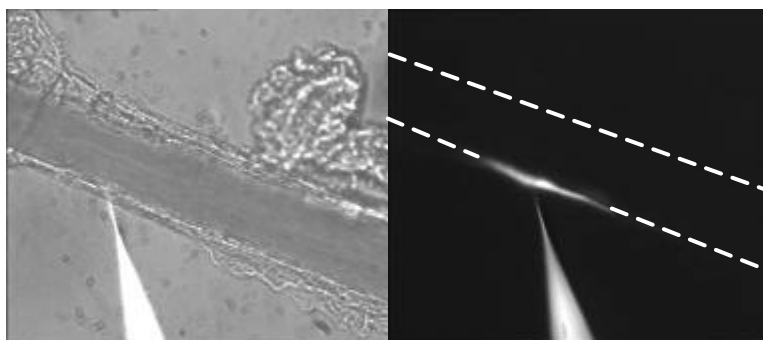


Abbildung 3.1A Gefärbte Endothelzelle (EC)

Die linke Abbildung zeigt eine präparierte Arteriole im Durchlicht in deren Gefäßwand die Messelektrode steckt.

Die rechte Abbildung zeigt dasselbe Gefäß im Fluoreszenzlicht. Deutlich zu erkennen ist die parallel zur Gefäßlängsachse angeordnete Zelle, die demnach als Endothelzelle identifiziert werden kann. Diese fluoresziert durch den aus der Mikroelektrode aufgenommenen Farbstoff Carboxyfluorescein.

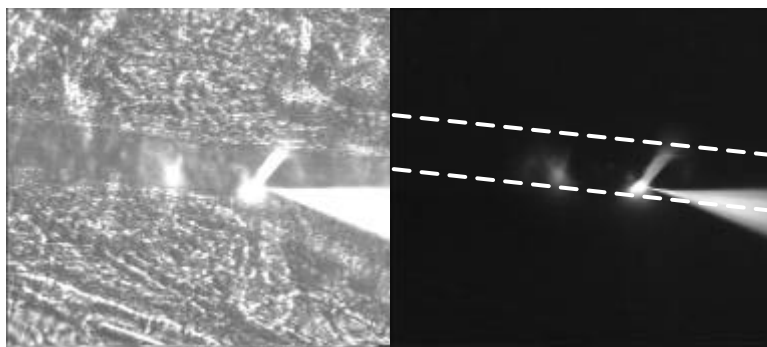


Abbildung 3.1B Gefärbte glatte Gefäßmuskelzelle (VSM)

Die linke Abbildung zeigt eine mit Carboxyfluorescein angefärbte Zelle, die nach ihrer Anordnung quer zur Gefäßlängsachse als glatte Muskelzelle identifiziert werden kann. Neben dem Fluoreszenzlichtbild zeigt das Durchlichtbild den Gefäßverlauf und seine Umgebung.

3.1.2 Farbstoffkopplung zwischen den Zellen

Wurde eine Endothelzelle mit Farbstoff beladen, so zeigte sich in wenigen Fällen ($< 5\%$) auch eine Anfärbung der benachbarten Endothelzelle, als Ausdruck einer homozellulären Kopplung. Eine Ausbreitung zwischen glatten Gefäßmuskelzellen wurde aber nie beobachtet. Dies legt nahe, dass VSM untereinander homozellulär nicht ausreichend gekoppelt sind, um den Farbstoff zu übertragen. Ebenso scheint auch die Farbstoffkopplung zwischen EC und VSM nicht vorhanden zu sein. Bei Farbstoffbeladung einer glatten Muskelzelle wurde keine Ausbreitung in benachbarte EC gesehen und vice versa. Zusätzlich ist anzumerken, dass in einer Arteriole mehrere Messungen nacheinander durchgeführt wurden und bei diesen nachfolgenden Messungen eine Farbstoffkopplung durch die vorher angefärbte Zelle nicht sicher beurteilt werden konnte.

3.1.3 Membranpotential in EC und VSM

Das Membranpotential (MP) wurde bei jeder Zelle nach einer Stabilisierungsphase von mind. 30 s nach Punction der Zelle registriert. Das durchschnittliche MP von 110 EC wurde in 39 Tieren bestimmt und betrug $-46,0 \pm 1,0$ mV. In 80 VSM aus 31 Tieren lag das durchschnittliche MP bei $-35,9 \pm 0,9$ mV (**Abbildung 3.2**). Der Vergleich dieser *in vivo* gemessenen Werte

zeigt, dass das MP von EC um 10,1 mV negativer war als das von VSM ($p < 0,05$).

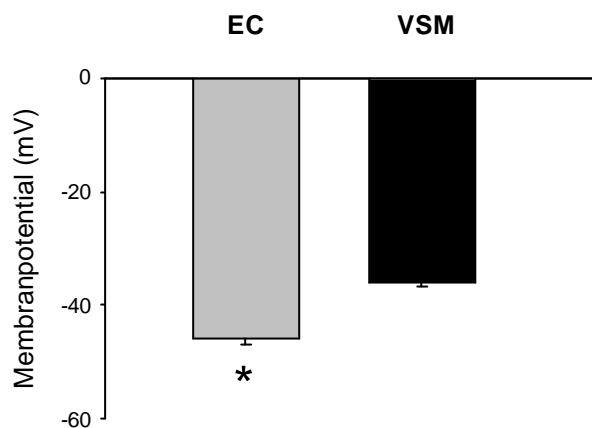


Abbildung 3.2 Membranpotential (MP) in EC und VSM

Das MP in EC (grau, $n = 110$ Zellen in 39 Tieren) war um 10,1 mV niedriger als das MP in VSM (schwarz, $n = 80$ Zellen in 31 Tieren).

Mittelwert \pm SEM, *: $p < 0,05$ vs. VSM

3.2 Effekt der lokalen Applikation vasoaktiver Substanzen auf das Membranpotential der Gefäßzellen

3.2.1 Effekt der lokalen Applikation von Acetylcholin auf das MP in EC

Um zu untersuchen, inwieweit sich das MP nach Applikation vasoaktiver Substanzen ändert, wurde mit einer Stimulationspipette, die wenig stromabwärts neben der Arteriole platziert war, zunächst Acetylcholin (10 mmol/L in der Pipette) lokal durch kurze Druckpulse (10 – 1000 ms; 1,5 bar) appliziert. Jede ACh-Applikation löste eine Hyperpolarisation in EC aus, deren Amplitude abhängig von der Dauer der Stimulation und damit der Konzentration war (**Abbildung 3.3**).

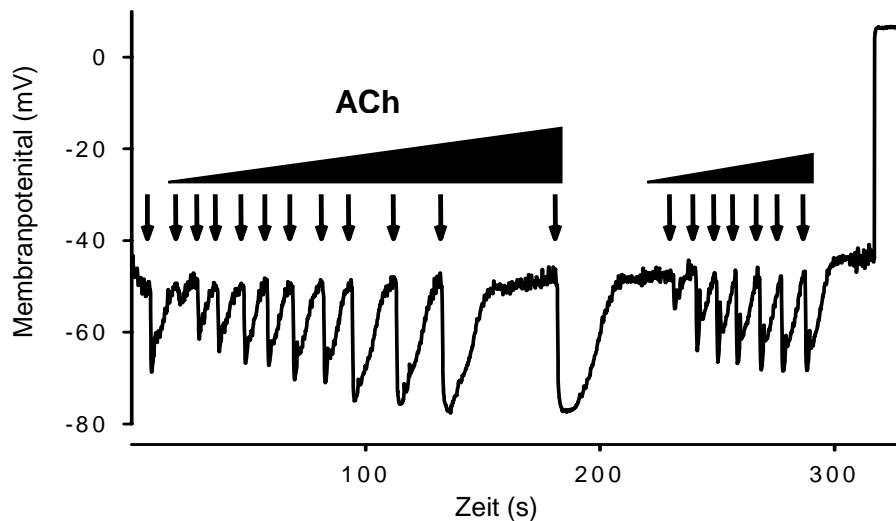


Abbildung 3.3 Originalregistrierung des Membranpotentials in einer EC während lokaler ACh-Stimulation

Dargestellt ist eine komplette Sequenz einer Membranpotentialregistrierung in einer EC während wiederholter Stimulation. Die Pfeile markieren die ACh-Bolusapplikationen. Die Rampen verdeutlichen die Zunahme der lokalen ACh-Konzentration, was durch eine Verlängerung der Applikationsdauer (10 – 3000 ms) erreicht wurde. Mit ansteigender ACh-Konzentration nahm zunächst die Amplitude, dann auch die Dauer der endothelialen Hyperpolarisation zu. Nach 300 s wurde die Mikroelektrode disloziert. Es ist ein schneller Sprung auf den Nullpunkt zu erkennen als Kriterium für eine erfolgreiche vorherige Messung.

Eine Stimulation mit Acetylcholinapplikationen von 10 ms Dauer bewirkte eine signifikante Änderung des Membranpotentials in EC (28 Beobachtungen in 18 Tieren) von $-47,2 \pm 1,8$ mV auf ein Minimum von $-51,5 \pm 1,7$ mV ($p < 0,05$). Dieses Minimum wurde im Mittel nach $1,9 \pm 0,2$ s erreicht und die Hyperpolarisation dauerte insgesamt $3,8 \pm 0,3$ s. Bei einer Stimulationsdauer von 100 ms (49 Beobachtungen in 27 Tieren) änderte sich das Membranpotential von $-46,8 \pm 1,5$ mV auf ein Minimum von $-54,3 \pm 1,5$ mV. Nach $2,3 \pm 0,2$ s wurde dieses niedrigste Potential erreicht und kehrte nach durchschnittlich $8,5 \pm 0,8$ s auf den Ruhewert zurück. Betrug die Stimulationsdauer schließlich 1000 ms (51 Beobachtungen in 26 Tieren), so änderte sich das Membranpotential nach $2,5 \pm 0,1$ s von $-46,6 \pm 1,5$ mV auf ein Minimum von $-56,8 \pm 1,5$ mV. Das Ausgangspotential stellte sich nach $13,0 \pm 1,0$ s wieder ein.

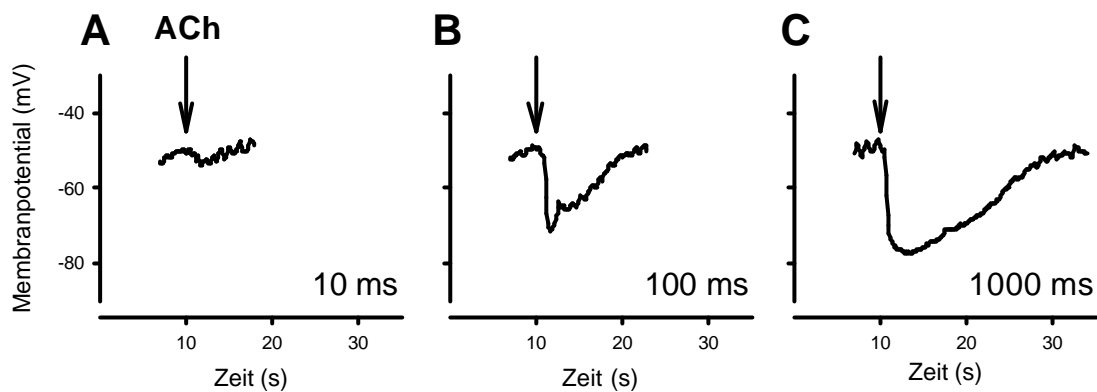


Abbildung 3.4 Originalregistrierung des Membranpotentials (MP) einer EC nach ACh

Dargestellt ist das Membranpotential einer EC nach lokaler ACh-Stimulation mit 10 ms (A), 100 ms (B) und 1000 ms (C) Applikationsdauer in einer höheren zeitlichen Auflösung. Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der ACh-Ejektion an. Mit zunehmender ACh-Stimulationsdauer nehmen sowohl Amplitude als auch Dauer der Hyperpolarisation zu. Die Hyperpolarisation erfolgt kurz nach Applikation sehr schnell, während die Rückkehr auf das Ausgangsniveau langsamer, aber stetig erfolgt.

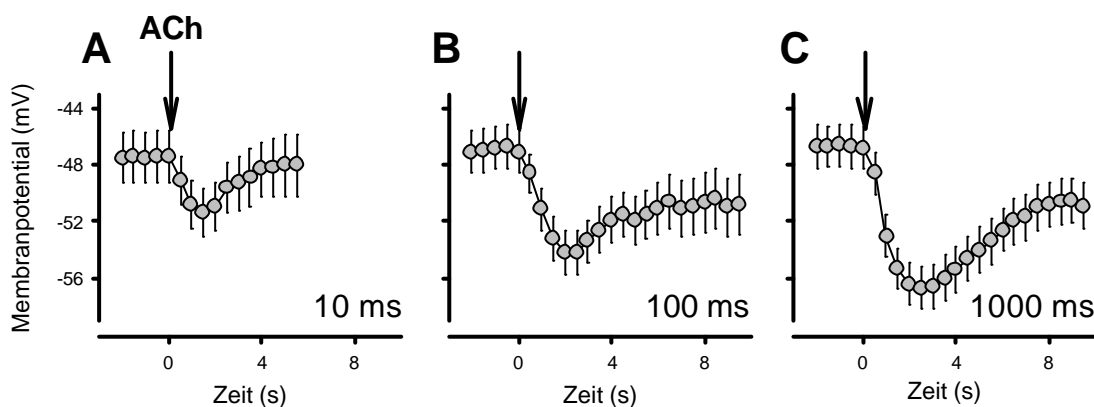


Abbildung 3.5 Membranpotentialänderung in EC nach lokaler Stimulation mit ACh

In A - C sind die Membranpotentialänderungen aus allen EC zusammengefasst. Die Pfeile (Zeitpunkt 0) markieren die Applikation von ACh. In A sind $n = 28$ Beobachtungen in 18 Tieren bei 10 ms Stimulationsdauer, in B $n = 49$ Beobachtungen in 27 Tieren bei 100 ms Stimulationsdauer und in C $n = 51$ Beobachtungen in 26 Tieren bei 1000 ms Stimulationsdauer dargestellt. Bei längeren Stimuli und somit höherer lokaler Konzentration sind die Hyperpolarisationen stärker und halten länger an. Mittelwerte \pm SEM

Vergleicht man die Zeitdauer bis zum Erreichen des Maximums der Hyperpolarisationen, so zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen 10 ms und 1000 ms Stimulationsdauer ($t = 0,6 \pm 0,2$ s, $p < 0,05$), nicht jedoch zwischen 10 ms und 100 ms ($t = 0,4 \pm 0,3$ s, $p = 0,12$) oder zwischen 100 ms und 1000 ms ($t = 0,2 \pm 0,2$ s, $p = 0,33$). Die Dauer der Hyperpolarisationen auf

die verschieden langen Stimuli waren immer signifikant unterschiedlich voneinander ($\Delta t = 4,7 \pm 1,0$ s bei 10 ms vs. 100 ms; $\Delta t = 4,5 \pm 1,3$ s bei 100 ms vs. 1000 ms, jeweils $p < 0,05$). Ebenso waren die Amplituden immer unterschiedlich voneinander ($\Delta mV = 3,2 \pm 1,3$ bei 10 ms vs. 100 ms; $\Delta mV = 2,7 \pm 1,3$ bei 100 ms vs. 1000 ms, jeweils $p < 0,05$). **Abbildung 3.4** zeigt eine Originalregistrierung und **Abbildung 3.5** den zeitlichen Verlauf der Hyperpolarisationen bei unterschiedlichen Stimulationsdauern in einer Zusammenfassung. Es wird deutlich, dass sowohl Dauer als auch Amplitude der Hyperpolarisationen mit ansteigender ACh-Konzentration zunehmen.

3.2.2 Effekt der lokalen Applikation von Acetylcholin auf das MP in VSM

Mit derselben Messtechnik wurden auch glatte Muskelzellen (VSM) untersucht. Bereits nach wenigen Messungen zeigte sich, dass auch VSM nach lokaler ACh-Bolusapplikation hyperpolarisierten (**Abbildung 3.6**).

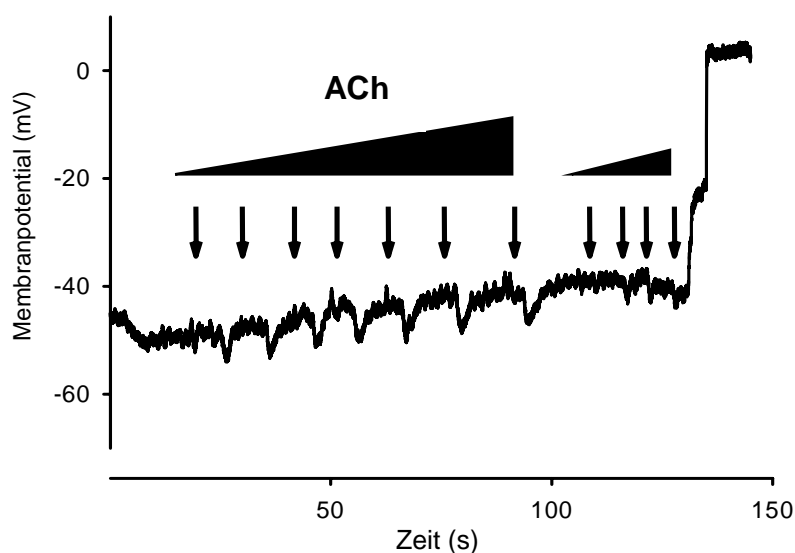


Abbildung 3.6 Originalregistrierung des MP in einer VSM während ACh-Stimulation

Die Abbildung zeigt eine Membranpotentialmessung in einer VSM während ACh-Stimulation. Die Pfeile geben den Zeitpunkt der ACh-Bolusapplikation an, nach jedem Bolus ist eine Hyperpolarisation zu erkennen. Die Amplitude ist in dieser Registrierung im Vergleich zu EC (siehe **Abbildung 3.3**) jedoch kleiner und die Dauer kürzer.

Grundsätzlich ist zu erwähnen, dass insgesamt weniger VSM als EC beobachtet wurden. Dies lag vermutlich daran, dass sich die VSM in der äußeren Gefäßschicht befinden, die Mikroelektrode bei der Messung also nur ein sehr kurzes Stück in der Gefäßwand steckte. Feine Arteriolenpulsationen oder Tonusänderungen der VSM könnten deshalb leicht zur Dislokation der Elektrode

führen. EC hingegen, die das Gefäßlumen auskleiden, werden von den VSM umhüllt. Dies war offensichtlich ein entscheidender Faktor für die höhere Erfolgsrate bei der Punktion der EC, denn die Spitze der Messelektrode wurde durch ihren längeren Verlauf in der Gefäßwand besser stabilisiert und verblieb damit leichter über einen längeren Zeitraum im Zellinneren.

Wurden VSM (12 Beobachtungen in 5 Tieren) lokal mit 10 – 30 ms (Mittelwert: 16 ± 2 ms) dauernden ACh-Applikationen stimuliert, änderte sich das Membranpotential signifikant von $-35,8 \pm 3,8$ mV auf $-38,0 \pm 3,5$ mV ($p < 0,05$). Das Maximum der Hyperpolarisation wurde nach $1,7 \pm 0,2$ s, das Ausgangspotential nach $2,9 \pm 0,2$ s wieder erreicht. Verlängerte man die Stimulationsdauer auf 100 ms (10 Beobachtungen in 8 Tieren) so änderte sich das Membranpotential von $-36,3 \pm 3,5$ mV auf $-40,0 \pm 3,8$ mV. Dieser Wert wurde innerhalb $2,1 \pm 0,2$ s erreicht und das Membranpotential ging nach $4,2 \pm 0,4$ s auf das Ausgangsniveau zurück. Bei einer Stimulationsdauer von 1000 ms änderte sich das Membranpotential innerhalb von $2,2 \pm 0,2$ s von $-35,7 \pm 3,6$ mV auf $-40,5 \pm 3,3$ mV und erreichte nach $10,8 \pm 2,0$ s wieder den Ausgangswert (10 Beobachtungen in 5 Tieren). **Abbildung 3.7** zeigt eine Originalregistrierung mit solchen Stimulationszeiten, in **Abbildung 3.8** sind die Messungen zusammengefasst dargestellt.

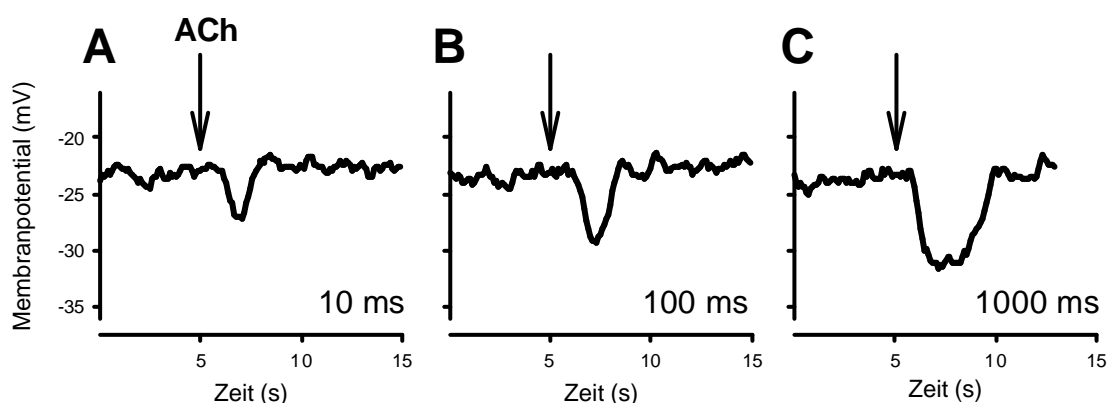


Abbildung 3.7 Originalregistrierung des Membranpotentials in einer VSM während lokaler Stimulation mit ACh

Dargestellt ist das Membranpotential in einer VSM jeweils nach lokaler ACh-Stimulation mit 10 ms (A), 100 ms (B) und 1000 ms (C) Applikationsdauer. Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der ACh-Ejektion an. Diese Beobachtung zeigt, dass mit zunehmender Stimulationsdauer sowohl Amplitude als auch Dauer der Hyperpolarisation zunehmen. Allerdings sind die Unterschiede nur gering.

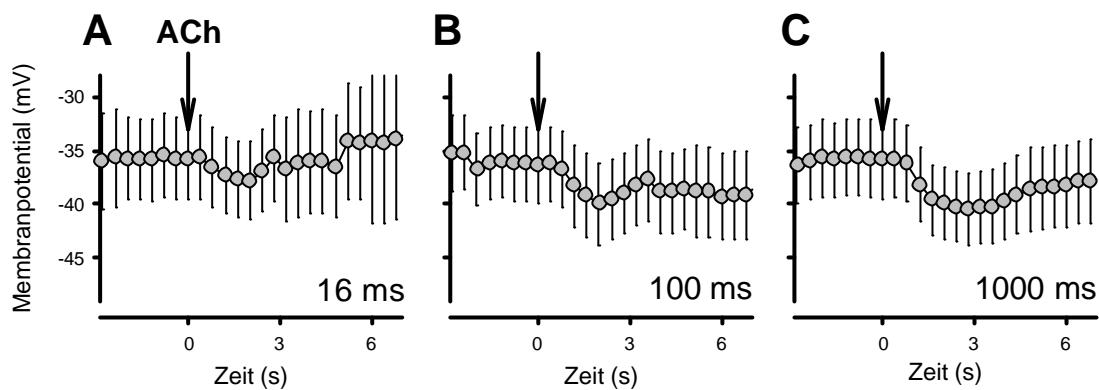


Abbildung 3.8 Membranpotentialänderung in VSM nach lokaler Stimulation mit ACh

In **A - C** sind die Membranpotentialänderungen in VSM zusammengefasst dargestellt. Die Pfeile markieren die Applikation von ACh (Zeitpunkt 0). In **A** sind $n = 12$ Beobachtungen in 5 Tieren bei 16 ms Stimulationsdauer, in **B** $n = 10$ Beobachtungen in 8 Tieren bei 100 ms Stimulationsdauer und in **C** $n = 10$ Beobachtungen in 5 Tieren bei 1000 ms Stimulationsdauer dargestellt. Mittelwerte \pm SEM

Die Zeitunterschiede bis zum Erreichen des Maximums zwischen 16 ms und 100 ms ($?t = 0,4 \pm 0,3$ s, $p = 0,13$), zwischen 16 ms und 1000 ms ($?t = 0,5 \pm 0,2$ s, $p = 0,09$), sowie zwischen 100 ms und 1000 ms Stimulationsdauer ($?t = 0,1 \pm 0,3$ s, $p = 0,76$) waren auf dem Signifikanzniveau nicht verschieden. Vergleicht man die Dauer der Hyperpolarisationen, so waren sowohl zwischen 16 ms und 100 ms ($?t = 1,3 \pm 0,4$ s), zwischen 16 ms und 1000 ms ($?t = 7,9 \pm 2,1$ s), als auch zwischen 100 ms und 1000 ms Stimulationsdauer ($?t = 6,6 \pm 2,1$ s) signifikante Unterschiede festzustellen (jeweils $p < 0,05$). Beim Vergleich der Amplituden war nur zwischen 16 ms und 1000 ms Stimulationsdauer ein signifikanter Unterschied zu erkennen ($?mV = 2,6 \pm 0,9$, $p < 0,05$). Zwischen 16 ms und 100 ms ($?mV = 1,5 \pm 0,7$, $p = 0,07$), sowie zwischen 100 ms und 1000 ms Stimulation ($?mV = 1,1 \pm 1,0$, $p = 0,32$) gab es keine Unterschiede. Somit sind auch in VSM eine Zunahme der Dauer und ein geringfügiger Anstieg der Amplitude bei ansteigender ACh-Konzentration zu beobachten.

3.2.3 Vergleich der Hyperpolarisationen in EC und VSM

Der Vergleich der Reaktionen dieser Zellen auf ACh-Stimulation ergibt folgendes Bild: Die jeweiligen Dauern bis zum Erreichen des Maximums der Hyperpolarisation unterschieden sich weder bei 10 ms bzw. 16 ms, noch bei 100

ms oder 1000 ms Stimulationsdauer voneinander (**Abbildung 3.9** und **Tabelle 3.1**). Hinsichtlich der Dauer der Hyperpolarisation auf ACh zeigte sich zwischen EC und VSM bei einer Stimulationsdauer von 100 ms ein signifikanter Unterschied ($8,5 \pm 0,8$ s in EC vs. $4,2 \pm 0,4$ s in VSM, $p < 0,05$). Bei kürzerer (10 ms bzw. 16 ms) oder längerer Stimulation (1000 ms) war die Dauer der Antwort in beiden Zelltypen gleich ($p = 0,09$ bzw. $p = 0,38$). In EC und VSM nahm die Dauer der Antworten mit den verschiedenen langen Stimuli zu. So verlängerte sich die Dauer in EC bei 1000 ms Stimulation ca. um den Faktor 3,4 im Vergleich zu 10 ms Stimulation und in VSM ca. um den Faktor 3,8. Auch diese Daten sind in **Abbildung 3.9** und **Tabelle 3.1** dargestellt.

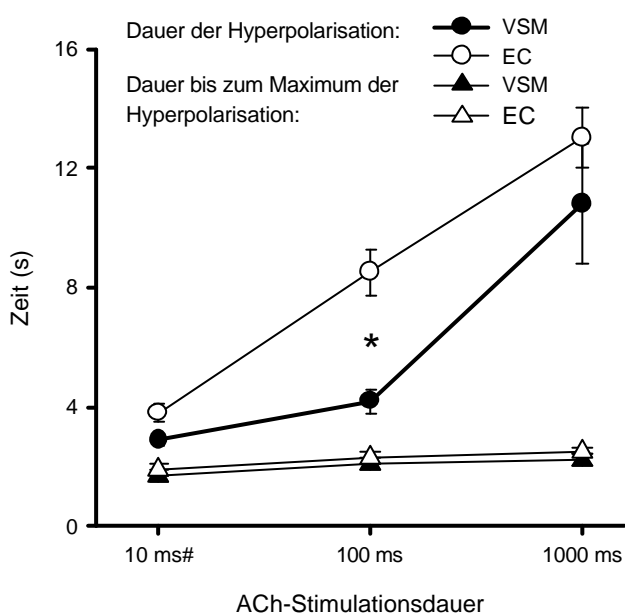


Abbildung 3.9 Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Hyperpolarisation in EC und VSM auf ACh

Dargestellt ist die Gesamtdauer und die Dauer bis zum Erreichen des Maximums der Hyperpolarisation nach ACh-Stimulation in EC (**weiß**) und VSM (**schwarz**) bei 10 ms (#: bei VSM im Mittel 16 ms), 100 ms und 1000 ms Stimulationsdauer. Sowohl in EC als auch in VSM nahm mit steigender ACh-Konzentration die Gesamtdauer der Hyperpolarisation zu. Ein signifikanter Unterschied zwischen EC und VSM bestand nur bei 100 ms Stimulationsdauer (*: $p < 0,05$). Die Zeiten bis zum Erreichen des Maximums unterschieden sich nicht zwischen den zwei Zelltypen. Die Anzahl der Beobachtungen und Versuchstiere sind in **Tabelle 3.1** dargestellt. Mittelwerte \pm SEM

Tabelle 3.1

Zellen	ACh Stimulationsdauer (ms)	Anzahl der Beobachtungen (n)	Anzahl der Tiere
VSM	16	12	5
	100	10	8
	1000	10	5
EC	10	28	18
	100	49	27
	1000	51	26

Tabelle 3.1 Anzahl der Beobachtungen (n) und der Versuchstiere

In der Tabelle sind die Anzahl der Beobachtungen (n) und die Anzahl der Versuchstiere aufgeführt, die in den Kapiteln 3.2.1, 3.2.2 und 3.2.3 ausgewertet wurden.

Vergleicht man schließlich die Amplitude der Hyperpolarisation in EC und VSM bei den unterschiedlichen ACh-Konzentrationen, so zeigten sich signifikante Unterschiede bei 100 ms und 1000 ms ACh-Stimulationsdauer. Während bei 10 ms (bzw. 16 ms) lediglich eine Tendenz erkennbar war (EC: $4,3 \pm 1,0$ mV vs. VSM: $2,2 \pm 0,4$ mV), die das Signifikanzniveau nicht erreichte ($p = 0,17$), so hyperpolarisierten EC bei 100 ms Stimulationsdauer signifikant stärker als VSM (EC: $7,5 \pm 0,8$ mV vs. VSM: $3,7 \pm 0,6$ mV, $p < 0,05$). Auch bei 1000 ms Stimulationsdauer war die Hyperpolarisation in EC signifikant stärker als in VSM (EC: $10,2 \pm 1,0$ mV vs. VSM: $4,8 \pm 0,8$ mV, $p < 0,05$). In EC war mit jeder 10-fachen Steigerung der Stimulationsdauer eine Zunahme der Amplitude zu beobachten. In VSM war lediglich zwischen 16 ms und 1000 ms, also bei 62-facher Steigerung der Stimulationsdauer ein signifikanter Unterschied erkennbar. Diese Daten sind in **Abbildung 3.10** und **Tabelle 3.1** dargestellt.

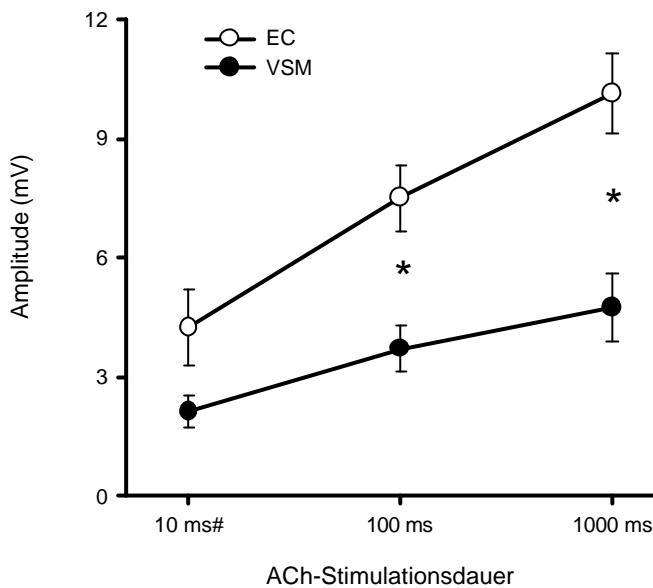


Abbildung 3.10 Vergleich der Amplitude der Hyperpolarisation in EC und VSM

Dargestellt ist die Amplitude der Hyperpolarisation nach unterschiedlicher Stimulationsdauer in EC und VSM (#: bei VSM 16 ms statt 10 ms). Die Amplitude der Hyperpolarisation war bei längerer Stimulationsdauer in EC größer als in VSM (*: $p < 0,05$). Die Anzahl der Beobachtungen und Versuchstiere sind in **Tabelle 3.1** dargestellt. Mittelwerte \pm SEM

3.2.4 Effekt von NO (SNP) auf das Membranpotential in EC

Nitroprussid-Natrium (sodium-nitroprusside, SNP, $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}$) setzt spontan NO frei und wird daher auch NO-Donor genannt. Um zu untersuchen, inwieweit NO das Membranpotential von Gefäßzellen in Arteriolen ändert, wurden die Gefäße lokal mit SNP (10 mmol/L) stimuliert, Membranpotentiale registriert und als Positivkontrolle ACh (10 mmol/L) verwendet. Die Auswertung von 34 Beobachtungen in 3 Tieren, in denen das Potential von EC gemessen wurde, zeigte eine geringe, jedoch signifikante Hyperpolarisation von $-39,5 \pm 1,4$ mV auf $-40,1 \pm 1,4$ mV ($p < 0,05$). Die mittlere Stimulationsdauer betrug 474 ± 58 ms. In denselben Arteriolen (14 Beobachtungen) führte ACh zu einer Hyperpolarisation von $-38,5 \pm 1,5$ mV auf $-43,3 \pm 1,6$ mV (**Abbildung 3.11**). Vergleicht man den maximalen Membranpotentialunterschied nach SNP-Stimulation ($0,6 \pm 0,1$ mV) mit dem der ACh-Kontrolle ($4,8$ mV $\pm 0,5$ mV), so wird deutlich, dass ACh eine signifikant größere Hyperpolarisation auslöste ($p < 0,05$ vs. SNP).

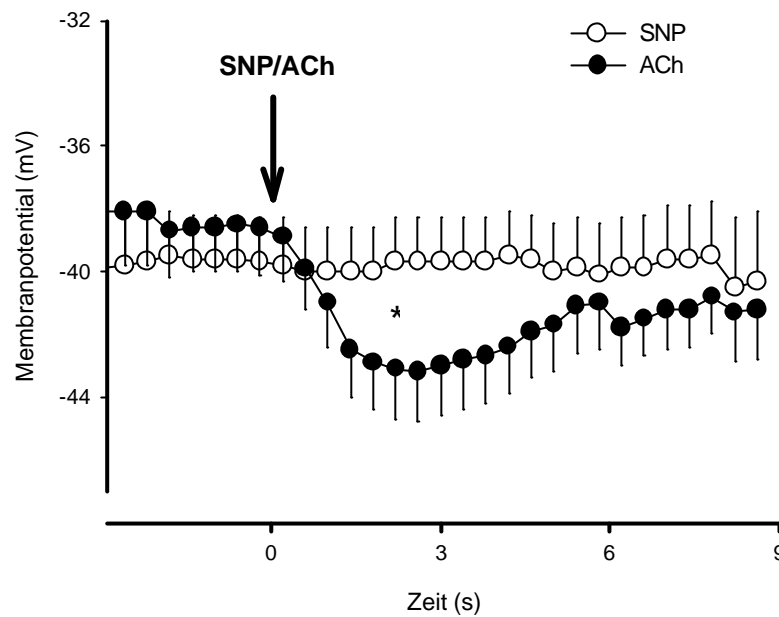


Abbildung 3.11 Membranpotential in EC nach lokaler Stimulation mit SNP

Die Abbildung zeigt das Membranpotential von EC nach lokaler Stimulation mit SNP (10 mmol/L, **weiß**) bzw. mit ACh (10 mmol/L, **schwarz**). Die Stimulation erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0 (Pfeil). ACh führte in denselben Gefäßen zu einer signifikant stärkeren Hyperpolarisation als SNP (*: SNP vs. ACh, $p < 0,05$). Mittelwerte \pm SEM

Betrachtete man bei SNP-Applikation die unterschiedlichen Stimulationsdauern (50 - 100 ms, 500 ms, 1000 ms) separat, so war nur bei der längsten Stimulation eine signifikante Hyperpolarisation zu sehen (von $-42,3 \pm 1,7$ mV auf $-43,0 \pm 1,8$ mV, $p < 0,05$). Bei 50 - 100 ms ($p = 0,39$) und 500 ms ($p = 0,27$) SNP-Applikation war keine signifikante Änderung des Membranpotentials zu verifizieren. Dies weist darauf hin, dass SNP nur in sehr hohen Konzentrationen zu einer geringgradigen Hyperpolarisation führt (**Abbildung 3.12**).

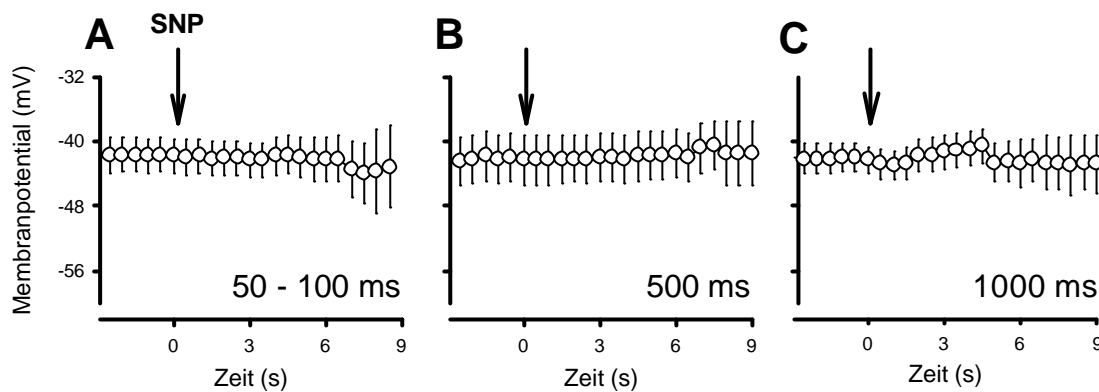


Abbildung 3.12 Membranpotential in EC nach lokaler Stimulation mit SNP bei unterschiedlicher Stimulationsdauer

Dargestellt ist der Zeitverlauf der Membranpotentialänderung in EC nach lokaler Stimulation mit SNP zum Zeitpunkt 0 (Pfeile) bei 50 – 100 ms (A), bei 500 ms (B) und bei 1000 ms Stimulationsdauer (C). Eine signifikante Hyperpolarisation auf SNP war nur bei 1000 ms Stimulationsdauer ($p < 0,05$) zu beobachten. Mittelwerte \pm SEM

3.2.5 Effekt von NO (SNP) auf das Membranpotential in VSM

Bei 13 Messungen des Membranpotentials in 3 Tieren, in denen Gefäße mit SNP stimuliert wurden (Stimulationsdauer 346 ± 75 ms), änderte sich das Membranpotential in VSM nicht signifikant (von $-29,8 \pm 2,1$ mV auf $-30,1 \pm 2,2$ mV, $p = 0,35$). Eine Stimulation mit ACh zeigte in denselben Gefäße wiederum eine deutliche Hyperpolarisation (von $-31,0 \pm 3,2$ mV auf $-34,8 \pm 3,4$ mV, $p < 0,05$, siehe **Abbildung 3.13**).

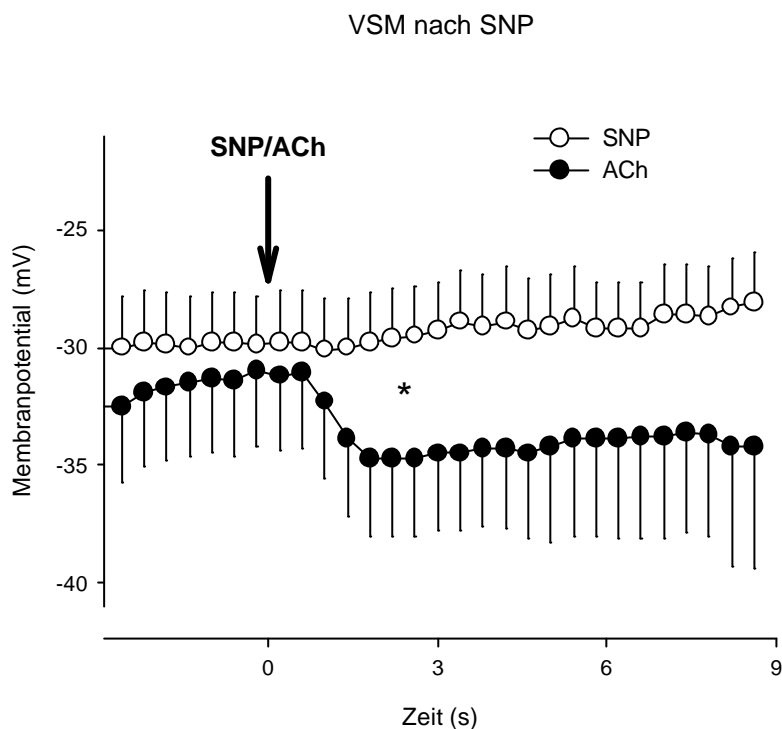


Abbildung 3.13
Membranpotential in VSM
nach lokaler Stimulation
mit SNP

Dargestellt ist das MP in VSM nach lokaler Stimulation mit SNP (10 mmol/L, **weiß**) und mit ACh (10 mmol/L, **schwarz**) jeweils zum Zeitpunkt 0 (Pfeil). Das MP in VSM änderte sich nicht nach Stimulation mit SNP. Die Kontrolle durch Stimulation mit ACh in denselben Gefäßen zeigte signifikante Hyperpolarisationen (*: ACh vs. SNP, $p < 0,05$). Mittelwerte \pm SEM

3.2.6 Lokale Stimulation von EC und VSM in eNOS-defizienten Mäusen (eNOS^{-/-}) mit Acetylcholin

Um zu prüfen, inwieweit die Hyperpolarisationen von der endothelialen NO-Synthase abhängen, wurden Untersuchungen in Mäusen gemacht, welche defizient für die endotheliale NO-Synthase waren (eNOS^{-/-}). In 2 eNOS^{-/-}-Tieren wurden 36 Messungen in EC während einer Stimulation mit ACh (10 mmol/L) gemacht. Diese ergaben im Mittel starke Hyperpolarisationen von $-43,4 \pm 1,1$ mV auf $-55,3 \pm 1,0$ mV (mittlere Stimulationsdauer 901 ± 210 ms, $p < 0,05$). Als Kontrolle wurden 107 Beobachtungen in EC aus 24 C57BL/6-Tieren (eNOS^{+/+}) mit ähnlichen Stimulationszeiten ausgewählt (mittlere Stimulationsdauer: 871 ± 49 ms). Das Membranpotential änderte sich hier im Mittel von $-44,5 \pm 1,0$ mV auf $-54,3 \pm 1,2$ mV ($p < 0,05$). Zwischen der Amplitude der Hyperpolarisation in eNOS^{-/-}-Tieren und der Amplitude der Kontrollgruppe bestand kein signifikanter Unterschied ($11,9 \pm 1,3$ mV vs. $9,8 \pm 0,7$ mV, $p = 0,15$, **Abbildung 3.14**).

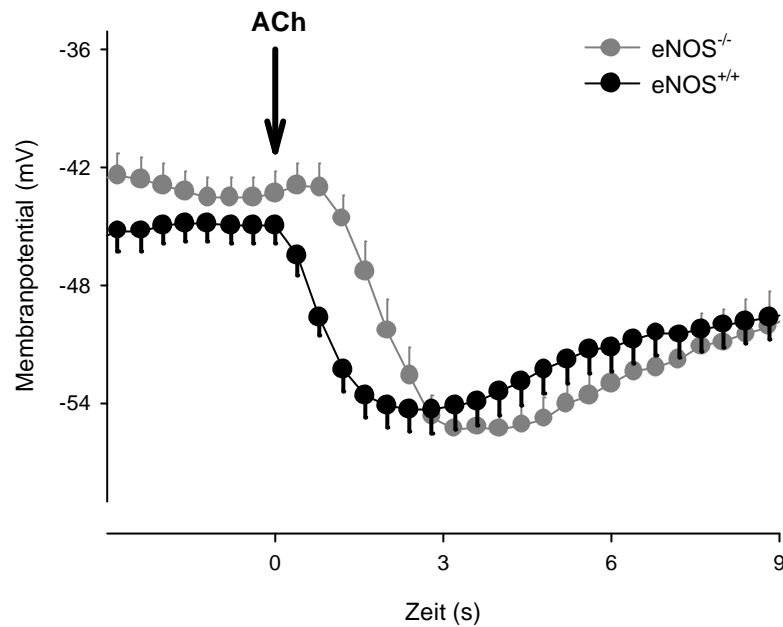


Abbildung 3.14 Zeitlicher Verlauf des Membranpotentials in EC während ACh-Stimulation in eNOS^{-/-} Mäusen

Dargestellt ist das MP in EC in eNOS^{-/-} Mäusen (**grau**) nach lokaler ACh Stimulation (10 mmol/L) zum Zeitpunkt 0 (Pfeil). Sowohl in der eNOS^{-/-}-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe (eNOS^{+/+}, **schwarz**) zeigten sich robuste Hyperpolarisationen, die sich in ihrer maximalen Amplitude nicht signifikant voneinander unterschieden ($p = 0,15$, eNOS^{-/-} vs. eNOS^{+/+}). Mittelwerte \pm SEM

Es wurden einzelne Beobachtungen in VSM von eNOS^{-/-}-Tieren nach ACh-Applikation gemacht. Auch hier konnten Hyperpolarisationen registriert werden. Die Anzahl der Beobachtungen ist jedoch zu gering um einen statistischen Vergleich zu führen. Diese Daten zeigen, dass ACh auch in Abwesenheit der eNOS zu einer Hyperpolarisation in EC und VSM führt.

3.3 Lokale Stimulation mit Acetylcholin nach selektiver Blockade Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle

Hyperpolarisationen können durch Aktivierung von Kalium-Kanälen ausgelöst werden. Eine Gruppe dieser Kanäle, die auch in vaskulären Zellen exprimiert werden, sind die Ca^{2+} -abhängigen Kalium-Kanäle (K_{Ca} -Kanäle). Dabei sind wiederum verschiedene Subtypen dieser Kanäle nach ihrer Leitfähigkeit („conductance“) zu unterscheiden: SK_{Ca} - („small conductance“), IK_{Ca} - („intermediate conductance“) und BK_{Ca} - („large conductance“) Kanäle. Um die Funktion dieser Kanäle in denselben Gefäßen zu untersuchen, wurden verschiedene Toxine eingesetzt, die diese Kanäle blockierten („Blocker“): Charybdotoxin (ChTx), Iberiotoxin (IbTx) und Apamin. Die Blocker wurden mittels Mikropipette (100 $\mu\text{mol/L}$) mehrfach lokal an der Stimulationsstelle der Arteriolen appliziert. Innerhalb der nächsten 30 min wurde das Membranpotential während lokaler ACh-Stimulation registriert. Als Kontrolle dienten jeweils Messungen, die vor der Behandlung mit den Kanalblocker gemacht wurden.

3.3.1 Blockade von BK_{Ca} - und IK_{Ca} -Kanälen mit Charybdotoxin (ChTx)

Um zu untersuchen, welche Rolle den BK_{Ca} - und IK_{Ca} -Kanälen bei der Entstehung von Hyperpolarisationen in EC und VSM zukommt, wurde zunächst die Substanz Charybdotoxin (ChTx) eingesetzt. ChTx ist ein aus dem Skorpion „*Leiurus quinquestriatus*“ gewonnenes Gift, das BK_{Ca} - und IK_{Ca} -Kanäle blockiert. Die gezeigten Daten für EC bzw. VSM sind an denselben Gefäßen erhoben worden.

3.3.1.1 Effekt von ChTx auf endotheliale Hyperpolarisationen

Während Stimulation mit ACh (10 mmol/L , mittlere Stimulationsdauer: 282 ± 33 ms) änderte sich das endotheliale Membranpotential in 206 Beobachtungen in 7 Tieren von $-48,9 \pm 0,6$ mV auf $-59,1 \pm 0,6$ mV. Nun wurde die Arteriole an der Stimulationsstelle lokal mit ChTx (100 $\mu\text{mol/L}$) behandelt und anschließend erneut mit ACh stimuliert. Auch nach ChTx war eine Hyperpolarisation zu beobachten. So änderte sich das endotheliale Membranpotential in 106

Beobachtungen (mittlere Stimulationsdauer: 295 ± 36 ms) signifikant von $-53,5 \pm 1,0$ mV auf $-63,9 \pm 1,1$ mV. Der Vergleich der Amplituden vor und nach ChTx zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,85$). **Abbildung 3.16** zeigt die zusammengefassten Daten im zeitlichen Verlauf sowie die maximalen Amplituden der Hyperpolarisationen nach ACh.

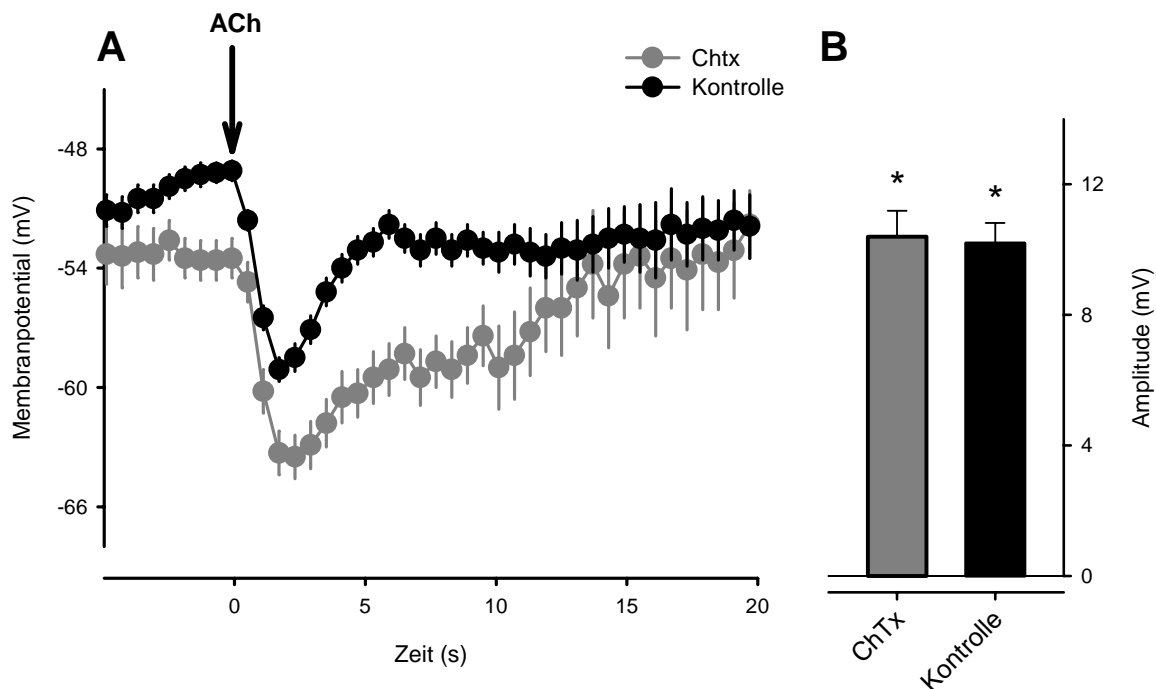


Abbildung 3.16 Änderungen des Membranpotentials in EC während ACh-Stimulation vor und nach Charybdotoxin (ChTx)

In Abbildung A sind die zusammengefassten Membranpotentiale in EC nach ACh-Stimulation (10 mmol/L, Pfeil) vor (**schwarz**, Kontrolle) und nach Applikation von ChTx (**grau**, 100 μ mol/L) dargestellt. In Abbildung B wird jeweils die maximale Amplitude gezeigt. Sowohl vor (**schwarz**; *: $p < 0,05$ vs. MP_0), als auch nach ChTx (**grau**, *: $p < 0,05$ vs. MP_0) waren signifikante Hyperpolarisationen auf ACh zu messen. Die Amplituden unterschieden sich nicht voneinander ($p = 0,85$).

$n = 106$ (ChTx), $n = 206$ (Kontrolle) in 7 Tieren, Mittelwerte \pm SEM

3.3.1.2 Effekt von ChTx auf Hyperpolarisationen in VSM

In 36 beobachteten VSM (6 Tiere) betrug das mittlere Membranpotential $-43,2 \pm 1,3$ mV, das sich während lokaler ACh-Stimulation (10 mmol/L; mittlere Stimulationsdauer: 140 ± 27 ms) auf $-47,8 \pm 1,5$ mV änderte ($p < 0,05$). In denselben Versuchstieren wurden nach lokaler Applikation von ChTx (100 μ mol/l) 27 Beobachtungen in VSM während erneuter ACh-Applikation (mittlere Stimulationszeit: 354 ± 56 ms) gemacht. Das Membranpotential von $-37,0 \pm 1,3$

mV änderte sich nach Stimulation mit Ach nicht mehr ($-37,5 \pm 1,3$ mV, $p = 0,10$). Die Amplitude der Hyperpolarisation in VSM nach ChTx-Behandlung war somit signifikant kleiner als in der Kontrolle (**Abbildung 3.17**). Die Daten sind in **Abbildung 3.17** im zeitlichen Verlauf und bezüglich der Amplitude illustriert.

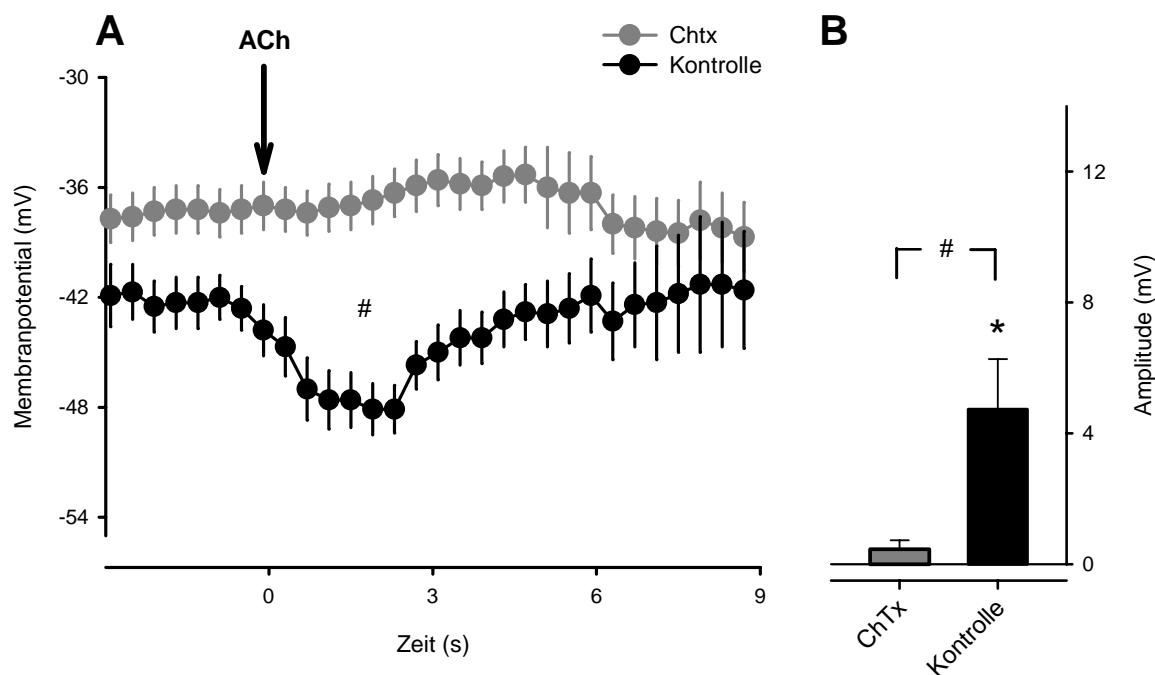


Abbildung 3.17 Änderungen des Membranpotentials in VSM während ACh-Stimulation vor und nach Charybdotoxin (ChTx)

In **Abbildung A** sind die zusammengefassten Membranpotentiale in VSM nach ACh-Stimulation (10 mmol/L, Pfeil) vor (**schwarz**, Kontrolle) und nach Applikation von ChTx (**grau**, 100 μ mol/L) dargestellt. In **Abbildung B** werden die maximalen Amplituden gezeigt. Vor ChTx (**schwarz**) waren signifikante (*: $p < 0,05$ vs. MP_0) Hyperpolarisationen während ACh-Stimulation zu beobachten. Nach ChTx-Behandlung (**grau**) waren keine signifikanten Hyperpolarisationen mehr messbar ($p = 0,10$ vs. MP_0). Der Vergleich der Amplituden zeigt die effektive Blockade der Hyperpolarisationen in VSM durch ChTx (#: $p < 0,05$ vs. Kontrolle). $n = 27$ (ChTx), $n = 36$ (Kontrolle) in 6 Tieren, Mittelwerte \pm SEM

3.3.2 Blockade von BK_{Ca} -Kanälen mit Iberiotoxin (IbTx)

In einer weiteren Versuchsserie wurde ein selektiver BK_{Ca} -Kanalblocker eingesetzt. Iberiotoxin (IbTx) ist wie ChTx ein Skorpiongift. Es weist mit ChTx eine Sequenz-Homologie von 68% auf und wird aus der Skorpionart „Buthus tannilus“ gewonnen. Dabei hat es auf IK_{Ca} -Kanäle kaum Einfluss und ist damit selektiver als ChTx. Auch hierbei sind die unten dargestellten Daten für Endothelzellen und glatte Muskelzellen in denselben Gefäßen erhoben worden.

3.3.2.1 Effekt von IbTx auf endotheliale Hyperpolarisationen

Unter Kontrollbedingungen wurden 64 Beobachtungen in EC (5 Tiere) während lokaler Stimulation mit ACh (10 mmol/l, mittlere Stimulationsdauer: 416 ± 66 ms) aufgenommen. Dabei änderte sich das Membranpotential von $-45,7 \pm 1,5$ mV auf $-53,5 \pm 1,8$ mV. Nach lokaler Behandlung der Arteriolen an der ACh-Stimulationsstelle mit IbTx (100 μ mol/l) hyperpolarisierten die Endothelzellen (70 Beobachtungen) weiterhin signifikant auf ACh (mittlere Stimulationsdauer: 432 ± 71 ms) von $-55,2 \pm 1,1$ mV auf $-68,2 \pm 1,0$ mV ($p < 0,05$). Dabei war die Amplitude der Hyperpolarisation nach IbTx-Behandlung sogar größer als unter Kontrollbedingungen ($p < 0,05$, **Abbildung 3.18**).

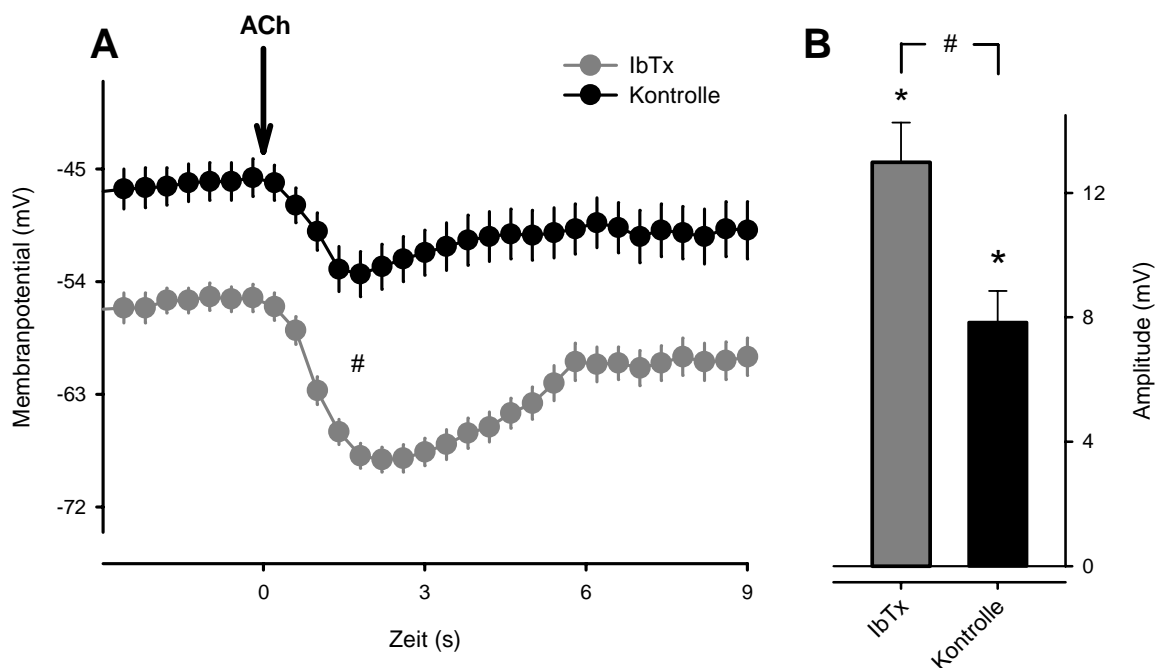


Abbildung 3.18 Änderungen des Membranpotentials in EC während ACh-Stimulation vor und nach Iberiotoxin (IbTx)

In **Abbildung A** ist der zeitliche Verlauf der Membranpotentiale in EC nach ACh-Stimulation (10 mmol/L, Pfeil) vor (**schwarz**, Kontrolle) und nach der Applikation von IbTx (**grau**, 100 μ mol/l) gezeigt.

In **Abbildung B** sind die maximalen Membranpotentialunterschiede dargestellt. Sowohl unter Kontrollbedingungen (**schwarz**) als auch nach IbTx-Behandlung (**grau**) waren signifikante Hyperpolarisationen zu beobachten (*: $p < 0,05$ vs. MP_0). Der Vergleich der Amplituden zeigt, dass nach IbTx-Behandlung eine stärkere Hyperpolarisation auftrat als unter Kontrollbedingungen (#: $p < 0,05$).

$n = 70$ (IbTx), $n = 64$ (Kontrolle) in 5 Tieren, Mittelwerte \pm SEM

3.3.2.2 Effekt von IbTx auf Hyperpolarisationen in VSM

In den Versuchen, in denen das Potential der VSM gemessen wurde, hatte IbTx ähnliche Effekte wie zuvor ChTx. Unter Kontrollbedingungen wurden 24 Beobachtungen in VSM (4 Tiere) während lokaler ACh-Stimulation (10 mmol/L, mittlere Stimulationsdauer: 635 ± 114 ms) aufgezeichnet. Das Membranpotential änderte sich signifikant von $-32,1 \pm 1,8$ auf $-35,7 \pm 1,7$ mV ($p < 0,05$). Nach lokaler Behandlung mit IbTx (100 μ mol/L) und erneuter Stimulation mit ACh (mittlere Stimulationsdauer 566 ± 62 ms), konnten in 41 Beobachtungen keine Hyperpolarisationen mehr registriert werden (**Abbildung 3.19**). Zum Zeitpunkt, an dem unter Kontrollbedingungen das Hyperpolarisationsmaximum auftrat war nach IbTx keine Änderung des Potentials zu erkennen (von $-31,0 \pm 0,9$ auf $-30,8 \pm 0,9$, $p = 0,12$).

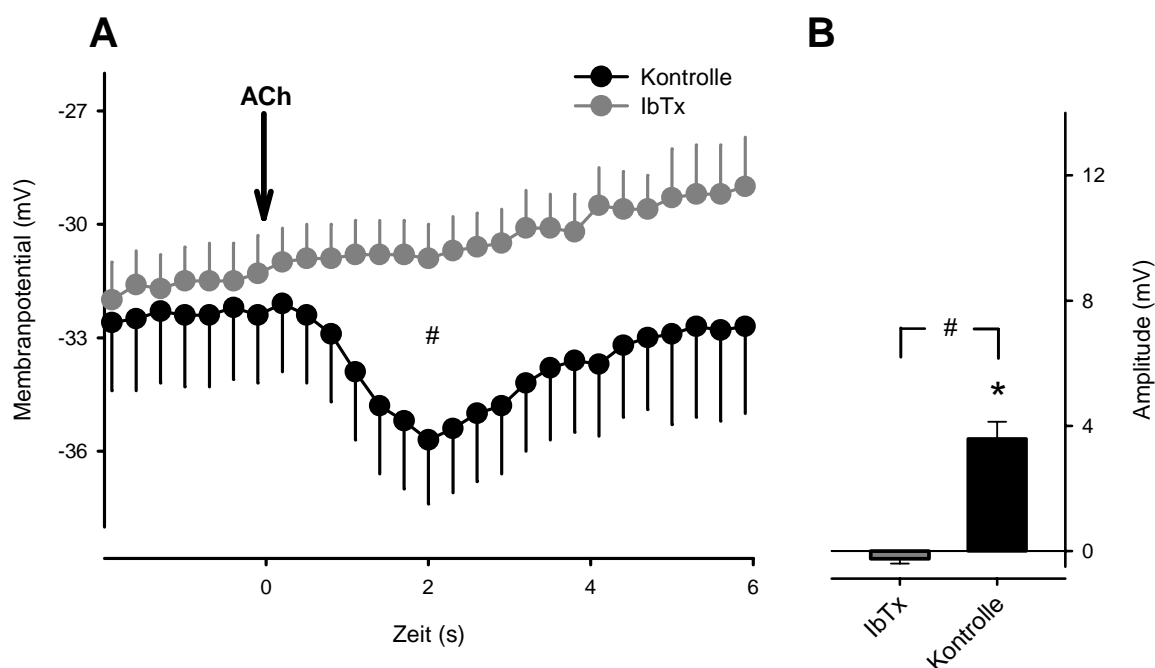


Abbildung 3.19 Änderungen des Membranpotentials in VSM während ACh-Stimulation vor und nach Iberiotoxin (IbTx)

In **Abbildung A** sind die zusammengefassten Membranpotentiale während ACh-Stimulation (10 mmol/L, Pfeil) in VSM im zeitlichen Verlauf vor (**schwarz**, Kontrolle) sowie nach der Applikation von IbTx (**grau**, 100 μ mol/L) dargestellt. In **Abbildung B** werden die dazugehörigen maximalen Membranpotentialunterschiede gezeigt. Während VSM unter Kontrollbedingungen (**schwarz**) signifikant hyperpolarisierten (*: $p < 0,05$ vs. MP_0), waren zum selben Zeitpunkt nach IbTx-Behandlung (**grau**) keine signifikanten Potentialänderungen mehr zu messen ($p = 0,12$ vs. MP_0). IbTx führte zu einer Blockade der Hyperpolarisationen während ACh-Stimulation (#: $p < 0,05$ vs. Kontrolle).

$n = 41$ (IbTx), $n = 24$ (Kontrolle) in 4 Tieren, Mittelwerte \pm SEM

3.3.3 Blockade von SK_{Ca}-Kanälen mit Apamin

Apamin ist ein kleines Polypeptid und ein Bestandteil eines Bienengiftes. Es hat eine hohe Affinität zu SK_{Ca}-Kanälen und blockiert diese selektiv. Die Daten für die hier angegebenen Potentialmessungen in Endothelzellen und glatten Muskelzellen sind wieder in denselben Gefäßen erhoben worden.

3.3.3.1 Effekt von Apamin auf endotheliale Hyperpolarisationen

Zunächst wurden in 6 Tieren 61 Beobachtungen in EC nach ACh (10 mmol/L, mittlere Stimulationsdauer: 612 ± 87 ms) gemacht. Unter Kontrollbedingungen mit ACh konnte eine signifikante endotheliale Hyperpolarisation gemessen werden (von $-43,5 \pm 0,9$ mV auf $-50,3 \pm 1,1$ mV, $p < 0,05$). **Abbildung 3.20** zeigt, dass die Hyperpolarisationen während ACh-Stimulation (mittlere Stimulationsdauer: 1320 ± 94 ms) nach lokaler Behandlung der Arteriolen mit Apamin (100 μ mol/L) an der ACh-Stimulationsstelle vollständig blockiert wurden. In denselben Tieren konnte jetzt in 89 Beobachtungen in EC keine signifikante Änderung des Membranpotentials von $-42,3 \pm 1,0$ mV auf $-42,8 \pm 1,1$ mV ($p = 0,12$) registriert werden. Die maximale Amplitude unter Kontrollbedingungen ($6,7 \pm 0,7$ mV) war nach Apamin-Behandlung ($0,5 \pm 0,3$ mV) komplett aufgehoben.

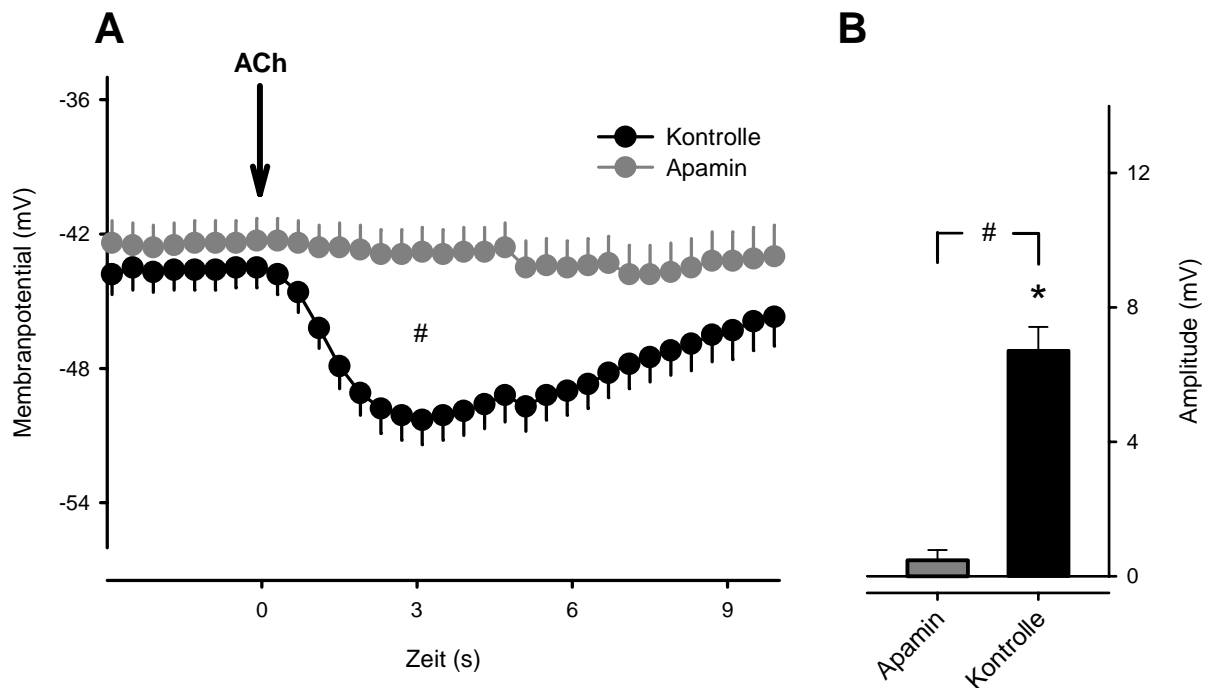


Abbildung 3.20 Änderungen des Membranpotentials in EC während ACh-Stimulation vor und nach Apamin

Abbildung **A** zeigt die Membranpotentiale in EC während ACh-Stimulation (10 mmol/L, Pfeil) vor (**schwarz**, Kontrolle) sowie nach der Behandlung mit Apamin (**grau**, 100 μ mol/L). Die Hyperpolarisation unter Kontrollbedingungen (*: $p < 0,05$ vs. MP_0) war nach Apamin-Applikation nicht mehr messbar. In Abbildung **B** sind die daraus berechneten maximalen Membranpotentialunterschiede dargestellt. Unter Kontrollbedingungen (**schwarz**) konnte mit ACh signifikante Hyperpolarisationen ausgelöst werden (*: $p < 0,05$ vs. MP_0), wohingegen nach Apamin-Behandlung (**grau**) das MP zum selben Zeitpunkt nach ACh-Applikation unverändert war ($p = 0,12$ vs. Kontrolle). Der Unterschied zwischen den Amplituden war signifikant (#: $p < 0,05$).

$n = 89$ (Apamin), $n = 61$ (Kontrolle) in 6 Tieren, Mittelwerte \pm SEM

3.3.3.2 Effekt von Apamin auf Hyperpolarisationen in VSM

Das Membranpotential hyperpolarisierte in 13 VSM (4 Tiere) unter Kontrollbedingungen während ACh-Stimulation (10 mmol/L, mittlere Stimulationsdauer: 608 ± 147 ms) von $-38,8 \pm 2,6$ mV auf $-43,1 \pm 3,0$ mV ($p < 0,05$). Nach lokaler Behandlung mit Apamin (100 μ mol/L) konnte ACh (mittlere Stimulationsdauer: 727 ± 79 ms) in denselben Gefäße weiterhin signifikante Hyperpolarisationen in 11 VSM auslösen (von $-35,4 \pm 1,2$ mV auf $-39,4 \pm 1,3$ mV, $p < 0,05$). Die maximale Amplitude unterschied sich nicht von derjenigen vor Apamin-Behandlung ($p = 0,84$), wurde jedoch erst 0,8 s später erreicht (**Abbildung 3.21**).

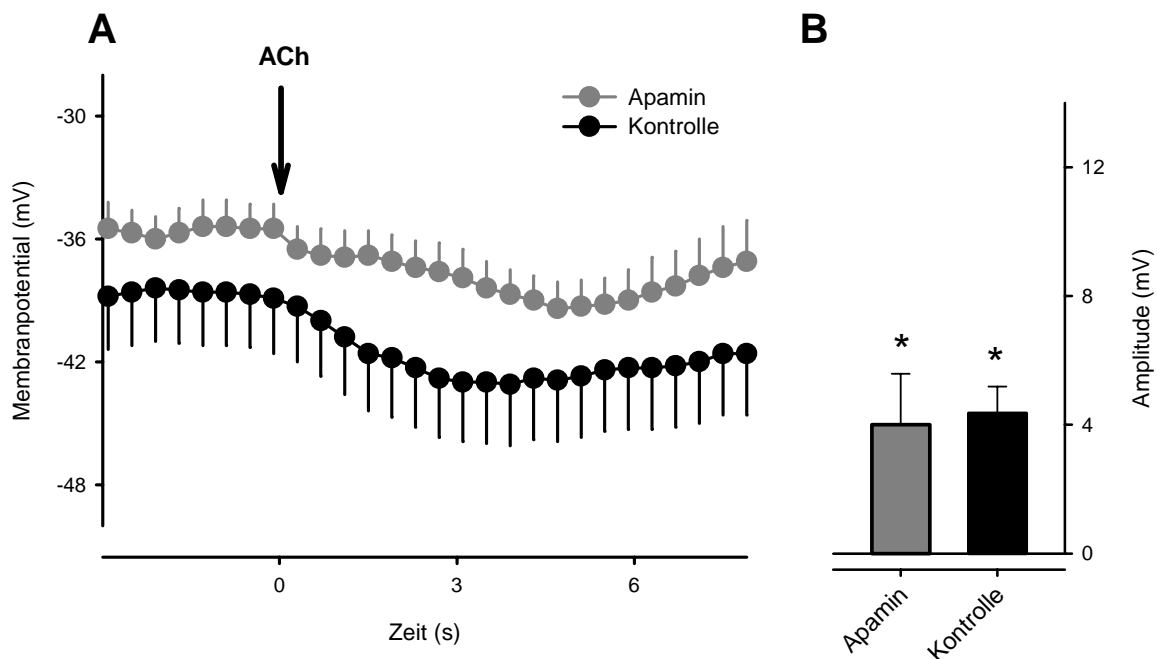


Abbildung 3.21 Änderungen des Membranpotentials in VSM nach ACh-Stimulation vor und nach Apamin

In Abbildung A sind die Membranpotentials in VSM während lokaler ACh-Stimulation (10 mmol/L, Pfeil) vor (**schwarz**, Kontrolle) sowie nach der Behandlung mit Apamin (**grau**, 100 μ mol/L) dargestellt. Das Maximum der Hyperpolarisation wurde nach Apamin später erreicht (0,8 s). Abbildung B stellt die maximalen Amplituden dar. Sowohl vor (**schwarz**) als auch nach Apamin-Behandlung (**grau**) war eine signifikante Änderung zu beobachten (*: $p < 0,05$). Die Amplituden unterschieden sich nicht voneinander ($p = 0,84$).

$n = 11$ (Apamin), $n = 13$ (Kontrolle) in 4 Tieren, Mittelwerte \pm SEM

3.3.4 Membranpotential nach Behandlung mit K^+ -Kanalblockern

In **Abbildung 3.22** sind die Mittelwerte des Membranpotentials von EC und VSM jeweils vor sowie nach der Behandlung mit den K^+ -Kanalblockern ChTx, IbTx und Apamin dargestellt. In EC führte die Applikation der Blocker zu keiner signifikanten Änderung des Membranpotentials. In VSM führte lediglich die Applikation von ChTx zu einer signifikanten Depolarisation der Zellen und Apamin änderte das Membranpotential nicht.

Diese Messungen wurden jedoch nicht kontinuierlich während der Applikation der Substanzen durchgeführt und aufgrund der Variation der Membranpotentials zwischen den einzelnen Messungen können kleine

Änderungen des Membranpotentials nach Applikation der Blocker nicht verifiziert werden.

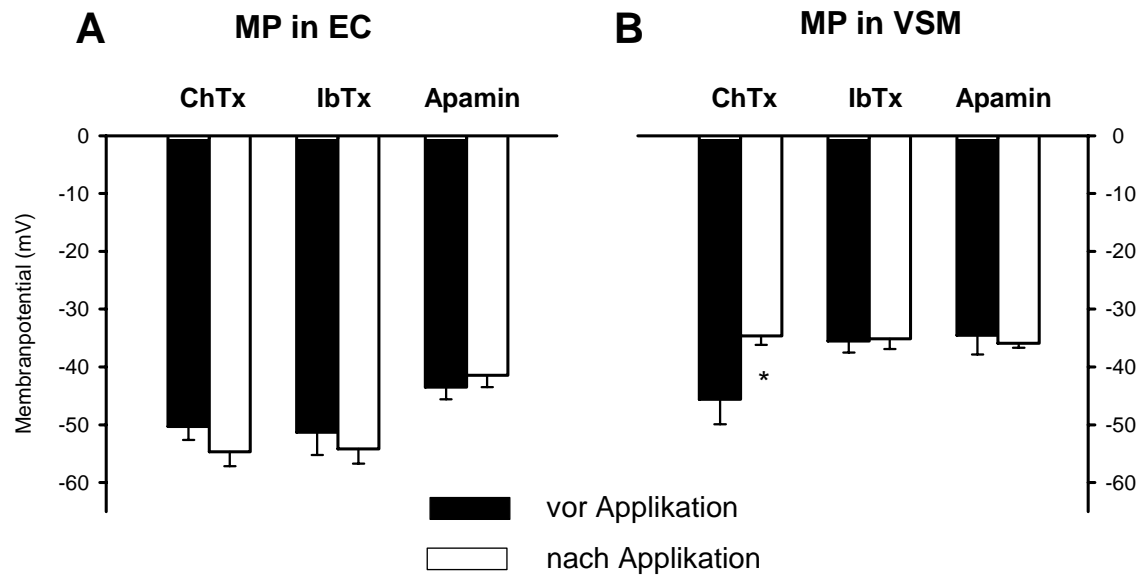


Abbildung 3.22 Membranpotential (MP) von EC und VSM vor und nach Behandlung mit K⁺-Kanalblockern

In Abbildung A sind die Membranpotentiale in EC dargestellt. Nach Applikation von ChTx, IbTx, oder Apamin (**weiße Balken**) änderte sich das MP nicht gegenüber dem jeweiligen Ausgangswert (**schwarze Balken**).

In Abbildung B sind die MP von VSM dargestellt. Während IbTx und Apamin zu keiner Änderung des MP führten, depolarisierte ChTx die VSM (*: $p < 0,05$). Mittelwerte \pm SEM

3.4 Ausbreitung ACh-induzierter Hyperpolarisationen entlang der Arteriole

3.4.1 Endotheliale Membranpotentialänderungen nach Acetylcholin in Abhängigkeit von der Entfernung

Die Kommunikation zwischen Zellen der Gefäßwand stellt einen wichtigen Aspekt bei der Koordination von Gefäßfunktionen in der Mikrozirkulation dar. Lokal ausgelöste Hyperpolarisationen können sich über Gap Junctions entlang der Arteriole ausbreiten. Um dies zu untersuchen, wurde die Messelektrode in unterschiedlicher Entfernung von der Stimulationspipette platziert. Hierzu wurde in einer Gruppe mit niedriger und in einer zweiten Gruppe mit hoher ACh-Konzentration (unterschiedliche Stimulationsdauer bei je 10 mmol/l) stimuliert und das Membranpotential in EC registriert. Die mittlere Stimulationsdauer in der ersten Gruppe betrug an den verschiedenen Messpositionen zwischen 30 und 40 ms. 21 Beobachtungen in EC (10 Tiere) wurden in einer mittleren Entfernung von $236 \pm 39 \mu\text{m}$ zur ACh-Stimulationsstelle gemessen. Nach $2,3 \pm 0,2 \text{ s}$ wurde die maximale Amplitude von $10,5 \pm 1,3 \text{ mV}$ registriert. Nach $8,5 \pm 0,9 \text{ s}$ war das Ausgangspotential wieder erreicht. Wurde in einer mittleren Entfernung von $724 \pm 37 \mu\text{m}$ gemessen (23 Beobachtungen in EC in 8 Tieren), so betrug die Amplitude nur noch maximal $7,5 \pm 1,0 \text{ mV}$ ($p = 0,07$ vs. $236 \mu\text{m}$). Die Dauer der Hyperpolarisation verringerte sich signifikant auf $5,3 \pm 0,4 \text{ s}$ ($p < 0,05$ vs. $236 \mu\text{m}$), während das Maximum nach $2,3 \pm 0,2 \text{ s}$ ($p = 0,89$ vs. $236 \mu\text{m}$) erreicht wurde. In einer noch größeren Entfernung ($1047 \pm 18 \mu\text{m}$) betrug die Amplitude (19 Beobachtungen in EC in 4 Tieren) nur noch $4,5 \pm 0,7 \text{ mV}$ ($p < 0,05$ vs. $236 \mu\text{m}$, $p < 0,05$ vs. $724 \mu\text{m}$), die nach $2,0 \pm 0,1 \text{ s}$ ($p = 0,20$ vs. $236 \mu\text{m}$, $p = 0,31$ vs. $724 \mu\text{m}$) erreicht wurde. Die Zeit bis zur vollständigen Rückkehr verkürzte sich auf $3,5 \pm 0,2 \text{ s}$ ($p < 0,05$ vs. $236 \mu\text{m}$, $p < 0,05$ vs. $724 \mu\text{m}$). Diese Daten sind in **Abbildung 3.23** im zeitlichen Verlauf dargestellt und werden in **Abbildung 3.25** mit den Daten bei höherer ACh-Konzentration verglichen.

Ähnliche Effekte konnten auch bei höherer lokaler ACh-Konzentration beobachtet werden (**Abbildung 3.24**). Die mittlere ACh-Stimulationsdauer in dieser Gruppe lag zwischen 1000 und 1300 ms. Betrug die mittlere Entfernung $259 \pm 46 \mu\text{m}$ (16 Beobachtungen in EC in 10 Tieren), so wurde eine maximale

niedrige ACh-Konzentration

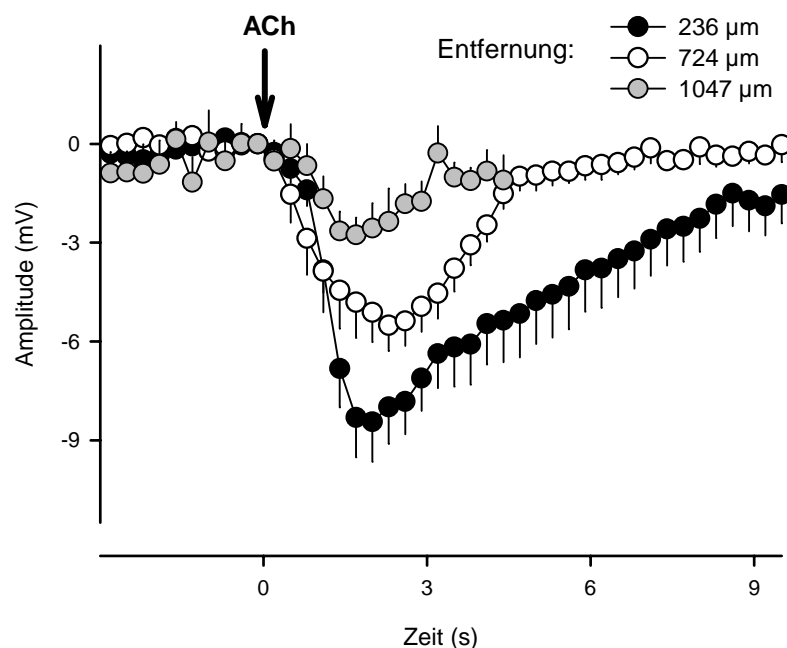


Abbildung 3.23 Zeitlicher Verlauf des Membranpotentials in EC in unterschiedlicher Entfernung bei niedriger lokaler ACh-Konzentration

Dargestellt ist das Membranpotential in EC während ACh-Stimulation mit niedriger Konzentration (mittlere Stimulationsdauer: 30 -40 ms, Pfeil) in 236 μm (**schwarz**), 724 μm (**weiß**) und 1047 μm (**grau**) Entfernung. Je größer die Entfernung von der Stimulationsstelle, desto kleiner wurde die Amplitude der Hyperpolarisation.

236 μm : n = 21 in 10 Tieren, 724 μm : n = 23 in 8 Tieren, 1047 μm : n = 19 in 4 Tieren, Mittelwerte \pm SEM

Membranpotentialänderung von $14,2 \pm 2,3$ mV nach $4,0 \pm 0,5$ s gemessen. Das Ausgangspotential war nach $24,6 \pm 2,0$ s wieder erreicht. In einer Entfernung von 738 ± 55 μm (20 Beobachtungen in EC in 9 Tieren) wurde nach $3,0 \pm 0,2$ s ($p = 0,10$ vs. 259 μm) eine Amplitude von $9,7 \pm 1,1$ mV ($p = 0,09$ vs. 259 μm) registriert. Die Dauer der Hyperpolarisation war mit $18,5 \pm 1,7$ s signifikant kürzer als in 259 μm Entfernung ($p < 0,05$). In der größten Entfernung (1180 ± 41 μm) wurden 15 Beobachtungen in EC (4 Tiere) registriert. Wie in der Gruppe, in der die niedrige ACh-Konzentration zur Stimulation verwendet wurde, war auch hier die Amplitude in der größten Entfernung signifikant verringert ($7,1 \pm 1,1$ mV, $p < 0,05$ vs. 259 μm , $p = 0,10$ vs. 738 μm). Bei der Dauer bis zum Erreichen des Maximums der Hyperpolarisation ($2,8 \pm 0,1$ s) gab es keine Unterschiede zu den anderen Entfernungen ($p = 0,09$ vs. 259 μm , $p = 0,32$ vs. 738 μm). Auch die Dauer der Hyperpolarisation, die in 1180 μm Entfernung nur noch $11,5 \pm 1,0$ s

betrug ($p < 0,05$ vs. $259 \mu\text{m}$, $p < 0,05$ vs. $738 \mu\text{m}$), war in größerer Entfernung signifikant verkürzt.

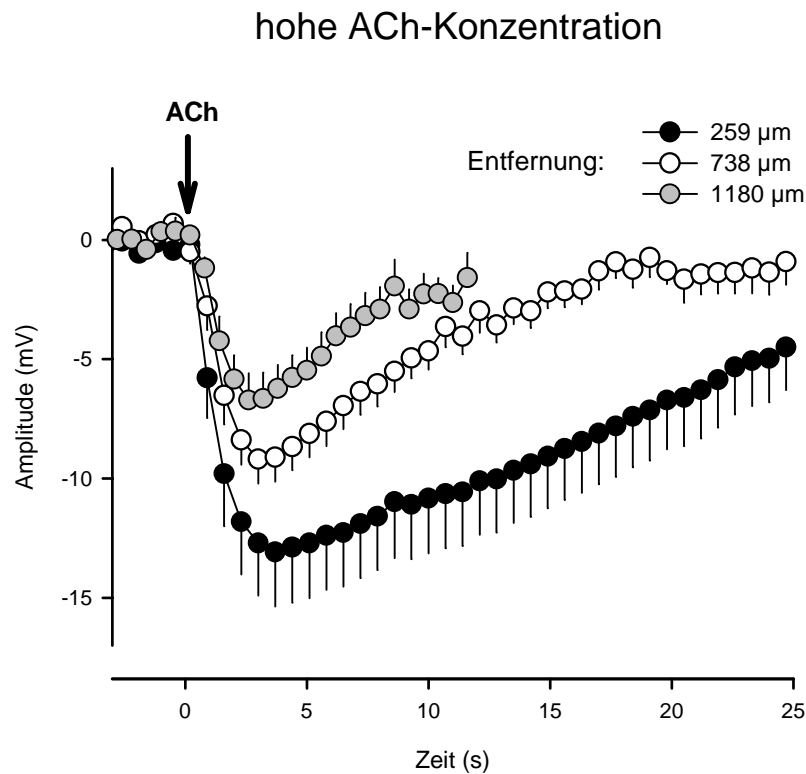


Abbildung 3.24 Zeitlicher Verlauf des Membranpotentials in EC in unterschiedlicher Entfernung bei hoher ACh-Konzentration

Dargestellt ist das Membranpotential in EC während ACh-Stimulation mit hoher Konzentration (mittlere Stimulationsdauer: 1000 – 1300 ms, Pfeil) in $259 \mu\text{m}$ (**schwarz**), $738 \mu\text{m}$ (**weiß**) und $1180 \mu\text{m}$ (**grau**) Entfernung. Ähnlich wie bei der Stimulation mit niedriger ACh-Konzentration wurden auch hier mit zunehmender Entfernung die Amplituden der Hyperpolarisation kleiner. $259 \mu\text{m}$: $n = 16$ in 10 Tieren, $738 \mu\text{m}$: $n = 20$ in 9 Tieren, $1180 \mu\text{m}$: $n = 15$ in 4 Tieren

In **Abbildung 3.25** sind die verschiedenen Parameter an den untersuchten Messpunkten für die unterschiedlichen ACh-Konzentrationen einander gegenübergestellt. Die Abbildung zeigt, dass die maximale Amplitude mit zunehmender Entfernung in beiden Gruppen abnahm. Auch die Dauer der Hyperpolarisation nahm sowohl bei niedriger als auch bei hoher ACh-Konzentration mit zunehmender Entfernung ab. Die Dauer der Hyperpolarisation war bei hoher ACh-Konzentration im Vergleich zur niedrigen ACh-Konzentration in denselben Entfernungen jeweils signifikant länger.

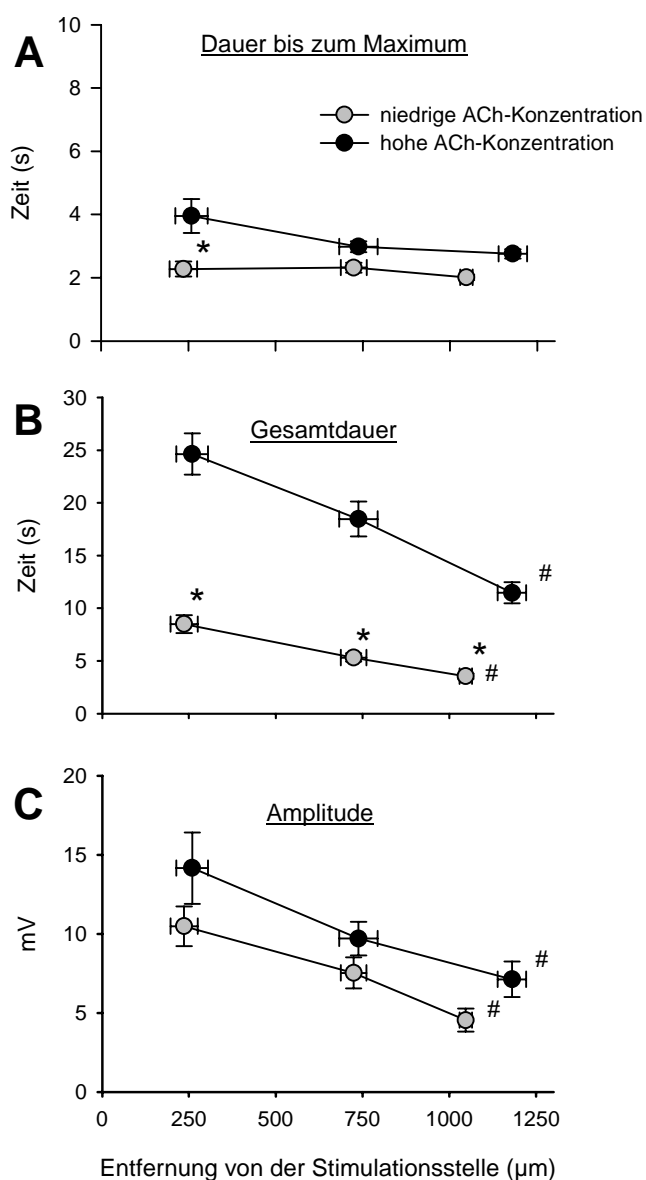


Abbildung 3.25 Vergleich der Antworten in EC entlang der Arteriole

Dargestellt ist die Dauer bis zum Maximum der Hyperpolarisation (A), die Dauer der Hyperpolarisation (B) und die maximale Amplitude (C) jeweils getrennt für die Stimulation mit hoher (schwarz) oder niedriger (grau) ACh-Konzentration in unterschiedlichen Entfernungen.

*: $p < 0,05$ vs. hohe ACh-Konzentration

#: $p < 0,05$ vs. kürzeste Entfernung

Mittelwerte \pm SEM

A: In der kürzesten und mittleren Entfernung dauerte es bei hoher Konzentration länger bis das Maximum der Hyperpolarisation erreicht wurde als bei niedriger Konzentration.

B: Wurde mit hoher Konzentration stimuliert, war die Dauer der Hyperpolarisation in allen Entfernungen länger. In beiden Fällen nahm die Dauer mit zunehmender Entfernung ab.

C: Die Amplitude der Hyperpolarisation unterschied sich nicht zwischen hoher und niedriger Konzentration. Mit zunehmender Entfernung nahm die Amplitude bei beiden Konzentrationen ab. Es lassen sich aber auch in Entfernungen von mehr als 1000 μm noch signifikante Hyperpolarisationen nachweisen.

3.4.2 Membranpotentialänderungen in VSM nach Acetylcholin in

Abhängigkeit von der Entfernung

ACh-induzierte Hyperpolarisationen waren auch in VSM in der Entfernung zu registrieren. Aufgrund der wesentlich geringeren Zahl von Messungen konnten die Daten nicht nach unterschiedlichen Stimulationsdauern aufgeschlüsselt werden. Zur Auswertung wurden folgende Daten herangezogen: 9 Beobachtungen in 4 Mäusen in einer mittleren Entfernung von $244 \pm 28 \mu\text{m}$ von der ACh-Stimulationsstelle (mittlere Stimulationsdauer: $223 \pm 49 \text{ ms}$), 17 Beobachtungen in 4 Mäusen in einer mittleren Entfernung von $706 \pm 6 \mu\text{m}$ (mittlere Stimulationsdauer: $447 \pm 129 \text{ ms}$) und 10 Beobachtungen in 5 Mäusen

in einer mittleren Entfernung von $980 \pm 29 \mu\text{m}$ (mittlere Stimulationsdauer: $515 \pm 187 \text{ ms}$). Die Amplitude der Hyperpolarisation nahm mit größerer Entfernung tendenziell geringfügig ab, ein Unterschied ließ sich jedoch auf dem Signifikanzniveau nicht sichern. Aufgrund der geringen Zahl von ausreichend langen Beobachtungen wurde auf die Analyse der Dauer der Hyperpolarisation verzichtet.

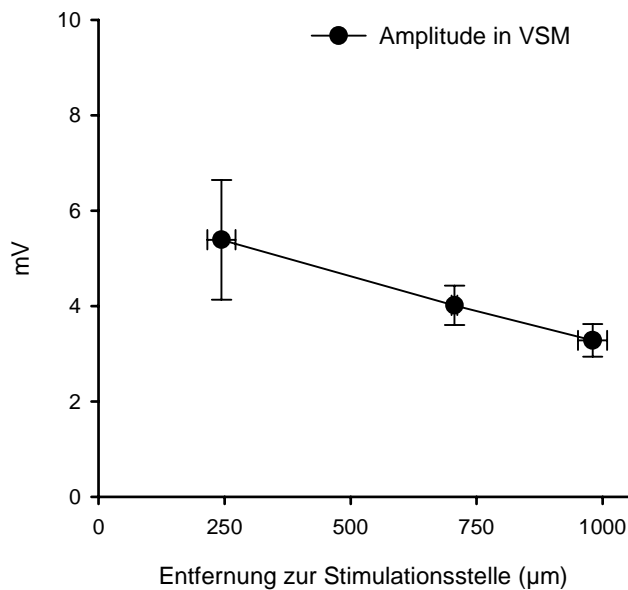


Abbildung 3.26 Amplitude der Hyperpolarisation während ACh-Stimulation in VSM in unterschiedlichen Entfernungen

Während Stimulation der Arteriolen mit ACh (10 mmol/L) konnten auch noch in einer Entfernung von $980 \mu\text{m}$ Hyperpolarisationen registriert werden. Mit zunehmender Entfernung nahm die Amplitude tendenziell ab, der Unterschied war aber nicht signifikant. $244 \mu\text{m}$: $n = 9$ Beobachtungen in VSM in 4 Mäusen
 $706 \mu\text{m}$: $n = 17$ Beobachtungen in VSM in 4 Mäusen
 $980 \mu\text{m}$: $n = 10$ Beobachtungen in VSM in 5 Mäusen
Mittelwerte \pm SEM

4 DISKUSSION

4.1 Intravitale Membranpotentialmessung in der Mikrozirkulation der Maus – Farbstoffkopplung und Membranpotential

Die Organdurchblutung von Säugetieren wird durch den Durchmesser und damit den Widerstand der Blutgefäße bestimmt. Der größte Widerstand ist in den kleinen Arterien und Arteriolen der Mikrozirkulation zu finden. Neben zentralen Regulationsmechanismen kommt vor allem den endothelabhängigen Mechanismen zur Regulation des Gefäßtonus eine herausragende Bedeutung zu. Zahlreiche Befunde zeigen die Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandinen bei der endothelabhängigen Vasodilatation. In den letzten Jahren rückte ein „dritter Weg“ der endothelabhängigen Tonusregulation durch einen endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in den Mittelpunkt. Dabei ist eine Änderung des endothelialen und glattmuskulären Membranpotentials eine wichtige Zielgröße dieses Mechanismus.

In dieser Arbeit wurden Membranpotentiale in Endothelzellen und glatten Muskelzellen unter Ruhebedingungen und während Stimulation mit Acetylcholin in kleinen Arteriolen der Cremastermikrozirkulation in Mäusen gemessen. Durch Applikation spezifischer Blocker von Ca^{2+} -abhängigen K^{+} -Kanälen sollten die an der Hyperpolarisation beteiligten Kanäle identifiziert werden. Schließlich sollte die Fortleitung der Hyperpolarisationen entlang der Arteriolen untersucht werden. Dabei stand im Vordergrund die Messungen *in vivo* durchzuführen um sämtliche Einflussfaktoren der Durchblutungsregulation, wie sie unter physiologischen Bedingungen vorkommen, zu berücksichtigen.

Zunächst wurden die verschiedenen Zelltypen anhand ihrer Morphologie nach Anfärbung mit Carboxyfluorescein, einem anionischen Farbstoff, identifiziert und das Membranpotential registriert. Aus Kenntnissen der Histologie und Befunden anderer Autoren konnten die gefärbten Zellen eindeutig zugeordnet werden: Endothelzellen sind längs zum Gefäßverlauf an der Gefäßinnenwand angeordnet, glatte Muskelzellen legen sich außen zirkulär um die Endothelzellen

(Uehara *et al.*; Segal und Bény, 1992; Welsh und Segal, 1998; Emerson und Segal, 2000b). Benutzt man Farbstoffe wie Carboxyfluorescein, welche die Zellmembran durch Gap Junctions passieren können, kann man zudem anhand ihrer Verteilung Hinweise auf die zelluläre Kopplung gewinnen. Nach Punktion von Endothelzellen zeigte sich in wenigen Fällen (< 5%) eine homozelluläre Farbstoffausbreitung in benachbarte Endothelzellen, jedoch nicht in glatte Muskelzellen. Wurden glatte Muskelzellen punktiert, konnte weder eine homozelluläre, also in benachbarte glatte Muskelzellen, noch eine heterozelluläre Ausbreitung in Endothelzellen beobachtet werden. Little *et al.* prüften *in vitro* die zelluläre Kopplung in Arteriolen des Backentaschenmuskels von Hamstern mit unterschiedlichen Farbstoffen (Little *et al.*, 1995a). Neutrale Farbstoffe (Biocytin), kationische Farbstoffe (Ethidiumbromid) und der anionische Farbstoff Carboxyfluorescein zeigten eine gute homozelluläre Kopplung zwischen Endothelzellen und etwas eingeschränkt auch zwischen glatten Muskelzellen, sowie eine streng unidirektionale Farbstoffausbreitung von Endothelzellen in anliegende glatte Muskelzellen. Dies zeigt, dass die Permeabilität der Farbstoffe durch Gap Junctions - zumindest *in vitro* - nicht primär von ihrer Ladung abhängig ist. Der wie Carboxyfluorescein ebenfalls anionische Farbstoff Lucifer Yellow zeigte *in vitro* ausschließlich eine interendotheliale Ausbreitung, obwohl Ladung und Molekülgröße ähnlich zu Carboxyfluorescein sind. Die Autoren sehen eine mögliche Erklärung für die ausschließlich endothelial-homozelluläre Kopplung von Lucifer Yellow in der Bindung von Sulfatgruppen an glattmuskuläre Gap Junctions, was zu einer selektiven Blockade der Ausbreitung führt. Die Diskrepanz zwischen der Arbeit von Little *et al.* und der vorliegenden Arbeit im Falle von Carboxyfluorescein könnte in Unterschieden zwischen den Spezies, dem untersuchten Gefäßbett, der Gefäßgröße oder aber zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Bedingungen liegen. Ein eindrucksvolles Beispiel für letzteres zeigen Befunde an Arteriolen des Backentaschenmuskels von Hamstern. Während Xia *et al.* an isolierten Arteriolen Hinweise für eine elektrische myoendotheliale Kopplung fanden, konnten Welsh und Segal unter *in vivo*-Bedingungen diese myoendotheliale Kopplung nicht bestätigen (Xia *et al.*, 1995; Welsh und Segal, 1998). Es scheint als wäre die myoendotheliale Kopplung dynamisch reguliert, im Vergleich zu einer eher wenig regulierten homozellulären Kopplung. Hier könnten aktive Prozesse, die die Leitfähigkeit von Gap Junctions z. B. durch

Phosphorylierung regulieren oder den Ein- und Ausbau von Gap Junctions in die Membran beeinflussen, verantwortlich sein. Takano et al. konnten an isolierten Mesenterialarterien von Ratten zeigen, dass sich der injizierte Farbstoff Propidiumiodid zwischen Endothelzellen gut und nur in seltenen Fällen zwischen glatten Muskelzellen ausbreitete. Jedoch registrierten sie teilweise auch eine heterozelluläre Farbstoffausbreitung, was zumindest auf eine abgeschwächte myoendotheliale Kopplung hinweist (Takano *et al.*, 2004). Zu betonen ist jedoch, dass die elektrische Kopplung nicht zwangsläufig mit der Farbstoffkopplung korreliert. Bei vorhandener myoendothelialer Farbstoffkopplung kann eine elektrische myoendotheliale Kopplung fehlen (Bény *et al.*, 1997). Umgekehrt kann eine elektrische myoendotheliale Kopplung vorhanden sein, ohne dass Endothelzellen und glatte Muskelzellen eine heterozelluläre Farbstoffkopplung zeigen (Bény, 1990; Kwak und Jongsma, 1996; Emerson und Segal, 2000a; Coleman *et al.*, 2001a). Die Abweichung hängt möglicherweise mit der Permeabilität bestimmter Gap Junctions für Ionen gegenüber Farbstoffmolekülen zusammen (Veenstra *et al.*, 1995; Brink *et al.*, 1996) und spiegelt sich auch in unterschiedlichen Begriffen wider: Permeabilität als Ausdruck der Diffusion über Gap Junctions und Leitfähigkeit als Ausdruck der elektrischen Kopplung. Permeabilität könnte somit ein Korrelat der Diffusion von *second messenger* (z.B. IP_3) darstellen (Lamboley *et al.*, 2005). Fasst man die Befunde der Farbstoffkopplung in der Mikrozirkulation der verschiedenen Autoren zusammen, so ist die homozelluläre Kopplung von Endothelzellen meist gut ausgeprägt, während sich die heterozelluläre und die homozellulär-glattmuskuläre Kopplung heterogen darstellen. Da die Farbstoffkopplung von mehreren Faktoren wie z. B. der Molekülgröße oder Ladung der Substanz abhängt und folglich sehr variabel ist, ist die Permeabilität kein gutes Maß für die elektrische Kopplung. Die Farbstoffkopplung darf nicht als alleiniger Maßstab für die zelluläre Kopplung herangezogen werden, sondern muss in Zusammenhang mit elektrophysiologischen Befunden, die die Leitfähigkeit darstellen, wie sie in dieser Arbeit durch Messungen des Membranpotentials erhoben wurden, gesehen werden.?

Das Membranpotential von Zellen wird von intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen, passiven und aktiven Ionenflüssen über die Membran und

der Zufuhr von ATP bestimmt. In Arteriolen der Mikrozirkulation korreliert das Membranpotential der glatten Muskelzellen mit dem Gefäßtonus. Ein negativeres Membranpotential von glatten Muskelzellen geht mit einer Vasodilatation einher, ein positiveres Membranpotential mit einer Vasokonstriktion. Effektoren sind hierbei spannungssensitive Ca^{2+} -Kanäle, die bei einer Depolarisation einen vermehrten Ca^{2+} -Einstrom erlauben. Eine Änderung des Membranpotentials in Endothelzellen könnte über myoendotheliale Kopplung das Membranpotential der glatten Muskelzellen beeinflussen. Umgekehrt könnten glatte Muskelzellen über eine myoendotheliale Kopplung eine Rückmeldung über den Kontraktionszustand vermitteln, so dass die endothelabhängige Tonusregulation im Sinne einer wechselseitigen Beeinflussung der Gefäßzellen reguliert werden könnte.

Zunächst wurde das Membranpotential von Endothelzellen und glatten Muskelzellen *in vivo* mittels intrazellulärer Mikroelektroden gemessen. Durch die Stabilisierungsphase des Potentials von ca. 30 s wurden Registrierungen z. B. durch mechanisch irritierte oder rupturierte Zellen, die sich in einem instabilen Potential durch einen stetigen Potentialverlust äußerten, ausgeschlossen. Die Messungen ergaben, dass das Membranpotential von Endothelzellen signifikant negativer war als das der glatten Muskelzellen (**Abbildung 3.2**). Dies ist ein erster Hinweis auf eine eingeschränkte elektrische myoendotheliale Kopplung *in vivo*, denn bei ausgeprägter Kopplung im Sinne eines elektrischen Synzytiums wäre kein Potentialunterschied zwischen den Zellen zu erwarten. Bény et al. konnten an Koronararterien von Schweinen *in vivo* zeigen, dass Endothelzellen und glatte Muskelzellen nicht farbstoffgekoppelt waren. Zudem fand sich ein signifikanter Unterschied der Membranpotentiale, wenngleich die glatten Muskelzellen stärker hyperpolarisiert waren als die Endothelzellen (Bény, 1990). Befunde von Segal und Bény an Arteriolen des Backentaschenmuskels von Hamstern *in vivo* zeigten einen tendenziellen Unterschied der Membranpotentiale mit stärker hyperpolarisierten Endothelzellen (Segal und Bény, 1992). Betrachtet man einige Arbeiten die unter *in vitro* Bedingungen durchgeführt wurden, so zeigen sich dort meist identische Ruhemembranpotentiale von glatten Muskelzellen und Endothelzellen (Xia *et al.*, 1995; Coleman *et al.*, 2001a; Emerson und Segal, 2000a; Takano *et al.*, 2004). Hierbei stellt sich erneut die Frage, ob *in vivo* eine aktive Regulation der myoendothelialen Kopplung

stattfindet. Zudem lässt sich bei Befunden, die *in vivo* erhoben wurden (Bény, 1990; Welsh und Segal, 1998, 2000; Crane *et al.*, 2004), erkennen, dass sich die gemessenen Membranpotentiale in einem stärker depolarisierten Bereich befinden als diejenigen, die unter *in vitro* Bedingungen registriert wurden (Knot und Nelson, 1995; Xia und Duling, 1995; Xia *et al.*, 1995; Hirst *et al.*, 1997; Coleman *et al.*, 2001). Gründe hierfür sind zum einen, dass Arteriolen *in vivo* physiologischem transmuralen Druck, Blutfluss und Wandschubspannung ausgesetzt sind, was per se zu einer stärkeren Depolarisation der Zellen führt (Harder, 1984). Zum anderen kann die Präparation von Arteriolen für Beobachtungen *in vitro* zu negativeren Membranpotentialen führen. Schließlich kann auch eine unterschiedliche O_2 - und CO_2 -Spannung sowie die Elektrolytzusammensetzung oder der pH-Wert in den Superfusaten den Tonus und damit das Membranpotential der Gefäße beeinflussen. Die Hauptdeterminante des Membranpotentials der meisten Zelltypen ist eine basale K^+ -Leitfähigkeit. Die Expression von K^+ -Kanälen kann jedoch beträchtlich zwischen verschiedenen Spezies und Gefäßen variieren. Beispielsweise konnten einwärts-gleichrichtende K^+ -Kanäle (K_{iR}) in frisch isolierten Endothelzellen aus Koronargefäßen von Meerschweinchen nachgewiesen werden (von Beckerath *et al.*, 1996), während sie bei Untersuchungen von Dittrich und Daut im gleichen Gefäßbett nicht exprimiert waren (Dittrich und Daut, 1999). Neben Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen sind an der Regulation des Membranpotentials auch andere Kanäle wie beispielsweise spannungsabhängige K^+ -Kanäle (K_V), Cl^- -Kanäle oder Ca^{2+} -Kanäle beteiligt (Jackson, 2000; Jackson, 2005). Die heterogene Expression dieser Ionenkanäle trägt folglich auch zur hohen Variabilität des Membranpotentials in vaskulären Zellen bei.

4.2 Effekt der lokalen Applikation vasoaktiver Substanzen auf das Membranpotential von Endothelzellen und glatten Muskelzellen

Die glattmuskuläre Hyperpolarisation ist ein wesentlicher Bestandteil der endothelabhängigen Dilatation, die durch einen „EDHF-Mechanismus“ mediiert wird. Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in glatten Muskelzellen schließen sich in Folge einer Membranhyperpolarisation, der Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen wird

reduziert und eine Relaxation resultiert (Sobey, 2001). Gegenstand aktueller Diskussionen ist die Frage, ob die Hyperpolarisation durch direkten Stromtransfer via myoendothelialer Gap Junctions von Endothelzellen auf glatte Muskelzellen übertragen wird, oder ob eine Hyperpolarisation nach Übertragung eines diffusiblen chemischen Faktors induziert wird. In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich Hyperpolarisationen mit verschiedenen Substanzen auslösen lassen. Zu den dabei am häufigsten verwendeten Stimuli gehören Acetylcholin und Bradykinin (Chen und Cheung, 1992; Nakashima *et al.*, 1993; Welsh und Segal, 1998; Edwards *et al.*, 1998; 2000), EETs (Campbell *et al.*, 1996; Li und Campbell, 1997; Gebremedhin *et al.*, 1998) oder Substanz P (Bény und Brunet, 1988; Keeble *et al.*, 2005).

In diesem Teil der Arbeit sollte geprüft werden, ob sich mit Acetylcholin Hyperpolarisationen in Endothelzellen und glatten Muskelzellen von Widerstandsarteriolen *in vivo* induzieren lassen. Die Analyse von Amplitude und Dauer der Hyperpolarisationen sollte weitere Hinweise auf die myoendotheliale Kopplung *in vivo* liefern. Acetylcholin ist eine Substanz, die sich aufgrund ihres physiologischen Vorkommens und der langjährigen Verwendung in der Kreislaufforschung als besonders vorteilhaft erweist. Neben der Wirkung z. B. als Transmitter an der neuromuskulären Endplatte, in vegetativen Ganglien und in der Übertragung vom Parasympathikus zum Organ, führt Acetylcholin zur rezeptorvermittelten Stimulation des Endothels. Das Membranpotential wurde in Endothelzellen bzw. glatten Muskelzellen registriert und die Arteriole nach einer Stabilisierungsphase von 30 s mit Acetylcholin stimuliert. Höhere lokale ACh-Konzentrationen wurden durch Verlängerung der Ejektionsdauer aus der Mikropipette erzielt. Sowohl Endothelzellen als auch glatte Muskelzellen zeigten deutliche Hyperpolarisationen nach ACh-Stimulation (**Abbildungen 3.5** und **3.8**). Zunächst erfolgte ein sehr rascher Abfall des Membranpotentials, die Rückkehr zum Ausgangsniveau erfolgte langsamer, aber stetig. In beiden Zelltypen führten ansteigende ACh-Konzentrationen am Stimulationsort zu einer Zunahme der Amplitude und der Dauer der Hyperpolarisation. Bei den jeweils gleich hohen ACh-Konzentrationen war jedoch die Amplitude der Hyperpolarisation in Endothelzellen größer als in glatten Muskelzellen (**Abbildung 3.10**). Das Maximum der Hyperpolarisation wurde in beiden Zellarten unabhängig von der

ACh-Konzentration jeweils gleich schnell erreicht. Dies ist ein Hinweis darauf, dass in Endothelzellen und glatten Muskelzellen ähnliche Ionenkanäle aktiviert werden, die zur Hyperpolarisation führen. Tendenziell war die Dauer der Hyperpolarisation in glatten Muskelzellen kürzer als in Endothelzellen, bei mittlerer ACh-Konzentration war der Unterschied signifikant (**Abbildung 3.9**).

Crane et al. zeigten an Arteriolen im Backentaschenmuskel von Hamstern *in vivo*, dass die Hyperpolarisation in Endothelzellen signifikant kürzer dauerte als in glatten Muskelzellen (Crane *et al.*, 2004). Sie erklärten dies durch einen länger anhaltenden Effekt von EDHF am glatten Muskel, der zu einer länger anhaltenden Öffnung von K⁺-Kanälen und/oder Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität führt, welches die Aktivität von Acetylcholin im Endothel überdauert. Auch Welsh und Segal registrierten im selben Gefäßbett von Hamstern *in vivo* eine beinahe doppelt so lang andauernde elektrische Antwort in glatten Muskelzellen im Vergleich zu Endothelzellen nach ACh-Stimulation (Welsh und Segal, 1998). Welsh und Segal werteten die unterschiedliche elektrische Antwort der Zellen auf Acetylcholin als einen Hinweis für eine schlechte myoendotheliale Kopplung der Zellen. Auch in der vorliegenden Arbeit war die Dauer der Hyperpolarisation in Endothelzellen und glatten Muskelzellen verschieden, was daher auch auf eine schlechte oder nicht vorhandene Kopplung hinweist. Weshalb in den zitierten Experimenten die Dauer der Hyperpolarisation in glatten Muskelzellen länger war als in Endothelzellen, also umgekehrt zu den Befunden dieser Arbeit, bleibt spekulativ, mag jedoch spezifisch für dieses Gefäßbett oder die Spezies sein. Dies könnte beispielsweise durch unterschiedliche Substanzen, die das Substrat „EDHF“ darstellen, bedingt sein, wenn diese chemisch verschiedenen Substanzen unterschiedliche Halbwertszeiten besitzen. Im Gegensatz zu *in vivo*-Experimenten wurden bei Untersuchungen *in vitro* meist keine Unterschiede in der Hyperpolarisationsdauer zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen registriert.

Eindeutiger als der Unterschied in der Dauer der Hyperpolarisation nach Stimulation mit Acetylcholin war der Unterschied in der Amplitude zwischen den Zelltypen. Bei mittleren und höheren ACh-Konzentrationen war die Amplitude der Hyperpolarisation in Endothelzellen größer als in glatten Muskelzellen. Bei

ausgeprägter myoendothelialer Kopplung würde man erwarten, dass die Amplitude der Hyperpolarisation bei gleicher Stimulationsdauer in Endothelzellen und glatten Muskelzellen gleich groß wären. Die signifikant kleinere Amplitude in glatten Muskelzellen könnte einerseits bedingt sein durch einen hohen myoendothelialen Widerstand, sodass die Amplitude der Endothelzellen nur mit einem deutlichen Verlust auf die glatten Muskelzellen übertragen wird. Andererseits könnte ein löslicher Faktor im Sinne eines EDHF eine geringere Amplitude in glatten Muskelzellen auslösen. Untersuchungen *in vitro* zeigten in der Amplitude der Hyperpolarisationen keine Unterschiede zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen (Emerson und Segal, 2000a). Die Diskrepanz zwischen *in vitro* und *in vivo* Befunden ist möglicherweise bedingt dadurch, dass *in vitro* meist größere Gefäße untersucht werden. Das Vorkommen myoendothelialer Gap Junctions variiert mit der Gefäßgröße und zeigt eine heterogene Verteilung (Sandow und Hill, 2000; Sandow *et al.*, 2004). Andererseits können *in vivo*, wie bereits erwähnt, aktive Prozesse die myoendotheliale Kopplung regulieren.

Zu diesen Mechanismen muss man in erster Linie den Blutfluss und die Wandschubspannung (*shear stress*) zählen, die in *in vitro* Untersuchungen für gewöhnlich fehlen (siehe 4.3). Dehnung der Gefäßwand oder pulsatile Druckänderung, die hauptsächlich vertikal zu den Endothelzellen ausgerichtet sind, oder Schubspannung (*shear stress*), als tangentielle Kraft aufgrund des Blutflusses, sind mechanische Stimuli, die von Endothelzellen wahrgenommen werden können. Viele endotheliale Antworten werden durch Änderungen von Blutfluss und Blutdruck moduliert: die Sekretion von Prostaglandinen und NO, die Expression von Proteinen wie tPA oder zahlreichen Adhaesionsmolekülen, Wachstumsfaktoren, Änderungen des Zytoskeletts *et cetera*. Die Frage, wie Endothelzellen mechanische Stimuli wahrnehmen können, was also der Sensor ist, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Es könnten beispielsweise Ionenkanäle als Mechanosensoren dienen und mechanische Kräfte in elektrische Antworten umsetzen. Es konnte gezeigt werden, dass durch mechanische Dehnung der Zellmembran einige unselektive Ionenkanäle ihre Leitfähigkeit für monovalente Kationen, oder Ca^{2+} und Ba^{2+} erhöhen. Der dadurch resultierende Anstieg des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist ausreichend, um z.B. BK_{Ca} zu aktivieren und die Membran

zu hyperpolarisieren (Hoyer *et al.*, 1994; Popp *et al.*, 1992). Änderungen der Schubspannung aufgrund von pulsatilem Fluss oder Änderungen der Viskosität können ebenfalls zur Aktivierung von SK_{Ca}- und BK_{Ca}-Kanälen führen (Daut *et al.*, 1994; Davies, 1995; Davies und Barbee 1994). Vor kurzem konnten Qiu *et al.* unterschiedliche Effekte von phasisch-wechselnder (pulsatiler) Wandschubspannung (*shear stress*) im Vergleich zu statisch-kontinuierlicher Wandschubspannung auf das endotheliale Membranpotential nachweisen. Darin zeigte sich, dass K_{Ca}-abhängige Hyperpolarisationen durch pulsatile Wandschubspannung getriggert werden und so zur Vasorelaxation führen. Hingegen resultierte statische Wandschubspannung in Cl⁻-abhängiger Depolarisation der Endothelzellen (Qiu *et al.*, 2003). Daneben scheinen verschiedene andere Ionenkanäle wie z.B. spannungsabhängige K⁺-Kanäle (Fan und Walsh, 1999) oder Cl⁻-Kanäle (Barakat *et al.*, 1999; Nakao *et al.*, 1999) eine Bedeutung bei der Wahrnehmung von mechanischen Stimuli zu haben. Mechanosensible Kanäle sind jedoch noch nicht molekular identifiziert und auch die Signaltransduktion vom mechanischen Stimulus zum Öffnen und Schließen oder der Modulation der betreffenden Ionenkanäle ist derzeit noch nicht hinreichend geklärt. Durch diese mechanischen Stimuli könnte das Membranpotential in Endothelzellen *in vivo* stärker hyperpolarisiert sein und so die myoendotheliale Kopplung beeinflusst werden. Außerdem könnte aktiven Regulationsmechanismen eine große Bedeutung bei der myoendothelialen Kopplung *in vivo* zukommen, die *in vitro* fehlen. So konnte gezeigt werden, dass (myoendotheliale) Gap Junctions über *second messenger* wie cAMP oder EETs in ihrer Leitfähigkeit reguliert werden (Griffith *et al.*, 2002; Popp *et al.*, 2002). Nicht nur aktive Regulationsmechanismen könnten die Ursache für den beobachteten Unterschied sein, sondern das Fehlen einer ausgeprägten myoendothelialen Kopplung kann auch spezifisch für dieses Gefäßbett im Cremastermuskel der Maus sein. Die meisten Daten, die eine gute Kopplung zeigen, wurden *in vitro* in anderen Gefäßbetten erhoben. Schließlich lässt sich auch nicht völlig ausschließen, dass die vorsichtige Präparation der Arteriolen vom umgebenden Skelettmuskel, die für die Membranpotentialmessung eine Voraussetzung ist, oder das Eindringen der Mikroelektrode in die Zellen zu einer myoendothelialen Entkopplung führte. Jedoch spricht die Tatsache, dass Endothelzellen nach Stimulation der Arteriole mit Acetylcholin an einer entfernten

Stelle hyperpolarisierten gegen eine vollständige Entkopplung der gemessenen Endothelzellen von den sie umgebenden Zellen (siehe 4.4).

Die Daten dieser Arbeit legen nahe, dass das Membranpotential von glatten Muskelzellen *in vivo* offensichtlich nicht durch direkten Stromtransfer von Endothelzellen geregelt wird. Dies schließt jedoch nicht aus, dass beispielsweise Kalzium oder andere Botenstoffe als Antwort auf intrazelluläre Erhöhung des Kalziums oder auf Hyperpolarisationen über homo- oder heterozelluläre Gap Junctions übertragen werden (Taylor *et al.*, 2003). Möglicherweise wird die Übertragung von elektrischem Strom und von Botenstoffen durch verschiedene Mechanismen reguliert (Figueroa *et al.*, 2004). In Versuchen, in denen die Zellen mit Halothan oder Heptanol entkoppelt wurden, konnten endothelabhängige Hyperpolarisationen in glatten Gefäßmuskelzellen nicht blockiert werden (Bény und Pacicca, 1994; Bény und Chabaud, 1996; Zygmunt und Högestätt, 1996). Andererseits liegen Daten vor, die zeigen, dass spezifischere Gap Junction-Blocker wie die Connexin-mimetischen Peptide (z.B. Gap 26 oder Gap 27) endothelabhängige VSM-Hyperpolarisationen abschwächen können (Dora *et al.*, 1999; Ujiie *et al.*, 2003). Diese kurzen synthetischen Peptide, die homolog zu unterschiedlichen Domänen der Connexine sind, stören durch kleine Abweichungen in ihrer Aminosäuresequenz die Funktion der Gap Junctions. Wichtig scheint auch hier die Gefäßgröße zu sein, denn je kleiner das Gefäß, desto größer die Anzahl der myoendothelialen Gap Junctions (Sandow und Hill, 2000). Elektronenmikroskopisch konnte von Sandow *et al.* nachgewiesen werden, dass das Ausbleiben einer Antwort von glatten Muskelzellen auf eine ACh-induzierte endotheliale Hyperpolarisation mit einem Fehlen von myoendothelialen Gap Junctions korreliert (Sandow *et al.*, 2002).

Die endotheliale Hyperpolarisation ist also offensichtlich ein entscheidender Faktor. Schon 1980 zeigten Furchgott und Zawadzki in ihrer bahnbrechenden Arbeit, dass Acetylcholin nur in Anwesenheit eines intakten Endothels zu einer Dilatation führt (Furchgott und Zawadzki, 1980). Acetylcholin wird deshalb als endothelabhängiger Dilatator bezeichnet. Dabei sind mehrere Mechanismen an der endothelvermittelten Dilatation beteiligt. Zunächst kommt dem Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in Endothelzellen

eine zentrale Rolle zu. Der vorübergehende Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ führt in Endothelzellen durch die Öffnung von Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen zu einer Hyperpolarisation. Da eine Senkung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die Pufferung der $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung mit einem Chelator oder die Blockade des kapazitiven Ca^{2+} -Eintrittes (siehe unten) mit 2-APB (2-Aminoethoxydiphenyl) eine Abschwächung der EDHF-vermittelten Antwort zur Folge hat, lässt sich schließen, dass der Anstieg von endotheliale $[Ca^{2+}]_i$ einen entscheidenden initialen Schritt darstellt (Chen und Suzuki, 1990; Marchenko und Sage, 1993; Frieden *et al.*, 1999; Ohashi *et al.*, 1999; Iwasaki *et al.*, 2001). Der endotheliale $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg kann durch Agonisten wie Acetylcholin oder Bradykinin rezeptorabhängig ausgelöst werden (Luckhoff *et al.*, 1988; Johns *et al.*, 1988), oder auch rezeptorunabhängig induziert werden. Letzteres kann durch Applikation von Ca^{2+} -Ionophoren oder durch die Gabe von Inhibitoren der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase (Thapsigargin oder Zyklopiazonsäure) erreicht werden (Illiano *et al.*, 1992; Fukao *et al.*, 1995). Ob bei dem rezeptorabhängigen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg Ca^{2+} aus den Speichern des Endoplasmatischen Retikulums nach Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und Freisetzung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) (Fleming *et al.*, 1996), direkter mechanischer Kopplung mit dem IP_3 -Rezeptor (Kiselyov *et al.*, 1998), oder über einen löslichen zytosolischen „Kalzium-Influx-Faktor“ erfolgt (Trepakova *et al.*, 2000), oder ob weitere Mechanismen (Ma *et al.*, 2001) daran beteiligt sind (wie die für Kationen permeablen TRP- („transient rezeptor potential“) Kanäle in Endothelzellen (Nilius *et al.*, 2003)), ist derzeit noch nicht abschließend geklärt. Es gibt jedoch sehr gute Belege dafür, dass durch einen kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom über Membrankanäle, deren Funktionalität eng mit der Entleerung von Ca^{2+} -Speichern aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum verbunden ist, die Öffnung von K_{Ca} -Kanälen gefördert wird (Marchenko und Sage, 1993; Sedova *et al.*, 2000; Nilius und Droogmans, 2001). Während BK_{Ca} -Kanäle einerseits über den Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} , andererseits über das Membranpotential aktiviert werden können, sind SK_{Ca} -Kanäle nicht spannungssensitiv (Nilius und Droogmans, 2001). Der endotheliale Ca^{2+} -Anstieg kann nicht nur Kanäle, sondern auch Enzyme aktivieren.

Bekannt ist, dass Acetylcholin die endotheliale NO-Synthase stimuliert, die aus L-Arginin NO abspaltet und L-Citrullin bildet (Palmer *et al.*, 1988). NO diffundiert zum glatten Muskel und stimuliert dort die lösliche Guanylatzyklase (sGC) (Stone und Marletta, 1996), die aus dem Substrat GTP zyklisches GMP (cGMP) produziert (Koesling *et al.*, 1990). Der intrazelluläre Botenstoff cGMP kann mit verschiedenen Proteinen reagieren. Im Falle der Aktivierung der Proteinkinase G (cGMP abhängige Proteinkinase, cGK) durch cGMP werden verschiedene Proteine phosphoryliert, was zu einem Abfall der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt und der glatte Muskel relaxiert. In Säugetieren wurden bisher drei Formen der NO-Synthase isoliert: die neuronale NOS (nNOS), die endotheliale NOS (eNOS) und die induzierbare NOS (iNOS). Eine dominierende Rolle bei der Tonusregulation spielt die konstitutiv exprimierte eNOS (Dudzinski *et al.*, 2006). Um zu untersuchen, inwieweit NO bei der ACh-induzierten Hyperpolarisation beteiligt ist, wurden zwei verschiedene Ansätze geprüft. Einmal wurde statt Acetylcholin SNP, ein NO-Donor, zur lokalen Stimulation verwendet und das Membranpotential in Endothelzellen und glatten Muskelzellen registriert. Andererseits sollte im Präparat von Mäusen (die für die eNOS defizient waren, eNOS^{-/-}) geprüft werden, ob sich mit Acetylcholin Hyperpolarisationen in Endothelzellen und glatten Muskelzellen auslösen lassen.

Wurden die Gefäße lokal mit SNP stimuliert, so zeigte sich in den Endothelzellen eine geringe, jedoch signifikante Hyperpolarisation. Unterscheidet man nach der SNP-Konzentration so wird deutlich, dass nur mit sehr hohen SNP-Konzentrationen eine signifikante Hyperpolarisation in Endothelzellen auszulösen war. Wurden dieselben Gefäße mit Acetylcholin stimuliert, so war die Amplitude der Hyperpolarisation mehrfach höher im Vergleich zur SNP-Stimulation. Das Membranpotential von glatten Muskelzellen zeigte nach SNP-Stimulation keine signifikante Änderung. Auch hier konnten in der Kontrolle mit Acetylcholin Hyperpolarisationen in glatten Muskelzellen gemessen werden, was die Intaktheit des glatten Muskels anzeigt. Dies verdeutlicht, dass NO selbst keine Hyperpolarisationen (mit Ausnahme der schwachen Hyperpolarisationen bei hoher SNP-Konzentration in Endothelzellen) in den hier untersuchten Gefäßzellen auslöst und damit im Sinne der klassischen Definition kein EDHF ist. Zwar gibt es Arbeiten die zeigen, dass bei sehr hohen NO-Konzentrationen BK_{Ca} -

Kanäle entweder direkt (Bolotina *et al.*, 1994) oder über einen cGMP abhängigen Mechanismus (Archer *et al.*, 1994; Sausbier *et al.*, 2000) aktiviert werden können. Dies scheint aber nur in wenigen Gefäßen oder bei sehr hohen NO-Konzentrationen relevant zu sein. Umgekehrt lässt sich vermuten, dass Acetylcholin nicht über NO zur endothelabhängigen Hyperpolarisation führt. Dies konnte weiter verifiziert werden in Versuchen an eNOS^{-/-}- und cGKI^{-/-}-Mäusen, bei denen Änderungen des arteriölen Gefäßdurchmessers in demselben Gefäßbett *in vivo* gemessen wurden. Dabei zeigte sich, dass der NO/cGMP/cGKI-Signalweg für die ACh-induzierte Dilatation nicht essentiell ist. In diesen Gefäßen führte auch Indometacin, das die Cyclooxygenase und damit die Prostaglandin-Bildung hemmt, zu keiner Abschwächung der ACh-induzierten Dilatationen. Da jedoch Iberiotoxin, ein BK_{Ca}-Kanalblocker, die Dilatationen signifikant schwächte, lässt sich schließen, dass Acetylcholin eine EDHF-Aktivität durch das Öffnen von BK_{Ca}-Kanälen mit konsekutiver Hyperpolarisation und Relaxation der glatten Muskelzellen initiiert (Koeppen *et al.*, 2004).

Wurden eNOS-defiziente (eNOS^{-/-}) Mäuse lokal mit Acetylcholin stimuliert, konnten in Endothelzellen robuste Hyperpolarisationen registriert werden (**Abbildung 3.14**). Diese unterschieden sich bei vergleichbarer ACh-Konzentration nicht signifikant vom Kontrollkollektiv der C57BL/6-Mäuse. Auch in glatten Muskelzellen der eNOS^{-/-}-Tiere konnten nach ACh-Stimulation Hyperpolarisationen erfasst werden. Jedoch wurden insgesamt zu wenige Zellen gemessen, um einen sinnvollen statistischen Vergleich zu führen. Diese Befunde verdeutlichen, dass die von endothelabhängigen Agonisten (Acetylcholin) ausgelösten Hyperpolarisationen in Endothelzellen und glatten Muskelzellen unabhängig von der endothelialen NO-Produktion sind. Huang *et al.*, die ebenfalls eNOS-defiziente Mäuse untersucht hatten, konnten ebenfalls zeigen, dass ACh-induzierte Hyperpolarisationen EDHF-mediiert sind (Huang *et al.*, 2000). Auch Befunde *in vitro* zeigten Hyperpolarisationen, die unabhängig von NO und Prostaglandinen (Hutcheson *et al.*, 1999) waren.

Zusammengefasst zeigen diese Befunde, dass EDHF in den Widerstandsgefäßen der Mikrozirkulation außerordentlich wichtig ist. Bei fehlender basaler NO-Produktion in eNOS^{-/-} Mäusen kann EDHF die

Tonusregulation möglicherweise kompensieren (Nishikawa *et al.*, 2000). Es gibt Hinweise darauf, dass EDHF mit abnehmendem Gefäßdurchmesser an Bedeutung gewinnt und sogar der wichtigste Mechanismus der endothelabhängigen Tonusregulation sein kann (Shimokawa *et al.*, 1996). Auch Prostaglandine können kompensatorisch eine Rolle spielen. So sind flussabhängige Dilatationen in eNOS^{-/-}-Mäusen durch Prostaglandine mediiert (Sun *et al.*, 1999, Sun *et al.*, 2006). Die Tatsache, dass NO Antworten vom EDHF-Typ abschwächt, lässt vermuten, dass in Gefäßen, in denen primär NO die Dilatationen vermittelt, EDHF die Funktion bei Versagen des NO-Mechanismus übernehmen könnte und im Sinne eines Backup-Mechanismus funktionieren kann (Bauersachs *et al.*, 1996).

4.3 Lokale Stimulation mit Acetylcholin nach selektiver Blockade von K_{Ca}-Kanälen

Um die K⁺-Kanäle, die an der Hyperpolarisation in Endothelzellen und glatten Muskelzellen nach ACh-Stimulation beteiligt sind, zu identifizieren, wurden spezifische Blocker von K_{Ca}-Kanälen eingesetzt. Wie im vorangegangenen Protokoll wurde lokal mit Acetylcholin stimuliert und jeweils im selben Präparat vor, sowie nach lokaler Behandlung der Gefäßwand mit den Kanalblockern die Membranpotentiale in Endothelzellen und glatten Muskelzellen registriert.

Apamin, ein selektiver Blocker von SK_{Ca}-Kanälen verhinderte während ACh-Stimulation komplett die Hyperpolarisationen in Endothelzellen und führte in glatten Muskelzellen zu einer etwas verzögert einsetzenden Hyperpolarisation, die in ihrer Amplitude jedoch keinen Unterschied zu den Werten vor der Behandlung mit dem Blocker aufwies (**Abbildungen 3.20 und 3.21**). Hingegen waren Hyperpolarisationen in glatten Muskelzellen sowohl nach Charybdotoxin (ChTx), einem Blocker von BK_{Ca}- und IK_{Ca}-Kanälen, als auch nach Iberiotoxin (IbTx), einem selektiven BK_{Ca}-Kanalblocker mit Acetylcholin nicht mehr auslösbar: Beide Substanzen blockierten die Hyperpolarisationen in glatten Muskelzellen komplett. Im Gegensatz dazu wurden die Hyperpolarisationen in

Endothelzellen nicht abgeschwächt (**Abbildungen 3.16 – 3.19**). Nach Behandlung mit IbTx waren die endothelialen Hyperpolarisationen in ihrer Amplitude sogar etwas größer als in der unbehandelten Kontrolle. Die Tatsache, dass in glatten Muskelzellen keine Hyperpolarisation bei erhaltener Hyperpolarisation der Endothelzellen zu detektieren war, zeigt, dass die Hyperpolarisation der Endothelzellen nicht direkt elektrotonisch via Gap Junctions in die glatten Muskelzellen übertragen wird. Vielmehr scheint ein Faktor beteiligt zu sein, der zu einer Aktivierung von BK_{Ca}-Kanälen und zur Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen führt. Diese Hypothese wird weiter gestützt durch die Beobachtung, dass trotz Blockade der endothelialen Hyperpolarisationen mit Apamin weiterhin Hyperpolarisationen in glatten Muskelzellen gemessen werden konnten. Würde eine rein elektrotonische Übertragung der endothelialen Hyperpolarisation in die glatten Muskelzellen erfolgen, so sollte nach Apamin auch in glatten Muskelzellen keine ACh-induzierten Hyperpolarisation mehr zu messen sein. Die endothelabhängige Hyperpolarisation in glatten Muskelzellen hängt offenbar somit nicht unmittelbar von einer Hyperpolarisation der Endothelzellen ab. In einer Arbeit, in der die mechanischen Antworten im selben Gefäßbett *in vivo* gemessen wurden, zeigte sich, dass Dilatationen nach ACh-Stimulation weder über Cytochrom-P450-Monooxygenasen noch über NO/cGMP/cGKI mediiert werden, sondern durch die Aktivierung von K_{Ca}-Kanälen über einen „EDHF“ ausgelöst werden (Koeppen *et al.*, 2004). Die ACh-induzierten Dilatationen waren unabhängig von NO und Prostaglandinen, da Indometacin, ein Zyklooxygenasehemmer und N²-nitro-L-Arginin (L-NA), ein NO-Synthasehemmer, die ACh-Dilatationen nicht weiter reduzierten. Dagegen schwächte IbTx die ACh-induzierten konzentrationsabhängigen Dilatationen signifikant ab (Siegl *et al.*, 2005). Apamin alleine führte zwar auch zu einer Abschwächung der Dilatationen, die jedoch weniger stark war als nach IbTx. Apamin und IbTx schwächten die Dilatationen nicht weiter ab als IbTx alleine. Dies verdeutlicht, dass die Aktivierung von SK_{Ca} an der mechanischen Antwort teilnimmt und offenbar dazu dient, eine Dilatation vom EDHF-Typ zu verstärken. Der entscheidende Beitrag zur ACh-induzierten Dilatation folgt jedoch aus der Aktivierung der BK_{Ca}-Kanäle in glatten Muskelzellen. Wurden diese Kanäle spezifisch blockiert, so war die für die ACh-induzierte Dilatation entscheidende Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen vollständig gehemmt.

Zusammengefasst bleibt festzuhalten, dass BK_{Ca} -Kanäle für die Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen aktiviert werden müssen. Dies geschieht offensichtlich nicht über eine direkte elektrotonische Fortleitung der über SK_{Ca} -Kanäle induzierten Hyperpolarisation in Endothelzellen via Gap Junctions, sondern über einen diffusiblen EDHF. Die Identität eines solchen Faktors, der zur Aktivierung der BK_{Ca} -Kanäle führt, ist noch nicht bekannt. Die Komplexität der Aktivierung von BK_{Ca} -Kanälen verdeutlichen verschiedene Arbeiten in denen beispielsweise Vasodilatoren, die über cGMP- und cAMP-Kaskaden wirken (Paterno *et al.*, 1996), EETs (Campbell *et al.*, 1996) oder CO (Wang *et al.*, 1997a; Wang *et al.*, 1997b) zur Kanalaktivierung führten. Die Relevanz von BK_{Ca} -Kanälen könnte in einer Funktion als negativer Feedback-Mechanismus liegen, um eine aktive Vasokonstriktion zu limitieren und so vor Vasospasmen schützen. Letzteres unterstützen Befunde, die in der Mikrozirkulation im Cremastermuskel von Hamstern erhoben wurden. Dort konnte gezeigt werden, dass BK_{Ca} -Kanäle während aktiver Vasokonstriktion auch durch Noradrenalin oder durch eine erhöhte Sauerstoffspannung aktiviert werden können und so der Vasokonstriktion entgegenwirken (Jackson und Blair, 1998).

Um zu untersuchen, inwieweit diese K_{Ca} -Kanäle einen Beitrag zur Einstellung des Membranpotentials haben, wurde das Membranpotential vor und nach Behandlung der Gefäße mit den verschiedenen K_{Ca} -Kanalblockern verglichen. Das Membranpotential von Endothelzellen wurde von den verschiedenen K^+ -Kanalblockern nicht beeinflusst. Charybdotoxin depolarisierte hingegen die glatten Muskelzellen, während Iberiotoxin und Apamin keinen Einfluss auf das Membranpotential dieser Zellen hatte. Dabei gilt es zu berücksichtigen, dass das Membranpotential bei diesen Untersuchungen nicht kontinuierlich gemessen wurde und so kleine Änderungen nach Applikation der Blocker nicht nachgewiesen werden können. Der Nachweis von Änderungen ist zudem erschwert durch die Variation der Membranpotentiale. Erstaunlich ist, dass ChTx glatte Muskelzellen depolarisierte, IbTx jedoch nicht. Dies deutet darauf hin, dass vor allem IK_{Ca} - und nicht so sehr BK_{Ca} -Kanäle basal aktiviert sind. Um dies genauer beurteilen zu können sind allerdings weitere Untersuchungen erforderlich.

Die Hyperpolarisation im Endothel auf Acetylcholin ist ganz wesentlich vermittelt durch Aktivierung von SK_{Ca}-Kanälen. Apamin blockierte die endothelialen Hyperpolarisationen nach ACh-Stimulation vollständig, während in glatten Muskelzellen weiterhin Hyperpolarisationen gemessen werden konnten. Deren Amplituden verzögerten sich jedoch im Durchschnitt um 800 ms im Vergleich zur Kontrolle. Die zeitlich leicht verzögerte Hyperpolarisation in glatten Muskelzellen nach lokaler Behandlung mit Apamin könnte jedoch ein Hinweis dafür sein, dass die endotheliale Hyperpolarisation die Freisetzung eines diffusiblen Faktors, der zur Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen führt, beschleunigt. Die differierende Effektivität der verschiedenen Blocker auf die ACh-induzierte Hyperpolarisation zeigt andererseits auch, dass die myoendotheliale Kopplung in diesem Gefäßbett *in vivo* nicht ausgeprägt ist und die glattmuskuläre Hyperpolarisation nicht elektrotonisch via Gap Junctions aus Endothelzellen übertragen wurde. Es gibt allerdings Hinweise dafür, dass die Öffnungswahrscheinlichkeit von endothelialen K_{Ca}-Kanälen durch Signale aus den glatten Muskelzellen beeinflusst werden kann. Über myoendotheliale Gap Junctions können IP₃ oder Ca²⁺-Ionen aus aktivierten glatten Muskelzellen in Endothelzellen diffundieren, dort [Ca²⁺]_i erhöhen, die K_{Ca}-Kanal vermittelte Hyperpolarisation fördern und über eine negative Rückkopplung zu einer Relaxation der glatten Muskelzelle führen (Dora *et al.*, 1997; 2000; Yashiro und Duling 2000; Budel *et al.*, 2001). Theoretisch könnte auch die Möglichkeit von glatten Muskelzellen, die endotheliale Ca²⁺-Homöostase zu modulieren, zu dem scheinbaren Paradoxon beitragen, dass K_{Ca}-Kanalblocker in isolierten Endothelzellen eine agonisteninduzierte Erhöhung des [Ca²⁺]_i abschwächen (Kamouchi *et al.*, 1999), jedoch nicht in intakten Arterien (Yamanaka *et al.*, 1998; Bolz *et al.*, 1999; Ghisdal und Morel, 2001; Ungvari *et al.*, 2002).

Die Blockade der Hyperpolarisationen in Endothelzellen durch Apamin unterstreicht Befunde, die zeigen konnten, dass SK_{Ca}-Kanäle hauptsächlich in Endothelzellen und nicht in glatten Muskelzellen exprimiert werden (Edwards *et al.*, 1998; Doughty *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 2001). Da in vielen Fällen die Kombination der Blocker Apamin und Charybdotoxin verwendet wird und oft nur die Kombination dieser beiden eine endothelabhängige Hyperpolarisation verhindert, lässt sich vermuten, dass K⁺ als EDHF fungieren könnte. Es gibt

jedoch auch zahlreiche Befunde, die eine Effektivität von Apamin in Mesenterialarterien von Hasen und Ratten alleine beschreiben und damit diese Hypothese widerlegen (Murphy und Brayden, 1995; Chen und Cheung, 1997, Ayajiki *et al.*, 2000). Unterschiede könnten mit der verschiedenen Bedeutung in den verschiedenen Spezies, Gefäßbetten oder *in vivo* vs. *in vitro* zu erklären sein. An isolierten Mesenterialarteriolen von Mäusen konnte durch eine erhöhte Expression von SK3-Kanälen (ein Subtyp des SK_{Ca}-Kanals) eine Hyperpolarisation sowohl in Endothelzellen als auch in glatten Muskelzellen, sowie ein erniedrigter Gefäßtonus gemessen werden (Burnham *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2003). Die Endothelzellen und glatten Muskelzellen dieser isolierten Arteriolen waren offenbar besser myoendothelial gekoppelt. Diese Befunde stellen jedoch den direkten Zusammenhang zwischen Expression von K_{Ca}-Kanälen und Gefäßtonus und dem Einfluss des Membranpotentials auf das Membranpotential der glatten Muskelzellen und den Kontraktionszustand heraus. Was letztlich die Hyperpolarisation und die Dilatation am glatten Muskel auslöst wurde in der Arbeit nicht weiter untersucht.

Zusammengefasst sind dies die ersten Befunde aus der Mikrozirkulation des Cremastermuskels von Mäusen aus Untersuchungen *in vivo*, bei der eine selektive Blockade der K_{Ca}-Kanäle deren unterschiedliche Beteiligung bei der Antwort auf ACh-Stimulation zeigt. SK_{Ca}-Kanäle sind für die Initiierung der Hyperpolarisation in Endothelzellen verantwortlich, hingegen haben BK_{Ca}-Kanäle ihre Bedeutung für die Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen. Dies ist einer der wesentlichen Befunde, die unterstreichen, dass zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen in der Cremasterzirkulation von Mäusen *in vivo* keine ausgeprägte myoendotheliale Kopplung besteht, da die Hyperpolarisationen in beiden Zellen über die Aktivierung verschiedener K_{Ca}-Kanäle ausgelöst werden.

4.4 Ausbreitung ACh-induzierter Hyperpolarisationen entlang der Arteriolen

Die Ausbreitung vasomotorischer Antworten ermöglicht die Koordinierung der Gefäßantworten und der Perfusionsverteilung im Gefäßnetzwerk (Segal und Duling, 1986; Welsh und Segal, 1997). Im arteriolären Netzwerk des Skelettmuskels trägt einerseits die flussinduzierte Dilatation, die bei Erhöhung der Wandschubspannung zu einer endothelialen Produktion von vasodilatatorischen Autakoiden führt (Pohl *et al.*, 1986; Koller *et al.*, 1994) zur koordinierten Dilatation bei. Andererseits können sich vasoaktive Signale auch von Zelle zu Zelle ausbreiten. In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich sowohl lokal induzierte Dilatationen als auch Konstriktionen entlang eines Gefäßes ausbreiten können. Dies wurde mit unterschiedlichen Stimuli gezeigt: mit rezeptorgebundenen Pharmaka wie Acetylcholin, Bradykinin (de Wit *et al.*, 2000; Weston *et al.*, 2005), Noradrenalin, Phenylephrin (Welsh und Segal, 1998), nach lokaler Muskelkontraktion (Segal und Jacobs, 2001) oder lokaler elektrischer Stimulation von Arteriolen (Emerson und Segal, 2001). Hierbei spielt die Ausbreitung von lokal ausgelösten Potentialänderungen eine wesentliche Rolle.

In dieser Arbeit wurde die Ausbreitung von ACh-induzierten Hyperpolarisationen analysiert. Dabei sollte die Fortleitung der Hyperpolarisation bei unterschiedlicher Stimulationsstärke untersucht, sowie ein Vergleich zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen hinsichtlich der Änderung der Amplitude, der Dauer bis zum Hyperpolarisationsmaximum und der Dauer der Hyperpolarisation geführt werden. Wie in den vorherigen Experimenten wurde Acetylcholin über eine Mikropipette lokal am untersuchten Gefäß appliziert. Um einen konvektiven Transport des Pharmakons mit dem Blutstrom auszuschließen wurde die Stimulationspipette am stromabwärts gelegenen Ende der frei präparierten Arteriole platziert und die Messelektrode relativ zur Stimulationspipette verschoben. Bei Stimulation sowohl mit niedriger als auch mit hoher ACh-Konzentration zeigte sich mit zunehmender Entfernung zur Stimulationsstelle zwar eine Abnahme der Amplitude der endothelialen Hyperpolarisationen. Es waren aber auch noch in einer Entfernung von über 1000 μm signifikante Hyperpolarisationen zu messen (**Abbildung 3.23** und **3.24**).

Im Gegensatz dazu nahm die Amplitude in glatten Muskelzellen mit zunehmender Entfernung zur Stimulationsstelle nicht ab. Die Amplituden in glatten Muskelzellen waren dabei sowohl lokal als auch in der Entfernung stets kleiner im Vergleich zu den Amplituden in Endothelzellen. Auffallend war, dass mit zunehmender Entfernung vom Stimulationsort sowohl die Amplitude als auch die Dauer der Hyperpolarisation in Endothelzellen abnahmen. Dies zeigt, dass auch der endotheliale Fortleitung von Membranpotentialänderungen ein Widerstand entgegengesetzt ist und die homozelluläre Kopplung gegebenenfalls auch aktiv reguliert wird. Die Dauer der Hyperpolarisation in Endothelzellen änderte sich nicht nur in Abhängigkeit von der Entfernung sondern auch mit der applizierten ACh-Dosis: Wurde mit hoher Konzentration stimuliert, war die Dauer der Hyperpolarisation in allen drei Entfernungen signifikant länger als bei niedriger Konzentration (**Abbildung 3.25**). Mit zunehmender Entfernung nahm die Dauer der Hyperpolarisation bei beiden Konzentrationen signifikant ab. Es wurden auch Hyperpolarisationen distal von der ACh-Stimulationsstelle gemessen. Diese wurden jedoch nicht weiter untersucht, da an der distalen Position ein Beitrag durch einen konvektiven Transport der Substanz an diesen Ort nicht ausgeschlossen werden konnte. Steinhausen et al. konnten an Nierenarteriolen *in vivo* zeigen, dass sich vasomotorische Antworten nach lokaler elektrischer Stimulation sowohl nach proximal als auch nach distal ausbreiten. Dabei zeigten sich aber unterschiedliche Längskonstanten (Steinhausen *et al.*, 1997) und die Längskonstante stromabwärts war mehr als doppelt so groß als stromaufwärts. Dies kann jedoch ein spezifisches Phänomen in Nierenarteriolen sein, denn Untersuchungen an Arteriolen des Backentaschenmuskels von Hamstern und des Cremastermuskels von Ratten *in vivo* zeigten bidirektional dieselbe Längskonstante (Delashaw und Duling, 1991; Segal, 1991).

Wenn man die verschiedenen möglichen Signaltransduktionswege betrachtet, kann nicht entschieden werden, ob die glatten Muskelzellen homozellulär besser gekoppelt sind als Endothelzellen. Möglicherweise wird das elektrische Signal primär über die Endothelzellen fortgeleitet und dann über myoendotheliale Gap Junctions auf die glatten Muskelzellen übertragen. Das Ausmaß einer sekundären Signalausbreitung auf die glatten Muskelzellen könnte dann beispielsweise über eine aktive Änderung der Leitfähigkeit myoendothelialer

Gap Junctions gesteuert werden. Unter Berücksichtigung der vorher geschilderten Ergebnisse dieser Arbeit, die Hinweise auf eine reduzierte myoendotheliale Kopplung in der Cremasterzirkulation der Maus *in vivo* liefern, wäre es vorstellbar, dass das Endothel aufgrund seiner guten homozellulären Kopplung die Hyperpolarisation elektrotonisch entlang des Gefäßes fortleitet. Die endotheliale Hyperpolarisation führt dann zur Freisetzung eines EDHFs, der eine Hyperpolarisation der darunter liegenden glatten Muskelzelle zur Folge hat. Wird dabei eine bestimmte Schwelle bei der endothelialen Hyperpolarisation überschritten, führt dies möglicherweise zur Freisetzung einer stets identischen Menge eines EDHFs, was die gleich bleibende Amplitude der glattmuskulären Hyperpolarisation erklären könnte. Bei einer rein elektrotonischen Fortleitung der Membranpotentialänderung von Endothelzellen in die glatten Muskelzellen könnte der Potentialverlust auf eine schlechte myoendotheliale Kopplung zurückgeführt werden. Ein anderer denkbarer Weg der Signalausbreitung wäre, dass die endothelabhängige Hyperpolarisation im glatten Muskel elektrotonisch parallel zur Hyperpolarisation der Endothelzellen fortgeleitet wird. Dies würde eine gute homozelluläre Kopplung der glatten Muskelzellen voraussetzen, worüber die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch keine Aussage zulassen. Die rasche Ausbreitung der Hyperpolarisation schließt eine Diffusion des Stimulus Acetylcholin aus. Nach Untersuchungen von Naka, der für Acetylcholin eine Diffusionsgeschwindigkeit von $1,0 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ gemessen hat, würde die Signalausbreitung durch reine Diffusion wesentlich langsamer sein (Naka, 1999).

Die einzelnen Signaltransduktionswege können sich zwischen verschiedenen Spezies und Gefäßen unterscheiden. In Arteriolen des Retraktormuskels in Hamstern zeigten die glatten Muskelzellen eine schlechte Kopplung, während Endothelzellen gut miteinander gekoppelt waren (Segal *et al.*, 1999; Emerson und Segal, 2000a,b). In diesen Experimenten stellten die Endothelzellen den Hauptweg für die Fortleitung von Membranpotentialänderungen dar, die durch Acetylcholin (Emerson und Segal, 2000a) oder Strominjektionen (Emerson und Segal, 2000b) ausgelöst wurden. In Mesenterialarteriolen von Meerschweinchen konnten Yamamoto *et al.* zeigen, dass das Endothel als Weg für eine elektrotonische Fortleitung mit geringem Widerstand dient. Wurde eine glatte Muskelzelle mit direkter Strominjektion

hyperpolarisiert, so zeigte sich mit zunehmender Entfernung rasch eine Abschwächung der Amplitude in glatten Muskelzellen, welche einen wesentlich höheren interzellulären Widerstand als Endothelzellen aufwiesen (Yamamoto *et al.*, 2001). Untersuchungen in Arteriolen des Backentaschenmuskels von Hamstern *in vivo* zeigten, dass Endothelzellen und glatte Muskelzellen jeweils gut homozellulär, jedoch nicht myoendothelial gekoppelt waren. Die unterschiedliche Form und Dauer der Hyperpolarisationen in beiden Zellschichten zeigte, dass Endothelzellen und glatte Muskelzellen in Abhängigkeit des Stimulus als getrennte Signaltransduktionswege fungieren können (Welsh und Segal, 1998). In ihren Untersuchungen dauerte die Hyperpolarisation im glatten Muskel fast doppelt so lange wie in Endothelzellen, was eher für die Freisetzung eines EDHFs als für eine Übertragung von elektrischem Strom spricht.

Crane *et al.* konnten mit Hilfe einer Computersimulation nachweisen, dass sich Membranpotentialänderungen rein passiv nicht so weit ausbreiten können wie man es in Experimenten an Arteriolen, wie in der vorliegenden Arbeit, beobachtet (Crane *et al.*, 2001). Es müssen also offenbar Mechanismen vorhanden sein, die die Ausbreitung des Signals verstärken. Eine solche Verstärkung könnte möglicherweise durch Acetylcholin selbst getriggert werden, wie es Emerson *et al.* in ihrer Arbeit zeigten (Emerson *et al.*, 2002). An isolierten Arterien des Retraktormuskels von Hamstern wurden Hyperpolarisationen nach ACh-Stimulation über eine etwa 60% längere Strecke fortgeleitet und hatten auch eine signifikant größere Amplitude als Hyperpolarisationen, die durch elektrische Stimulation erzeugt wurden. Ihrer Meinung nach könnte dies darin begründet sein, dass neben der Öffnung von K_{Ca} -Kanälen, die die Hyperpolarisation erzeugen, eine durch Acetylcholin getriggerte Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration das Endothel (Busse *et al.*, 1988) zur NO-Produktion und Steigerung des Arachidonsäuremetabolismus stimuliert. Dies wiederum kann den Membranwiderstand reduzieren und/oder die Öffnungswahrscheinlichkeit von Gap Junctions erhöhen (Lu und McMahon, 1997) und so den Gefäßlängswiderstand herabsetzen (Rose und Loewenstein, 1974). Welsh und Segal messen in einer Arbeit an Arteriolen des Backentaschenmuskels von Hamstern NO eine modulierende Rolle bei der EDHF-Hyperpolarisation bei, da die Hemmung der NO-Synthase zu einem 10%igen Abschwächung der ACh-

induzierten Hyperpolarisation führte (Welsh und Segal, 2000). Alternativ könnte eine Verstärkung der Antwort auf Acetylcholin auch durch aktive Generierung eines zusätzlichen elektrischen Stroms unter Beteiligung einwärts-gerichteter K^+ -Kanäle (K_{IR}) vermittelt werden (Quayle *et al.*, 1997; Nilius und Droogmans, 2001; Rivers *et al.*, 2001). K_{IR} werden durch Hyperpolarisation und Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration aktiviert und führen durch zusätzlichen K^+ -Ausstrom zur Verstärkung der Hyperpolarisation. Eine daneben diskutierte Möglichkeit der Verstärkung ACh-induzierter Hyperpolarisationen ist das Schließen von Kationen-Kanälen, die hauptsächlich für Na^+ leitend sind, wie es bisweilen in neokortikalen Pyramidenzellen gezeigt werden konnte (Stuart, 1999).

1986 konnten Segal und Duling zum ersten Mal *in vivo* eine bidirektionale Ausbreitung einer Vasodilatation nach Stimulation von Arteriolen mit Acetylcholin im Backentaschenmuskel von Hamstern zeigen (Segal und Duling, 1986). Welsh und Segal konnten später den direkten Zusammenhang zwischen einer NO- und Prostaglandin-unabhängigen Hyperpolarisation glatter Muskelzellen und einer Vasodilatation sowohl lokal, als auch in der Ferne, demonstrieren, indem sie das Membranpotential und den Gefäßdurchmesser parallel registrierten (Welsh und Segal, 1998). Es folgten zahlreiche Arbeiten, die zeigen konnten, dass ACh-induzierte Dilatationen unabhängig von NO und Prostaglandinen sowohl lokal an der Stimulationsstelle, als auch in größerer Entfernung entstehen (Hungerford *et al.*, 2000; Hoepfl *et al.*, 2000; 2002). Diese Arbeiten betonen zusammen mit den Befunden der vorliegenden Arbeit die Bedeutung der Fortleitung von Hyperpolarisationen bei der Ausbreitung von Vasodilatationen. Geht man davon aus, dass die Ausbreitung der Hyperpolarisation elektrotonisch entlang des Gefäßes erfolgt, so kommt Gap Junctions, die Endothelzellen bzw. glatte Muskelzellen untereinander koppeln, eine große Bedeutung zu. Mit verschiedenen Substanzen wie beispielsweise Heptanol (Xia und Duling 1995), hyperosmolarer Sucroslösung (Cohen *et al.*, 2000) oder β -Glycerrethinsäure (Murrant und Sarelius, 2000), welche Gap Junctions hemmen, konnte die Ausbreitung von Dilatationen gehemmt werden. Dass vor allem ein gut gekoppeltes Endothel bei der Ausbreitung von Dilatationen eine entscheidende Funktion hat, unterstreichen Untersuchungen in Tieren, die für das Connexin 40,

das vor allem Endothelzellen untereinander koppelt (Yeh *et al.*, 1997; Gabriels und Paul, 1998), defizient sind. So konnten de Wit *et al.* in der Cremastermikrozirkulation von Connexin 40-defizienten Mäusen eine signifikante Abschwächung der fortgeleiteten Dilatationen nach ACh-Stimulation gegenüber Wildtyp-Tieren zeigen (de Wit *et al.*, 2000). Die Tatsache, dass dort die Hemmung der Ausbreitung weniger ausgeprägt war, als bei unspezifischen Gap Junction Hemmern zeigt, dass unterschiedliche Connexine an der Fortleitung beteiligt sind.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass sich Hyperpolarisationen in der Mikrozirkulation des Cremastermuskels von Mäusen *in vivo* über eine weite Strecke ausbreiten und zur Koordination im arteriolären Netzwerk beitragen. Der Signalweg konnte zwar nicht eindeutig identifiziert werden, die schlechte myoendotheliale Kopplung der Arteriolen bei guter Kopplung der Endothelzellen lässt jedoch auf eine primär elektrotonische Signalausbreitung entlang des Endothels mit sekundärer Freisetzung eines EDHF schließen, wenngleich eine parallele Signalausbreitung im Endothel und in den glatten Muskelzellen ebenfalls denkbar ist.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die bedarfsorientierte Versorgung der einzelnen Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen ist eine wesentliche Voraussetzung des Organismus, die eigenen Ressourcen ökonomisch zu nutzen. Dies geschieht effektiv durch eine Koordination der Gefäßantwort, deren Ursprung in der Mikrozirkulation der Organe selbst liegt. Die Durchblutung wird gesteigert indem lokal ausgeschüttete Autakoide und Gewebismetaboliten zur Gefäßerweiterung in diesem Bereich führen. Eine wesentliche Rolle spielen dabei Prostaglandine, Stickstoffmonoxid (NO) und ein noch nicht identifizierter Faktor (EDHF), der zu einer endothelabhängigen Hyperpolarisation des glatten Muskels mit konsekutiver Relaxation führt und deren Fortleitung entlang des Gefäßes eine aufsteigende Vasodilatation mit Erhöhung der Blutzufuhr beispielsweise zum arbeitenden Skelettmuskel bedingt. Das Membranpotential der arteriolen Endothelzellen und glatten Muskelzellen hat bei dem letztgenannten Mechanismus eine zentrale Funktion in der Kontrolle des Gefäßtonus. Für diese Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, *in vivo* Membranpotentiale und deren Änderung auf pharmakologische Stimuli sowohl lokal als auch in größerer Entfernung in der Cremastermikrozirkulation von Mäusen zu messen. Durch Verwendung spezifischer Blocker konnten die verschiedenen beteiligten K_{Ca} -Kanäle identifiziert werden.

Zunächst wurde das Membranpotential von Endothelzellen und glatten Muskelzellen durch direkte Punktion mittels Mikroelektroden bestimmt. Die verschiedenen Zellen wurden durch Anfärben mit Carboxyfluorescein eindeutig identifiziert. Das Membranpotential von Endothelzellen war mit einer Differenz von 10,1 mV signifikant negativer als das der glatten Muskelzellen. Dies und die Tatsache, dass der Farbstoff sich nicht zwischen den Endothelzellen und glatten Muskelzellen ausbreitete ist ein erster Hinweis auf eine eingeschränkte myoendotheliale Kopplung *in vivo*.

Nach lokaler Applikation von Acetylcholin konnten sowohl in Endothelzellen als auch in glatten Muskelzellen Hyperpolarisationen ausgelöst

werden, die sich jedoch, im Gegensatz zu Untersuchungen *in vitro*, in ihrer Amplitude deutlich voneinander unterscheiden. Dies zeigt, dass das Membranpotential offensichtlich nicht durch direkten Stromtransfer von Endothelzellen auf glatte Muskelzellen übertragen wird, was ein weiterer Ausdruck einer eingeschränkten myoendothelialen Kopplung *in vivo* ist. NO ist in diesen Gefäßen kein Akteur im Sinne eines EDHF, da der NO-Donor Natrium-Nitroprusside (SNP) in glatten Muskelzellen keine Hyperpolarisation auslöste und sich andererseits die mit Acetylcholin ausgelösten Hyperpolarisationen in Endothelzellen und glatten Muskelzellen eNOS-defizienter Tiere nicht vom Kontrollkollektiv unterscheiden.

Durch Applikation verschiedener K_{Ca} -Kanalblocker wurde die Beteiligung der verschiedenen K_{Ca} -Kanäle bei der ACh-induzierten Hyperpolarisation untersucht. Dabei zeigte sich, dass Charybdotoxin (ChTx), ein Blocker von BK_{Ca} - und IK_{Ca} -Kanälen, und Iberiotoxin (IbTx), ein selektiver Blocker von BK_{Ca} -Kanälen, die Hyperpolarisation in glatten Muskelzellen vollständig blockierte, während sie keinen Einfluss auf die endotheliale Hyperpolarisation hatten. Im Gegensatz dazu verhinderte Apamin, ein Blocker von SK_{Ca} -Kanälen, nur die endotheliale Hyperpolarisation, während es zu keiner Abschwächung der glattmuskulären Hyperpolarisation kam. Somit sind SK_{Ca} -Kanäle bei der endothelialen und BK_{Ca} -Kanäle bei der glattmuskulären Hyperpolarisation beteiligt. Die Beteiligung unterschiedlicher K_{Ca} -Kanäle bei der Hyperpolarisation in beiden Zellen unterstreicht die Hypothese, dass Hyperpolarisationen der Endothelzellen nicht elektrotonisch auf glatte Muskelzellen übertragen werden, sondern vielmehr ein löslicher Faktor bei der Aktivierung der K_{Ca} -Kanäle in glatten Muskelzellen beteiligt sein muss.

Schließlich wurde die Ausbreitung von Hyperpolarisationen entlang der Arteriole analysiert, indem Membranpotentialänderungen von Endothelzellen und glatten Muskelzellen nach Stimulation mit Acetylcholin in verschiedenen Entfernungen zur Stimulationsstelle gemessen wurden. Zwar nahm mit zunehmender Entfernung von der Stimulationsstelle die Amplitude der Hyperpolarisation in beiden Zelltypen ab, jedoch konnten auch noch in größeren Entfernungen signifikante Hyperpolarisationen gemessen werden. Bei der

Fortleitung der Hyperpolarisation müssen Verstärkermechanismen beteiligt sein, da der Widerstand entlang des Gefäßes ansonsten bereits nach kurzer Strecke zu einem Verlust der Membranpotentialänderung führen würde.

Diese Befunde zeigen, dass die myoendotheliale Kopplung in den Arteriolen der Cremastermikrozirkulation in Mäusen *in vivo* nicht ausgeprägt ist. Dafür sprechen die unterschiedlichen Membranpotentiale von Endothelzellen und glatten Muskelzellen in Ruhe, die fehlende myoendotheliale Farbstoffausbreitung, die unterschiedlichen Amplituden der Hyperpolarisationen nach Stimulation mit Acetylcholin und die Beteiligung verschiedener K_{Ca} -Kanäle in beiden Zellen. Letzteres lässt außerdem darauf schließen, dass die endothelabhängige Hyperpolarisation durch einen diffusiblen Faktor und nicht durch eine elektrotonische Übertragung der Hyperpolarisation von Endothelzellen auf glatte Muskelzellen vermittelt wird. Die Identifizierung dieses endothelabhängigen hyperpolarisierenden Faktors (EDHF), der zur Aktivierung der BK_{Ca} -Kanäle in glatten Muskelzellen führt, erfordert weitere Untersuchungen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Ahluwalia, A. und Hobbs, A. J. (2005). Endothelium-derived C-type natriuretic peptide: more than just a hyperpolarizing factor. *Trends in Pharmacological Sciences* **26**, 162-167
- Alexander, D. B. und Goldberg, G. S. (2003). Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels. *Curr.Med.Chem.* **10**, 2045-2058
- Archer, S. L., Huang, J. M. C., Hampl, V., Nelson, D. P., Shultz, P. J., Weir, E. K. (1994). Nitric Oxide and cGMP Cause Vasorelaxation by Activation of a Charybdotoxin-Sensitive K Channel by cGMP-Dependent Protein Kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 7583-7587
- Archer, S. L., Gragasin, F. S., Wu, X., Wang, S., McMurtry, S., Kim, D. H., Platonov, M., Koshal, A., Hashimoto, K., Campbell, W. B., Falck, J. R., Michelakis, E. D. (2003). Endothelium-derived hyperpolarizing factor in human internal mammary artery is 11,12-epoxyeicosatrienoic acid and causes relaxation by activating smooth muscle BK(Ca) channels. *Circulation* **107**, 769-776
- Asano, M., Masuzawa-Ito, K., Matsuda, T. (1993). Charybdotoxin-sensitive K⁺ channels regulate the myogenic tone in the resting state of arteries from spontaneously hypertensive rats. *Br.J.Pharmacol.* **108**, 214-222
- Ayajiki, K., Fujioka, H., Okamura, T. (2000). Mechanisms underlying endothelium-dependent, nitric oxide/prostacyclin-independent, acetylcholine-induced relaxation in canine corpus cavernosum. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **362**, 448-451
- Baez, S. (1973). An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc.Res.* **5**, 384-394
- Barakat, A. I., Leaver, E. V., Pappone, P. A., Davies, P. F. (1999). A Flow-Activated Chloride-Selective Membrane Current in Vascular Endothelial Cells. *Circ.Res.* **85**, 820-828
- Barber, D. A., Burnett, J. C. J., Fitzpatrick, L. A., Sieck, G. C., Miller, V. M. (1998). Gender and Relaxation to G-Type Natriuretic Peptide in Porcine Coronary Arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* **32**, 5-11
- Baron, A., Frieden, M., Beny, J. L. (1997). Epoxyeicosatrienoic acids activate a high-conductance, Ca(2+)-dependent K⁺ channel on pig coronary artery endothelial cells. *J Physiol.* **504**, 537-543
- Bartlett, I. S., Crane, G. J., Neild, T. O., Segal, S. S. (2000). Electrophysiological Basis of Arteriolar Vasomotion in vivo. *J.Vasc.Res.* **37**, 568-575
- Bauersachs, J., Popp, R., Hecker, M., Sauer, E., Fleming, I., Busse, R. (1996). Nitric Oxide Attenuates the Release of Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor. *Circulation* **94**, 3341-3347
- Bény, J. L. und Brunet, P. C. (1988). Electrophysiological and mechanical effects of substance P and acetylcholine on rabbit aorta. *J.Physiol.* **398**, 277-289
- Bény, J. L. (1990). Endothelial and smooth muscle cells hyperpolarized by bradykinin are not dye coupled. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **258**, H836-H841
- Bény, J. L. und von der Weid, P. Y. (1991). Hydrogen peroxide: an endogenous smooth muscle cell hyperpolarizing factor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **176**, 378-384

- Bény, J. L. und Pacicca, C. (1994). Bidirectional electrical communication between smooth muscle and endothelial cells in the pig coronary artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **266**, H1465-H1472
- Bény, J. L. und Chabaud, F. (1996). Kinins and endothelium-dependent hyperpolarization in porcine coronary arteries. in Vanhoutte PM, ed., *Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. 41-51
- Bény, J. L., Zhu, P., Haefliger, I. O. (1997). Lack of bradykinin-induced smooth muscle cell hyperpolarization despite heterocellular dye coupling and endothelial cell hyperpolarization in porcine ciliary artery. *J.Vasc.Res.* **34**, 344-350
- Blanco, G. und Mercer, R. W. (1998). Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol Renal Physiol* **275**, F633-F650
- Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J., Pagano, P. J., Cohen, R. A. (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* **368**, 850-853
- Bolton, T. B., Lang, R. J., Takewaki, T. (1984). Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *J.Physiol.* **351**, 549-572
- Bolz, S. S., de Wit, C., Pohl, U. (1999). Endothelium-derived hyperpolarizing factor but not NO reduces smooth muscle Ca^{2+} during acetylcholine-induced dilation of microvessels. *Br.J.Pharmacol.* **128**, 124-134
- Bolz, S. S., Fisslthaler, B., Pieperhoff, S., de Wit, C., Fleming, I., Busse, R., Pohl, U. (2000). Antisense oligonucleotides against cytochrome P450 2C8 attenuate EDHF-mediated Ca^{2+} changes and dilation in isolated resistance arteries. *FASEB J.* **14**, 255-260
- Brandes, R. P., Schmitz-Winnenthal, F. H., Feletou, M., Godecke, A., Huang, P. L., Vanhoutte, P. M., Fleming, I., 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
- Brayden, J. E. und Nelson, M. T. (1992). Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science* **256**, 532-535
- Brink, P. R., Cronin, K., Ramanan, S. V. (1996). Gap junctions in excitable cells. *J.Bioenerg.Biomembr.* **28**, 351-358
- Budel, S., Schuster, A., Stergiopoulos, N., Meister, J. J., Beny, J. L. (2001). Role of smooth muscle cells on endothelial cell cytosolic free calcium in porcine coronary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H1156-H1162
- Burnham, M. P., Bychkov, R., Feletou, M., Richards, G. R., Vanhoutte, P. M., Weston, A. H., 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., Fichtner, H., Luckhoff, A., Kohlhardt, M. (1988). Hyperpolarization and increased free calcium in acetylcholine-stimulated endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **255**, H965-H969
- Cai, S., Garneau, L., Sauv, R. (1998). Single-Channel Characterization of the Pharmacological Properties of the $K(Ca^{2+})$ Channel of Intermediate Conductance in Bovine Aortic Endothelial Cells. *J.Membr.Biol.* **163**, 147-158

- Campbell, W. B., Gebremedhin, D., Pratt, P. F., Harder, D. R. (1996). Identification of Epoxyeicosatrienoic Acids as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors. *Circ.Res.* **78**, 415-423
- Chataigneau, T., Feletou, M., Thollon, C., Villeneuve, N., Vilaine, J. P., Duhault, J., Vanhoutte, P. M. (1998). Cannabinoid CB1 receptor and endothelium-dependent hyperpolarization in guinea-pig carotid, rat mesenteric and porcine coronary arteries. *Br.J.Pharmacol.* **123**, 968-974
- Chataigneau, T., Feletou, M., Duhault, J., Vanhoutte, P. M. (1998). Epoxyeicosatrienoic acids, potassium channel blockers and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. *Br.J.Pharmacol.* **123**, 574-580
- Chauhan, S. D., Nilsson, H., Ahluwalia, A., 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
- Chaytor, A. T., Edwards, D. H., Bakker, L. M., Griffith, T. M. (2003). Distinct hyperpolarizing and relaxant roles for gap junctions and endothelium-derived H₂O₂ in NO-independent relaxations of rabbit arteries. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 15212-15217
- Chaytor, A. T., Bakker, L. M., Edwards, D. H., Griffith, T. M. (2005). Connexin-mimetic peptides dissociate electrotonic EDHF-type signalling via myoendothelial and smooth muscle gap junctions in the rabbit iliac artery. *Br J Pharmacol* **144**, 108-114
- Chen, G., Suzuki, H., Weston, A. H. (1988). Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br.J.Pharmacol.* **95**, 1165-1174
- Chen, G. und Cheung, D. W. (1997). Effect of K(+)channel blockers on ACh-induced hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **272**, H2306-H2312
- Chen, G. F. und Suzuki, H. (1990). Calcium dependency of the endothelium-dependent hyperpolarization in smooth muscle cells of the rabbit carotid artery. *J Physiol.* **421**, 521-534
- Chen, G. F. und Cheung, D. W. (1992). Characterization of acetylcholine-induced membrane hyperpolarization in endothelial cells. *Circ.Res.* **70**, 257-263
- Chlopicki, S., Kozlovski, VI., Lorkowska, B., Drelicharz, L., Gebaska, A. (2005). Compensation of endothelium-dependent responses in coronary circulation of eNOS-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol.* **46**, 115-123
- Christ, G. J., Spray, D. C., El Sabban, M., Moore, L. K., Brink, P. R. (1996). Gap Junctions in Vascular Tissues: Evaluating the Role of Intercellular Communication in the Modulation of Vasomotor Tone. *Circ.Res.* **79**, 631-646
- Cohen, K. D., Berg, B. R., Sarelius, I. H. (2000). Remote arteriolar dilations in response to muscle contraction under capillaries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**, H1916-H1923
- Coleman, H. A., Tare, M., Parkington, H. C. (2001). K⁺ currents underlying the action of endothelium-derived hyperpolarizing factor in guinea-pig, rat and human blood vessels. *J Physiol.* **531**, 359-373
- Coleman, H. A., Tare, M., Parkington, H. C. (2001). EDHF is not K⁺ but may be due to spread of current from the endothelium in guinea pig arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H2478-H2483
- Crane, G. J., Hines, M. L., Neild, T. O. (2001). Simulating the spread of membrane potential changes in arteriolar networks. *Microcirculation* **8**, 33-43

- Crane, G. J., Neild, T. O., Segal, S. S. (2004). Contribution of active membrane processes to conducted hyperpolarization in arterioles of hamster cheek pouch. *Microcirculation* **11**, 425-433
- Daut, J., Standen, N. B., Nelson, M. T. (1994). The role of the membrane potential of endothelial and smooth muscle cells in the regulation of coronary blood flow. *J Cardiovasc Electrophysiol.* **5**, 154-181
- Davies, P. F. und Barbee, K. A. (1994). Endothelial cell surface imaging: insights into hemodynamic force transduction. *News Physiol Sci.* **9**, 153-157
- Davies, P. F. (1995). Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol.Rev.* **75**, 519-560
- Davis, M. J., Meininger, G. A., Zawieja, D. C (1992). Stretch-induced increases in intracellular calcium of isolated vascular smooth muscle cells. *Am.J.Physiol.* **263**, H1292-H1299
- de Wit, C., Schafer, C., von Bismarck, P., Bolz, S. S., Pohl, U. (1997). Elevation of plasma viscosity induces sustained NO-mediated dilation in the hamster cremaster microcirculation in vivo. *Pflugers Arch.* **434**, 354-361
- de Wit, C., Roos, F., Bolz, S. S., Kirchhoff, S., Kruger, O., Willecke, K., Pohl, U. (2000). Impaired Conduction of Vasodilation Along Arterioles in Connexin40-Deficient Mice. *Circ.Res.* **86**, 649-655
- Delashaw, J. B. und Duling, B. R. (1991). Heterogeneity in conducted arteriolar vasomotor response is agonist dependent. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **260**, H1276-H1282
- Deutsch, D. G., Goligorsky, M. S., Schmid, P. C., Krebsbach, R. J., Schmid, H. H. O., Das, S. K., Dey, S. K., Arreaza, G., Thorup, C., Stefano, G., Moore, L. C. (1997). Production and Physiological Actions of Anandamide in the Vasculature of the Rat Kidney. *J.Clin.Invest.* **100**, 1538-1546
- Dittrich, M. und Daut, J. (1999). Voltage-dependent K^+ current in capillary endothelial cells isolated from guinea pig heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **277**, H119-H127
- Dora, K. A., Doyle, M. P., Duling, B. R. (1997). Elevation of intracellular calcium in smooth muscle causes endothelial cell generation of NO in arterioles. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 6529-6534
- Dora, K. A., Martin, P. E. M., Chaytor, A. T., Evans, W. H., Garland, C. J., Griffith, T. M. (1999). Role of Heterocellular Gap Junctional Communication in Endothelium-Dependent Smooth Muscle Hyperpolarization: Inhibition by a Connexin-Mimetic Peptide. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **254**, 27-31
- Dora, K. A., Hinton, J. M., Walker, S. D., Garland, C. J. (2000). An indirect influence of phenylephrine on the release of endothelium-derived vasodilators in rat small mesenteric artery. *Br.J.Pharmacol.* **129**, 381-387
- Dora, K. A., Garland, C. J., Kwan, H. Y., Yao, X. (2001). Endothelial cell protein kinase G inhibits release of EDHF through a PKG-sensitive cation channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H1272-H1277
- Dora, K. A. und Garland, C. J. (2001). Properties of smooth muscle hyperpolarization and relaxation to K^+ in the rat isolated mesenteric artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H2424-H2429
- Doughty, J. M., Plane, F., Langton, P. D. (1999). Charybdotoxin and apamin block EDHF in rat mesenteric artery if selectively applied to the endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **276**, H1107-H1112

- Doughty, J. M., Boyle, J. P., Langton, P. D. (2000). Potassium does not mimic EDHF in rat mesenteric arteries. *Br.J.Pharmacol.* **130**, 1174-1182
- Drummond, G. R., Selemidis, S., Cocks, T. M. (2000). Apamin-sensitive, non-nitric oxide (NO) endothelium-dependent relaxations to bradykinin in the bovine isolated coronary artery: no role for cytochrome P450 and K⁺. *Br.J.Pharmacol.* **129**, 811-819
- Dudzinski, D. M., Igarashi, J., Greif, D., Michel, T. (2006). The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **46**, 235-276
- Eckman, D. M., Hopkins, N., McBride, C., Keef, K. D. (1998). Endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in guinea-pig coronary artery: role of epoxyeicosatrienoic acid. *Br.J.Pharmacol.* **124**, 181-189
- Edwards, G., Dora, K. A., Gardener, M. J., Garland, C. J., Weston, A. H. (1998). K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* **396**, 269-272
- Edwards, G., Gardener, M. J., Feletou, M., Brady, G., Vanhoutte, P. M., Weston, A. H. (1999). Further investigation of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in rat hepatic artery: studies using 1-EBIO and ouabain. *Br.J.Pharmacol.* **128**, 1064-1070
- Edwards, G., Thollon, C., Gardener, M. J., Feletou, M., Vilaine, J.-P., Vanhoutte, P. M., Weston, A. H. (2000). Role of gap junctions and EETs in endothelium-dependent hyperpolarization of porcine coronary artery. *Br.J.Pharmacol.* **129**, 1145-1154
- Edwards, G. und Weston, A. H. (2001). EDHF - are there gaps in the pathway? *J Physiol.* **531**, 299
- Emerson, G. G. und Segal, S. S. (2000). Electrical Coupling Between Endothelial Cells and Smooth Muscle Cells in Hamster Feed Arteries : Role in Vasomotor Control. *Circ.Res.* **87**, 474-479
- Emerson, G. G. und Segal, S. S. (2000). Endothelial Cell Pathway for Conduction of Hyperpolarization and Vasodilation Along Hamster Feed Artery. *Circ.Res.* **86**, 94-100
- Emerson, G. G. und Segal, S. S. (2001). Electrical activation of endothelium evokes vasodilation and hyperpolarization along hamster feed arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H160-H167
- Emerson, G. G., Neild, T. O., Segal, S. S. (2002). Conduction of hyperpolarization along hamster feed arteries: augmentation by acetylcholine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H102-H109
- Fan, J. und Walsh, K. B. (1999). Mechanical Stimulation Regulates Voltage-Gated Potassium Currents in Cardiac Microvascular Endothelial Cells. *Circ.Res.* **84**, 451-457
- Feletou, M. und Vanhoutte, P. M. (1988). Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br.J.Pharmacol.* **93**, 515-524
- Figuroa, X. F., Isakson, B. E., Duling, B. R. (2004). Connexins: Gaps in Our Knowledge of Vascular Function. *Physiology (Bethesda)* **19**, 277-284
- Fisslthaler, B., Popp, R., Kiss, L., Potente, M., Harder, D. R., Fleming, I., Busse, R. (1999). Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* **401**, 493-497
- Fisslthaler, B., Hinsch, N., Chataigneau, T., Popp, R., Kiss, L., Busse, R., Fleming, I. (2000). Nifedipine Increases Cytochrome P4502C Expression and Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Mediated Responses in Coronary Arteries. *Hypertension* **36**, 270-275

- Fleming, I., Fisslthaler, B., Busse, R. (1996). Interdependence of Calcium Signaling and Protein Tyrosine Phosphorylation in Human Endothelial Cells. *J.Biol.Chem.* **271**, 11009-11015
- Fleming, I., Fisslthaler, B., Michaelis, R., Kiss, L., Popp, R., Busse, R. (2001). The coronary endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) stimulates multiple signalling pathways and proliferation in vascular cells. *Pflugers Arch.* **442**, 511-518
- Frieden, M., Sollini, M., Beny, J. L. (1999). Substance P and bradykinin activate different types of K_{Ca} currents to hyperpolarize cultured porcine coronary artery endothelial cells. *J Physiol.* **519**, 361-371
- Fujiki, T., Shimokawa, H., Morikawa, K., Kubota, H., Hatanaka, M., Talukder, M. A. H., Matoba, T., Takeshita, A., Sunagawa, K. (2005). Endothelium-Derived Hydrogen Peroxide Accounts for the Enhancing Effect of an Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor on Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Mediated Responses in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 766-771
- Fukao, M., Hattori, Y., Kanno, M., Sakuma, I., Kitabatake, A. (1995). Thapsigargin- and cyclopiazonic acid-induced endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery. *Br.J.Pharmacol.* **115**, 987-992
- Fukao, M., Hattori, Y., Kanno, M., Sakuma, I., Kitabatake, A. (1997). Sources of Ca²⁺ in relation to generation of acetylcholine-induced endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery. *Br.J.Pharmacol.* **120**, 1328-1334
- 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
- Furchgott, R. F. und Vanhoutte, P. M. (1989). Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* **3**, 2007-2018
- Fursphan, E. J. und Potter, D. D. (1959). Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J Physiol.* **145**, 289-325
- Gabriels, J. E. und Paul, D. L. (1998). Connexin43 Is Highly Localized to Sites of Disturbed Flow in Rat Aortic Endothelium but Connexin37 and Connexin40 Are More Uniformly Distributed. *Circ.Res.* **83**, 636-643
- Gao, Y. J., Hirota, S., Zhang, D. W., Janssen, L. J., Lee, R. M. (2003). Mechanisms of hydrogen-peroxide-induced biphasic response in rat mesenteric artery. *Br.J.Pharmacol.* **138**, 1085-1092
- Gauthier, K. M., Deeter, C., Krishna, U. M., Reddy, Y. K., Bondlela, M., Falck, J. R., Campbell, W. B. (2002). 14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-enoic Acid: A Selective Epoxyeicosatrienoic Acid Antagonist That Inhibits Endothelium-Dependent Hyperpolarization and Relaxation in Coronary Arteries. *Circ.Res.* **90**, 1028-1036
- Gauthier, K. M., Edwards, E. M., Falck, J. R., Reddy, D. S., Campbell, W. B. (2005). 14,15-Epoxyeicosatrienoic Acid Represents a Transferable Endothelium-Dependent Relaxing Factor in Bovine Coronary Arteries. *Hypertension* **45**, 666-671
- Gebremedhin, D., Harder, D. R., Pratt, P. F., Campbell, W. B. (1998). Bioassay of an endothelium-derived hyperpolarizing factor from bovine coronary arteries: role of a cytochrome P450 metabolite. *J.Vasc.Res.* **35**, 274-284
- Ghisal, P. und Morel, N. (2001). Cellular target of voltage and calcium-dependent K⁺ channel blockers involved in EDHF-mediated responses in rat superior mesenteric artery. *Br.J.Pharmacol.* **134**, 1021-1028

- Gluais, P., Edwards, G., Weston, A. H., Falck, J. R., Vanhoutte, P. M., Feletou, M. (2005). Role of SKCa and IKCa in endothelium-dependent hyperpolarizations of the guinea-pig isolated carotid artery. *Br J Pharmacol* **144**, 477-485
- Griffith, T. M., Chaytor, A. T., Taylor, H. J., Giddings, B. D., Edwards, D. H. (2002). cAMP facilitates EDHF-type relaxations in conduit arteries by enhancing electrotonic conduction via gap junctions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 6392-6397
- Griffith, T. M. (2004). Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? *Br.J.Pharmacol.* **141**, 881-903
- Haefliger, J. A., Nicod, P., Meda, P. (2004). Contribution of connexins to the function of the vascular wall. *Cardiovasc.Res.* **62**, 345-356
- Hamilton, C. A., McPhaden, A. R., Berg, G., Pathi, V., Dominiczak, A. F. (2001). Is hydrogen peroxide an EDHF in human radial arteries? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H2451-H2455
- Harder, D. R. (1984). Pressure-dependent membrane depolarization in cat middle cerebral artery. *Circ.Res.* **55**, 197-202
- Hattori, T., Kajikuri, J., Katsuya, H., Itoh, T. (2003). Effects of H₂O₂ on membrane potential of smooth muscle cells in rabbit mesenteric resistance artery. *Eur.J.Pharmacol.* **464**, 101-109
- Hecker, M., Bara, A. T., Bauersachs, J., Busse, R. (1994). Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J Physiol.* **481**, 407-414
- Hirst, G. D., Edwards, F. R., Gould, D. J., Sandow, S. L., Hill, C. E. (1997). Electrical properties of iridial arterioles of the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **273**, H2465-H2472
- Hoepfl, B., Bolz, S. S., de Wit, C., Pohl, U. (2000). Conducted dilations initiated by acetylcholine (ACh) are not dependent on endothelial autacoid formation. *Pflugers Arch.* **439**, R397 (Abstract)
- Hoepfl, B., Rodenwaldt, B., Pohl, U., 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**, H996-1004
- Honing, M. L. H., Smits, P., Morrison, P. J., Burnett, J. C., Jr., Rabelink, T. J. (2001). C-Type Natriuretic Peptide-Induced Vasodilation Is Dependent On Hyperpolarization in Human Forearm Resistance Vessels. *Hypertension* **37**, 1179-1183
- Hoyer, J., Distler, A., Haase, W., Gogelein, H. (1994). Ca²⁺ Influx Through Stretch-Activated Cation Channels Activates Maxi K⁺ Channels in Porcine Endocardial Endothelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 2367-2371
- Huang, A., Sun, D., Smith, C. J., Connetta, J. A., Shesely, E. G., Koller, A., Kaley, G. (2000). In eNOS knockout mice skeletal muscle arteriolar dilation to acetylcholine is mediated by EDHF. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**, H762-H768
- Hungerford, J. E., Sessa, W. C., Segal, S. S. (2000). Vasomotor control in arterioles of the mouse cremaster muscle. *FASEB J.* **14**, 197-207
- Hutcheson, I. R., Chaytor, A. T., Evans, W. H., Griffith, T. M. (1999). Nitric Oxide and Independent Relaxations to Acetylcholine and A23187 Involve Different Routes of Heterocellular Communication : Role of Gap Junctions and Phospholipase A2. *Circ.Res.* **84**, 53-63

- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., 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
- Illiano, S., Nagao, T., Vanhoutte, P. M. (1992). Calmidazolium, a calmodulin inhibitor, inhibits endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the canine coronary artery. *Br.J.Pharmacol.* **107**, 387-392
- Itoh, T., Kajikuri, J., Hattori, T., Kusama, N., Yamamoto, T. (2003). Involvement of H₂O₂ in superoxide-dismutase-induced enhancement of endothelium-dependent relaxation in rabbit mesenteric resistance artery. *Br.J.Pharmacol.* **139**, 444-456
- Iwasaki, H., Mori, Y., Hara, Y., Uchida, K., Zhou, H., Mikoshiba, K. (2001). 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) inhibits capacitative calcium entry independently of the function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Recept.Channels* **7**, 429-439
- Jackson, W. F. (1998). Potassium channels and regulation of the microcirculation. *Microcirculation* **5**, 85-90
- Jackson, W. F. und Blair, K. L. (1998). Characterization and function of Ca²⁺-activated K⁺ channels in arteriolar muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **274**, H27-H34
- Jackson, W. F. (2000). Ion Channels and Vascular Tone. *Hypertension* **35**, 173-178
- Jackson, W. F. (2005). Potassium Channels in the Peripheral Microcirculation. *Microcirculation* **12**, 113-127
- Johns, A., Freay, A. D., Adams, D. J., Lategan, T. W., Ryan, U. S., van Breemen, C. (1988). Role of calcium in the activation of endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* **12**, 119-123
- Kamouchi, M., Droogmans, G., Nilius, B. (1999). Membrane potential as a modulator of the free intracellular Ca²⁺ concentration in agonist-activated endothelial cells. *Gen Physiol Biophys* **18**, 199-208
- Keeble, J., Blades, M., Pitzalis, C., Castro da Rocha, F. A., Brain, S. D. (2005). The role of substance P in microvascular responses in murine joint inflammation. *Br J Pharmacol* **144**, 1059-1066
- Kimura, K., Tsuda, K., Moriwaki, C., Kawabe, T., Hamada, M., Obana, M., Baba, A., Hano, T., Nishio, I. (2002). Leukemia inhibitory factor relaxes arteries through endothelium-dependent mechanism. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **294**, 359-362
- Kirchhoff, S., Nelles, E., Hagendorff, A., Kruger, O., Traub, O., Willecke, K. (1998). Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr.Biol.* **8**, 299-302
- Kiselyov, K., Xu, X., Mozhayeva, G., Kuo, T., Pessah, I., Mignery, G., Zhu, X., Birnbaumer, L., Muallem, S. (1998). Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* **396**, 478-482
- Knot, H. J. und Nelson, M. T. (1995). Regulation of membrane potential and diameter by voltage-dependent K⁺ channels in rabbit myogenic cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **269**, H348-H355
- Koeppen, M., Feil, R., Siegl, D., Feil, S., Hofmann, F., Pohl, U., de Wit, C. (2004). cGMP-Dependent Protein Kinase Mediates NO- but not Acetylcholine-Induced Dilations in Resistance Vessels In Vivo. *Hypertension* **44**, 952-955

- Koesling, D., Harteneck, C., Humbert, P., Bosserhoff, A., Frank, R., Schultz, G., Bohme, E. (1990). The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme. *FEBS Lett.* **266**, 128-132
- Koller, A., Sun, D., Huang, A., Kaley, G. (1994). Corelease of nitric oxide and prostaglandins mediates flow-dependent dilation of rat gracilis muscle arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **267**, H326-H332
- Kumar, N. M. und Gilula, N. B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell* **84**, 381-388
- Kwak, B. R. und Jongsma, H. J. (1996). Regulation of cardiac gap junction channel permeability and conductance by several phosphorylating conditions. *Mol.Cell Biochem.* **157**, 93-99
- Kwon, S. C., Pyun, W. B., Park, G. Y., Choi, H. K., Paik, K. S., Kang, P. S. (1999). The involvement of K⁺ channels and the possible pathway of EDHF in the rabbit femoral artery. *Yonsei Med.J.* **40**, 331-338
- Lacy, P. S., Pilkington, G., Hanvesakul, R., Fish, H. J., Boyle, J. P., Thurston, H. (2000). Evidence against potassium as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat mesenteric small arteries. *Br.J.Pharmacol.* **129**, 605-611
- Lacza, Z., Puskar, M., Kis, B., Perciaccante, J. V., Miller, A. W., Busija, D. W. (2002). Hydrogen peroxide acts as an EDHF in the piglet pial vasculature in response to bradykinin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H406-H411
- Laird, D. W., Castillo, M., Kasprzak, L. (1995). Gap junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in brefeldin A-treated rat mammary tumor cells. *J.Cell Biol.* **131**, 1193-1203
- Lamboley, M., Pittet, P., Koenigsberger, M., Sauser, R., Beny, J. L., Meister, J. J. (2005). Evidence for signaling via gap junctions from smooth muscle to endothelial cells in rat mesenteric arteries: possible implication of a second messenger. *Cell Calcium* **37**, 311-320
- Lash, J. M. (1996). Regulation of skeletal muscle blood flow during contractions. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **211**, 218-235
- Li, P. L. und Campbell, W. B. (1997). Epoxyeicosatrienoic Acids Activate K⁺ Channels in Coronary Smooth Muscle Through a Guanine Nucleotide Binding Protein. *Circ.Res.* **80**, 877-884
- Li, P. L., Chen, C. L., Bortell, R., Campbell, W. B. (1999). 11,12-Epoxyeicosatrienoic Acid Stimulates Endogenous Mono-ADP-Ribosylation in Bovine Coronary Arterial Smooth Muscle. *Circ.Res.* **85**, 349-356
- Little, T. L., Xia, J., Duling, B. R. (1995). Dye Tracers Define Differential Endothelial and Smooth Muscle Coupling Patterns Within the Arteriolar Wall. *Circ.Res.* **76**, 498-504
- Liu, Y., Pleyte, K., Knaus, H. G., Rusch, N. J. (1997). Increased Expression of Ca²⁺-Sensitive K⁺ Channels in Aorta of Hypertensive Rats. *Hypertension* **30**, 1403-1409
- Liu, Y., Zhao, H., Li, H., Kalyanaraman, B., Nicolosi, A. C., Gutterman, D. D. (2003). Mitochondrial Sources of H₂O₂ Generation Play a Key Role in Flow-Mediated Dilation in Human Coronary Resistance Arteries. *Circ.Res.* **93**, 573-580
- Lu, C. und McMahon, D. G. (1997). Modulation of hybrid bass retinal gap junctional channel gating by nitric oxide. *J Physiol (Lond)* **499**, 689-699

- Luckhoff, A., Pohl, U., Mulsch, A., Busse, R. (1988). Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells. *Br.J.Pharmacol.* **95**, 189-196
- Ma, H. T., Venkatachalam, K., Li, H. S., Montell, C., Kurosaki, T., Patterson, R. L., Gill, D. L. (2001). Assessment of the Role of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor in the Activation of Transient Receptor Potential Channels and Store-operated Ca²⁺ Entry Channels. *J.Biol.Chem.* **276**, 18888-18896
- Marchenko, S. M. und Sage, S. O. (1993). Electrical properties of resting and acetylcholine-stimulated endothelium in intact rat aorta. *J Physiol.* **462**, 735-751
- Marchenko, S. M. und Sage, S. O. (1994). Mechanism of acetylcholine action on membrane potential of endothelium of intact rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **266**, H2388-H2395
- Marchenko, S. M. und Sage, S. O. (1996). Calcium-activated potassium channels in the endothelium of intact rat aorta. *J Physiol.* **492**, 53-60
- Marrelli, S. P., Eckmann, M. S., Hunte, M. S. (2003). Role of endothelial intermediate conductance K_{Ca} channels in cerebral EDHF-mediated dilations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H1590-H1599
- Matoba, T., Shimokawa, H., Nakashima, M., Hirakawa, Y., Mukai, Y., Hirano, K., Kanaide, H., Takeshita, A. (2000). Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J.Clin.Invest.* **106**, 1521-1530
- Matoba, T., Shimokawa, H., Kubota, H., Morikawa, K., Fujiki, T., Kunihiro, I., Mukai, Y., Hirakawa, Y., Takeshita, A. (2002). Hydrogen Peroxide Is an Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Human Mesenteric Arteries. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **290**, 909-913
- McIntyre, C.-A., Buckley, C. H., Jones, G. C., Sandeep, T. C., Andrews, R. C., Elliott, A. I., Gray, G. A., Williams, B. C., McKnight, J. A., Walker, B. R., Hadoke, P. W. F. (2001). Endothelium-derived hyperpolarizing factor and potassium use different mechanisms to induce relaxation of human subcutaneous resistance arteries. *Br.J.Pharmacol.* **133**, 902-908
- McNally, J. S., Davis, M. E., Giddens, D. P., Saha, A., Hwang, J., Dikalov, S., Jo, H., Harrison, D. G. (2003). Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H2290-H2297
- McNeish, A. J., Wilson, W. S., Martin, W. (2002). Ascorbate blocks endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)-mediated vasodilatation in the bovine ciliary vascular bed and rat mesentery. *Br.J.Pharmacol.* **135**, 1801-1809
- Mehrke, G. und Daut, J. (1990). The electrical response of cultured guinea-pig coronary endothelial cells to endothelium-dependent vasodilators. *J Physiol.* **430**, 251-272
- Miura, H., Liu, Y., 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
- Miura, H., Bosnjak, J. J., Ning, G., Saito, T., Miura, M., Gutterman, D. D. (2003). Role for Hydrogen Peroxide in Flow-Induced Dilation of Human Coronary Arterioles. *Circ.Res.* **92**, 31e-40
- Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., Vane, J. R. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* **263**, 663-665

- Mori, Y., Takayasu, M., Suzuki, Y., Shibuya, M., Yoshida, J., Hidaka, H. (1997). Vasodilator effects of C-type natriuretic peptide on cerebral arterioles in rats. *Eur.J.Pharmacol.* **320**, 183-186
- 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
- Murrant, C. L. und Sarelius, I. H. (2000). Local and remote arteriolar dilations initiated by skeletal muscle contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**, H2285-H2294
- Naka, T. (1999). Evaluation of characteristic parameters for the neurotransmitter release mechanisms at the neuromuscular junction. *Biosystems* **49**, 143-149
- Nakao, M., Ono, K., Fujisawa, S., Iijima, T. (1999). Mechanical stress-induced Ca²⁺ entry and Cl⁻ current in cultured human aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **276**, C238-C249
- Nakashima, M., Mombouli, J. V., Taylor, A. A., Vanhoutte, P. M. (1993). Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. *J.Clin.Invest.* **92** , 2867-2871
- Neild, T. O. und Keef, K. (1985). Measurements of the membrane potential of arterial smooth muscle in anesthetized animals and its relationship to changes in artery diameter. *Microvasc.Res.* **30**, 19-28
- Nelson, M. T., Patlak, J. B., Worley, J. F., Standen, N. B. (1990). Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol Cell Physiol* **259**, C3-18
- Nelson, M. T. und Quayle, J. M. (1995). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **268**, C799-C822
- Nelson, M. T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L. F., Bonev, A. D., Knot, H. J., Lederer, W. J. (1995). Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* **270**, **588-589**
- Neylon, C. B., Lang, R. J., Fu, Y., Bobik, A., Reinhart, P. H. (1999). Molecular Cloning and Characterization of the Intermediate-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channel in Vascular Smooth Muscle: Relationship Between KCa Channel Diversity and Smooth Muscle Cell Function. *Circ.Res.* **85**, e33-43
- Niederhoffer, N. und Szabo, B. (1999). Involvement of CB1 cannabinoid receptors in the EDHF-dependent vasorelaxation in rabbits. *Br.J.Pharmacol.* **126**, 1383-1386
- Nilius, B., Viana, F., Droogmans, G. (1997). Ion channels in vascular endothelium. *Annu.Rev.Physiol.* **59**, 145-170
- Nilius, B. und Droogmans, G. (2001). Ion Channels and Their Functional Role in Vascular Endothelium. *Physiol.Rev.* **81**, 1415-1459
- Nilius, B., Droogmans, G., Wondergem, R. (2003). Transient receptor potential channels in endothelium: solving the calcium entry puzzle? *Endothelium* **10**, 5-15
- Nishikawa, Y., Stepp, D. W., Chilian, W. M. (2000). Nitric oxide exerts feedback inhibition on EDHF-induced coronary arteriolar dilation in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**, H459-H465
- Node, K., Ruan, X. L., Dai, J., Yang, S. X., Graham, L., Zeldin, D. C., Liao, J. K. (2001). Activation of Gα_s Mediates Induction of Tissue-type Plasminogen Activator Gene Transcription by Epoxyeicosatrienoic Acids. *J.Biol.Chem.* **276**, 15983-15989

- Ohashi, M., Satoh, K., Itoh, T. (1999). Acetylcholine-induced membrane potential changes in endothelial cells of rabbit aortic valve. *Br.J.Pharmacol.* **126**, 19-26
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G., Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526
- Palmer, R. M., Ashton, D. S., Moncada, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**, 664-666
- Paterno, R., Faraci, F. M., Heistad, D. D., Brayden, J. E. (1996). Role of Ca²⁺-Dependent K⁺ Channels in Cerebral Vasodilatation Induced by Increases in Cyclic GMP and Cyclic AMP in the Rat. *Stroke* **27**, 1603-1608
- Petersson, J., Zygmunt, P. M., Högestätt, E. D. (1997). Characterization of the potassium channels involved in EDHF-mediated relaxation in cerebral arteries. *Br.J.Pharmacol.* **120**, 1344-1350
- Plane, F., Holland, M., Waldron, G. J., Garland, C. J., Boyle, J. P. (1997). Evidence that anandamide and EDHF act via different mechanisms in rat isolated mesenteric arteries. *Br.J.Pharmacol.* **121**, 1509-1511
- Pohl, U., Busse, R., Kuon, E., Bassenge, E. (1986). Pulsatile perfusion stimulates the release of endothelial autacoids. *J.Appl.Cardiol.* **1**, 215-235
- Pohl, U. und Busse, R. (1989). Hypoxia stimulates the release of endothelium-derived relaxant factor (EDRF). *Am.J.Physiol.* **256**, H1595-H1600
- Pohl, U., Herlan, K., Huang, K., Bassenge, E. (1991). EDRF-mediated shear-induced dilation opposes myogenic vasoconstriction in small rabbit arteries. *Am.J.Physiol.* **261**, H2016-H2023
- Pomposiello, S., Rhaleb, N. E., Alva, M., Carretero, O. A. (1999). Reactive Oxygen Species: Role in the Relaxation Induced by Bradykinin or Arachidonic Acid Via EDHF in Isolated Porcine Coronary Arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* **34**, 567-574
- Popp, R., Hoyer, J., Meyer, J., Galla, HJ., Gogelein, H. (1992). Stretch-activated non-selective cation channels in the antiluminal membrane of porcine cerebral capillaries. *J.Physiol.* **454**, 435-449
- Popp, R., Bauersachs, J., Hecker, M., Fleming, I., Busse, R. (1996). A transferable, beta-naphthoflavone-inducible, hyperpolarizing factor is synthesized by native and cultured porcine coronary endothelial cells. *J Physiol.* **497**, 699-709
- Popp, R., Brandes, R. P., Ott, G., Busse, R., Fleming, I. (2002). Dynamic Modulation of Interendothelial Gap Junctional Communication by 11,12-Epoxyeicosatrienoic Acid. *Circ.Res.* **90**, 800-806
- Qiu, W. P., Hu, Q., Paolocci, N., Ziegelstein, R. C., Kass, D. A. (2003). Differential effects of pulsatile versus steady flow on coronary endothelial membrane potential. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H341-H346
- Quayle, J. M., Nelson, M. T., Standen, N. B. (1997). ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol.Rev.* **77**, 1165-1232
- Quignard, J. F., Chataigneau, T., Corriu, C., Edwards, G., Weston, A., Feletou, M., Vanhoutte, P. M. (2002). Endothelium-Dependent Hyperpolarization to Acetylcholine in Carotid Artery of Guinea Pig: Role of Lipoygenase. *J Cardiovasc Pharmacol.* **40**, 467-477

- Quilley, J. und Qiu, Y. (2005). K^+ -induced vasodilation in the rat kidney is dependent on the endothelium and activation of K^+ channels. *European Journal of Pharmacology* **508**, 193-199
- Quilley, J. und McGiff, J. C. (2000). Is EDHF an epoxyeicosatrienoic acid? *Trends Pharmacol.Sci.* **21**, 121-124
- Rabelo, L. A., Cortes, S. F., Alvarez-Leite, J. I., Lemos, V. S. (2003). Endothelium dysfunction in LDL receptor knockout mice: a role for H_2O_2 . *Br.J.Pharmacol.* **138**, 1215-1220
- Randall, M. D., Alexander, S. P. H., Bennett, T., Boyd, E. A., Fry, J. R., Gardiner, S. M., Kemp, P. A., Mcculloch, A. I., Kendall, D. A. (1996). An Endogenous Cannabinoid as an Endothelium-Derived Vasorelaxant. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **229**, 114-120
- Rapaport, M., Mieyal, P., McGiff, J. C., Fulton, D., Quilley, J. (1996). Contribution of calcium-activated potassium channels to the vasodilator effect of bradykinin in the isolated, perfused kidney of the rat. *Br.J.Pharmacol.* **118**, 1504-1508
- Rapaport, R. M., Draznin, M. B., Murad, F. (1983). Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* **306**, 174-176
- Rapaport, R. M. und Murad, F. (1983). Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ.Res.* **52**, 352 -357
- Richards, G. R., Weston, A. H., Burnham, M. P., Feletou, M., Vanhoutte, P. M., Edwards, G. (2001). Suppression of K^+ -induced hyperpolarization by phenylephrine in rat mesenteric artery: relevance to studies of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Br.J.Pharmacol.* **134**, 1-5
- Rivers, R. J., Hein, T. W., Zhang, C., Kuo, L. (2001). Activation of Barium-Sensitive Inward Rectifier Potassium Channels Mediates Remote Dilation of Coronary Arterioles. *Circulation* **104**, 1749-1753
- Rose, B. und Loewenstein, W. R. (1974). Permeability of cell junction depends on local cytoplasmic activity. *Nature* **254**, 250-252
- Rusch, N. J., De Lucena, R. D., Wooldridge, T. A., England, S. K., Cowley, A. W. Jr. (1992). A Ca^{2+} -dependent K^+ current is enhanced in arterial membranes of hypertensive rats. *Hypertension* **19**, 301-307
- Rusch, N. J. und Liu, Y. (1997). Potassium channels in hypertension: homeostatic pathways to buffer arterial contraction. *J.Lab.Clin.Med.* **130**, 245-251
- Rusko, J., Tanzi, F., van Breemen, C., Adams, D. J. (1992). Calcium-activated potassium channels in native endothelial cells from rabbit aorta: conductance, Ca^{2+} sensitivity and block. *J Physiol.* **455**, 601-621
- Sandow, 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
- Sandow, S. L., Tare, M., Coleman, H. A., Hill, C. E., Parkington, H. C. (2002). Involvement of Myoendothelial Gap Junctions in the Actions of Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor. *Circ.Res.* **90**, 1108-1113
- Sandow, S. L., Goto, K., Rummery, N. M., Hill, C. E. (2004). Developmental changes in myoendothelial gap junction mediated vasodilator activity in the rat saphenous artery. *J Physiol.* **556**, 875-886

- Sausbier, M., Schubert, R., Voigt, V., Hirneiss, C., Pfeifer, A., Korth, M., Kleppisch, T., Ruth, P., Hofmann, F. (2000). Mechanisms of NO/cGMP-Dependent Vasorelaxation. *Circ.Res.* **87**, 825-830
- Sedova, M., Klishin, A., Huser, J., Blatter, L. A. (2000). Capacitative Ca²⁺ entry is graded with degree of intracellular Ca²⁺ store depletion in bovine vascular endothelial cells. *J Physiol.* **523**, 549-559
- Segal, S. S. und Duling, B. R. (1986). Flow control among microvessels coordinated by intercellular conduction. *Science* **234**, 868-870
- Segal, S. S., Damon, D. N., Duling, B. R. (1989). Propagation of vasomotor responses coordinates arteriolar resistances. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **256**, H832-H837
- Segal, S. S. (1991). Microvascular recruitment in hamster striated muscle: role for conducted vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **261**, H181-H189
- Segal, S. S. und Beny, J. L. (1992). Intracellular recording and dye transfer in arterioles during blood flow control. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **263**, H1-H7
- Segal, S. S., Welsh, D. G., Kurjaka, D. T. (1999). Spread of vasodilatation and vasoconstriction along feed arteries and arterioles of hamster skeletal muscle. *J Physiol.* **516**, 283-291
- Segal, S. S. und Jacobs, T. L. (2001). Role for endothelial cell conduction in ascending vasodilatation and exercise hyperaemia in hamster skeletal muscle. *J Physiol.* **536**, 937-946
- Shaul, P. W., Farrar, M. A., Magness, R. R. (1992). Prostacyclin synthesis and stimulation of cyclic AMP production in ovine fetal vasculature: heterogeneity in pulmonary and systemic arteries. *Dev.Pharmacol.Ther.* **18**, 89-99
- Shimokawa, H. und Morikawa, K. (2005). Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **39**, 725-732
- Shimokawa, H., Yasutake, H., Fujii, K., Owada, M. K., Nakaïke, R., Fukumoto, Y., Takayanagi, T., Nagao, T., Egashira, K., Fujishima, M., Takeshita, A. (1996). The Importance of the Hyperpolarizing Mechanism Increases as the Vessel Size Decreases in Endothelium-Dependent Relaxations in Rat Mesenteric Circulation. *J Cardiovasc Pharmacol.* **28**, 703-711
- Siegl, D., Koeppen, M., Wolfle, S. E., Pohl, U., de Wit, C. (2005). Myoendothelial Coupling Is Not Prominent in Arterioles Within the Mouse Cremaster Microcirculation In Vivo. *Circ.Res.* **97**, 781-788
- Simpson, I., Rose, B., Loewenstein, W. R. (1977). Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels. *Science* **195**, 294-296
- Sobey, C. G. (2001). Potassium Channel Function in Vascular Disease. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **21**, 28-38
- Sohl, G. und Willecke, K. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc.Res.* **62**, 228-232
- Spagnoli, L. G., Villaschi, S., Neri, L., Palmieri, G. (1982). Gap junctions in myo-endothelial bridges of rabbit carotid arteries. *Experientia* **38**, 124-125
- Stankevicius, E., Kevelaitis, E., Vainorius, E., Simonsen, U. (2003). Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. *Medicina* **39**, 333-341

- Steinhausen, M., Endlich, K., Nobiling, R., Parekh, N., Schutt, F. (1997). Electrically induced vasomotor responses and their propagation in rat renal vessels in vivo. *J Physiol.* **505**, 493-501
- 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
- Stuart, G. (1999). Voltage-activated sodium channels amplify inhibition in neocortical pyramidal neurons. *Nat Neurosci* **2**, 144-150
- Sun, D., Huang, A., Smith, C. J., Stackpole, C. J., Connetta, J. A., Shesely, E. G., Koller, A., Kaley, G. (1999). Enhanced Release of Prostaglandins Contributes to Flow-Induced Arteriolar Dilation in eNOS Knockout Mice. *Circ.Res.* **85**, 288-293
- Sun, D., Liu, H., Yan, C., Jacobson, A., Ojaimi, C., Huang, A., Kaley, G. (2006). COX-2 contributes to the maintenance of flow-induced dilation in arterioles of eNOS knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (in Press)
- Takano, H., Dora, K. A., Spitaler, M. M., Garland, C. J. (2004). Spreading dilatation in rat mesenteric arteries associated with calcium-independent endothelial cell hyperpolarization. *J Physiol.* **556**, 887-903
- Tao, H., Zhang, L. M., Castresana, M. R., Shillcutt, S. D., Newman, W. H. (1995). Gnatriuretic peptide but not atrial natriuretic peptide increases cyclic GMP in cerebral arterial smooth muscle cells. *Life Sci.* **56**, 2357-2365
- Taylor, M. S., Bonev, A. D., Gross, T. P., Eckman, D. M., Brayden, J. E., Bond, C. T., Adelman, J. P., Nelson, M. T. (2003). Altered Expression of Small-Conductance Ca^{2+} -Activated K^+ (SK3) Channels Modulates Arterial Tone and Blood Pressure. *Circ.Res.* **93**, 124-131
- Trepakova, E. S., Csutora, P., Hunton, D. L., Marchase, R. B., Cohen, R. A., Bolotina, V. M. (2000). Calcium Influx Factor Directly Activates Store-operated Cation Channels in Vascular Smooth Muscle Cells. *J.Biol.Chem.* **275**, 26158-26163
- Uehara, Y., Fujiwara, T., Kaidoh, T. (1990). Morphology of vascular smooth muscle fibres and pericytes: scanning electron microscopic studies. *Ultrastructure of Smooth Muscle, Kluwer Academic, edited by F.M.Motta, Boston, MA* 237-254
- Ujiie, H., Chaytor, A. T., Bakker, L. M., Griffith, T. M. (2003). Essential Role of Gap Junctions in NO- and Prostanoid-Independent Relaxations Evoked by Acetylcholine in Rabbit Intracerebral Arteries. *Stroke* **34**, 544-550
- Ungvari, Z., Csiszar, A., Koller, A. (2002). Increases in endothelial Ca^{2+} activate KCa channels and elicit EDHF-type arteriolar dilation via gap junctions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**, H1760-H1767
- Veenstra, R. D., Wang, H. Z., Beblo, D. A., Chilton, M. G., Harris, A. L., Beyer, E. C., Brink, P. R. (1995). Selectivity of Connexin-Specific Gap Junctions Does Not Correlate With Channel Conductance. *Circ.Res.* **77**, 1156-1165
- von Beckerath, N., Dittrich, M., Klieber, H. G., Daut, J. (1996). Inwardly rectifying K^+ channels in freshly dissociated coronary endothelial cells from guinea-pig heart. *J Physiol.* **491**, 357-365
- Walker, S. D., Dora, K. A., Ings, N. T., Crane, G. J., Garland, C. J. (2001). Activation of endothelial cell KCa with 1-ethyl-2-benzimidazolinone evokes smooth muscle hyperpolarization in rat isolated mesenteric artery. *Br.J.Pharmacol.* **134**, 1548-1554
- Wang, R., Wang, Z., Wu, L. (1997). Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. *Br.J.Pharmacol.* **121**, 927-934

- Wang, R., Wu, L., Wang, Z. (1997). The direct effect of carbon monoxide on KCa channels in vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* **434**, 285-291
- Weintraub, N. L., Stephenson, A. H., Sprague, R. S., McMurdo, L., Lonigro, A. J. (1995). Relationship of Arachidonic Acid Release to Porcine Coronary Artery Relaxation. *Hypertension* **26**, 684-690
- Welsh, D. G. und Segal, S. S. (1997). Coactivation of resistance vessels and muscle fibers with acetylcholine release from motor nerves. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **273**, H156-H163
- Welsh, D. G. und Segal, S. S. (1998). Endothelial and smooth muscle cell conduction in arterioles controlling blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **274**, H178-H186
- 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**, H1832-H1839
- Wennberg, P. W., Miller, V. M., Rabelink, T., Burnett, J. C., Jr. (1999). Further attenuation of endothelium-dependent relaxation imparted by natriuretic peptide receptor antagonism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **277**, H1618-H1621
- Weston, A. H., Richards, G. R., Burnham, M. P., Feletou, M., Vanhoutte, P. M., Edwards, G. (2002). K⁺-induced hyperpolarization in rat mesenteric artery: identification, localization and role of Na⁺/K⁺-ATPases. *Br.J.Pharmacol.* **136**, 918-926
- Weston, A. H., Feletou, M., Vanhoutte, P. M., Falck, J. R., Campbell, W. B., Edwards, G. (2005). Bradykinin-induced, endothelium-dependent responses in porcine coronary arteries: involvement of potassium channel activation and epoxyeicosatrienoic acids. *Br J Pharmacol* **145**, 775-784
- Widmann, M. D., Weintraub, N. L., Fudge, J. L., Brooks, L. A., Dellsperger, K. C. (1998). Cytochrome P-450 pathway in acetylcholine-induced canine coronary microvascular vasodilation in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **274**, H283-H289
- Xia, J., Little, T. L., Duling, B. R. (1995). Cellular pathways of the conducted electrical response in arterioles of hamster cheek pouch in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **269**, H2031-H2038
- Xia, J. und Duling, B. R. (1995). Electromechanical coupling and the conducted vasomotor response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **269**, H2022-H2030
- Yamakawa, N., Ohhashi, M., Waga, S., Itoh, T. (1997). Role of endothelium in regulation of smooth muscle membrane potential and tone in the rabbit middle cerebral artery. *Br.J.Pharmacol.* **121**, 1315-1322
- Yamamoto, Y., Imaeda, K., Suzuki, H. (1999). Endothelium-dependent hyperpolarization and intercellular electrical coupling in guinea-pig mesenteric arterioles. *J Physiol.* **514**, 505-513
- Yamamoto, Y., Klemm, M. F., Edwards, F. R., Suzuki, H. (2001). Intercellular electrical communication among smooth muscle and endothelial cells in guinea-pig mesenteric arterioles. *J Physiol.* **535**, 181-195
- Yamanaka, A., Ishikawa, T., Goto, K. (1998). Characterization of Endothelium-Dependent Relaxation Independent of NO and Prostaglandins in Guinea Pig Coronary Artery. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **285**, 480-489
- Yashiro, Y. und Duling, B. R. (2000). Integrated Ca²⁺ Signaling Between Smooth Muscle and Endothelium of Resistance Vessels. *Circ.Res.* **87**, 1048-1054

- Yeh, H. I., Dupont, E., Coppen, S., Rothery, S., Severs, N. J. (1997). Gap Junction Localization and Connexin Expression in Cytochemically Identified Endothelial Cells of Arterial Tissue. *J.Histochem.Cytochem.* **45**, 539-550
- You, J., Marrelli, S. P., Bryan, R. M., Jr. (2002). Role of Cytoplasmic Phospholipase A2 in Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Dilations of Rat Middle Cerebral Arteries. *Br.J.Pharmacol.* **22**, 1239-1247
- Yousif, M. H., Cherian, A., Oriowo, M. A. (2002). Endothelium-dependent relaxation in isolated renal arteries of diabetic rabbits. *Auton.Autacoid.Pharmacol.* **22**, 73-82
- Zaritsky, J. J., Eckman, D. M., Wellman, G. C., Nelson, M. T., Schwarz, T. L. (2000). Targeted Disruption of Kir2.1 and Kir2.2 Genes Reveals the Essential Role of the Inwardly Rectifying K⁺ Current in K⁺-Mediated Vasodilation. *Circ.Res.* **87**, 160-166
- Zoratti, C., Kipmen-Korgun, D., Osibow, K., Malli, R., Graier, W. F. (2003). Anandamide initiates Ca²⁺ signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *Br.J.Pharmacol.* **140**, 1351-1362
- Zygmunt, P. M. und Högestätt, E. D. (1996). Role of potassium channels in endothelium-dependent relaxation resistant to nitroarginine in the rat hepatic artery. *Br.J.Pharmacol.* **117**, 1600-1606
- Zygmunt, P. M., Edwards, G., Weston, A. H., Davis, S. C., Högestätt, E. D. (1996). Effects of cytochrome P450 inhibitors on EDHF-mediated relaxation in the rat hepatic artery. *Br.J.Pharmacol.* **118**, 1147-1152
- Zygmunt, P. M. und Högestätt, E. D. (1996). Endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in the hepatic artery of the rat. In: Vanhoutte PM, ed., *Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. 191-203
- Zygmunt, P. M., Högestätt, E. D., Waldeck, K., Edwards, G., Kirkup, A. J., Weston, A. H. (1997). Studies on the effects of anandamide in rat hepatic artery. *Br.J.Pharmacol.* **122**, 1679-1686

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:

- **Siegl D**, Koeppen M, Wölfle SE, Pohl U, de Wit C (2005). Myoendothelial coupling is not prominent in arterioles within the mouse cremaster microcirculation in vivo. *Circ. Res.* **97**, 781-788
- Koeppen M, Feil R, **Siegl D**, Feil S, Hofmann F, Pohl U, de Wit C (2004). cGMP-dependent protein kinase mediates NO- but not acetylcholine-induced dilations in resistance vessels in vivo. *Hypertension* **44**, 952-955

Kongressbeiträge als Abstractpublikationen:

- de Wit C, **Siegl D**, Pohl U (2003). Homocellular coupling of EC is more prominent than myoendothelial coupling in arterioles in vivo. *Pflugers Arch.* **445** (Suppl. 1), 29
- **Siegl D**, Pohl U, de Wit C (2003). In Arteriolen in vivo ist die homozelluläre Kopplung via Gap junctions im Endothelzelllayer deutlich stärker ausgeprägt als die heterozelluläre myoendotheliale Kopplung. *Z. Kardiol.* **92** (Suppl.): I-50
- **Siegl D**, Pohl U, de Wit C (2003). Acetylcholine induces endothelial cell hyperpolarization along the arteriolar wall in vivo – Evidence from measurements with microelectrodes in the microcirculation. *J. Vasc. Res.* **40**, 202
- **Siegl D**, Pohl U, de Wit C (2004). Hyperpolarisations upon ACh depend on the activation of BK_{Ca} in VSM, but mainly on SK_{Ca} in EC in arterioles *in vivo*. *J. Vasc. Res.* **41**, 102
- de Wit C, **Siegl D**, Koeppen KBM, Pohl U (2004). BK_{Ca} mediate VSM hyperpolarisation and dilation upon ACh in the murine microcirculation in vivo. *Pflugers Arch.* **447** (Suppl. 1), 44
- de Wit C, **Siegl D**, Pohl U (2004). Hyperpolarisations upon ACh depend on the activation of BK_{Ca} in VSM, but mainly on SK_{Ca} in EC in arterioles *in vivo*. *FASEB J.* **18** (Suppl.), A627
- de Wit C, **Siegl D**, Koeppen KBM, Pohl U (2004). Myoendothelial coupling is not prominent in murine arterioles in vivo. *J. Vasc. Res.* **41** (Suppl. 2), 35
- Hoepfl B, Schmidt V, **Siegl D**, de Wit C (2005). A hyperpolarisation, but not nitric oxide, is necessary for ACh- and BK-induced conducted responses. *Pflugers Arch.* **449** (Suppl. 1), 25

Preise:

Young Investigator Award 2003 der Gesellschaft für Mikrozirkulation und vaskuläre Biologie e.V. auf der Jahrestagung 2003 in München für den Vortrag: Hyperpolarisations upon ACh depend on the activation of BK_{Ca} in VSM, but mainly on SK_{Ca} in EC in arterioles *in vivo*.

9 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Priv. Doz. Dr. habil. Cor de Wit, für die Überlassung des Themas meiner Dissertation und die exzellente fachliche Betreuung während aller Phasen dieser Arbeit. Seine Kompetenz und sein außergewöhnliches Engagement prägten meine Freude und mein Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten nachhaltig. PD de Wit vermittelte mir viele Tipps und Kniffe beim experimentellen Arbeiten und schulte meine wissenschaftliche Denkweise in zahlreichen kritischen Diskussionen. Er trug maßgeblich Anteil daran, dass so manche frustrane Phase während der Experimente überwunden wurde, indem er immer ein offenes Ohr hatte, viele neue Ideen und Lösungen beisteuerte und die Arbeit in dieser Form erst ermöglichte.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Pohl, Direktor des Physiologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München, danke ich für die freundliche Aufnahme im Institut, die Überlassung des Arbeitsplatzes und das zur Verfügung gestellte Material.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Barbara Rodenwaldt bedanken, die mir mit ihrer geduldigen, hilfsbereiten und freundlichen Art geholfen hat, viele Abschnitte der Präparation zu erlernen, und gerne bereit war ihre wissenschaftliche Erfahrung weiterzugeben.

Ein großes Dankeschön gilt auch den anderen Doktoranden der Arbeitsgruppe, Hanna Boye, Michael Köppen und Stephanie Wölfle, die zusammen ein gutes Team gebildet haben und durch Flexibilität und Rücksichtnahme bei der Benutzung der begrenzten Zahl an Arbeitsplätzen und der großen gegenseitigen Hilfsbereitschaft ebenfalls zu einem reibungslosen und zügigen Voranschreiten der Experimente beigetragen haben.

Bei Herrn Dr. Bernd Höpfl möchte ich mich für das Überlassen der Abbildung 2.1 und der Skizze in Abbildung 2.3 bedanken.

Ein großes Dankeschön gilt schließlich meinen Eltern, die mir stets den Rücken freihielten und durch Zuspruch und Unterstützung nicht nur in schwierigen Phasen viel geholfen haben.

10 LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

Name: Daniel Gerd Siegl
Geburtstag/ -ort: 04.11.1977 in Trostberg
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1984 - 1988 Grundschule Garching/Alz
1988 - 1997 König-Karlmann-Gymnasium, Altötting
27.06.1997 Allgemeine Hochschulreife

Studium

1998 - 2005 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität
München, vorklinischer und klinischer Studienabschnitt
14.12.2005 Ärztliche Prüfung
21.12.2005 Approbation, Regierung von Oberbayern, München

Dissertation

8/2001 - 11/2003 Experimentelle Untersuchungen am Institut für Physiologie
der LMU München, Lehrstuhl für vegetative Physiologie,
unter der Leitung von PD Dr. Cor de Wit