

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. R. Köhling

UNTERSUCHUNGEN ZUR BEDEUTUNG NERVALER UND GLATTMUSKULÄRER INTERAKTION ZUR ENTSTEHUNG PHASISCHER UND TONISCHER AKTIVITÄT IN DER MESENTERIALARTERIE DER RATTE

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der
Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von

Kevin Paul | geb. am 05.02.1991 in Rostock

Hamburg | 28.3.2018

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00002690

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. physiol. Thomas Noack, Institut für Physiologie,
Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Robert David, Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie,
Universität Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Patzak, Institut für vegetative Physiologie,
Charité Universitätsmedizin Berlin

Datum der Einreichung: 28.03.2018

Datum der Verteidigung: 05.02.2019

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Autonome Aktivität der Gefäßmuskulatur	1
1.2	Physiologische Bedeutung von Vasomotion im arteriellen Stromgebiet	3
1.3	Komponenten der Gefäßwand und deren möglicher Beitrag zur Vasomotion	4
1.3.1	Vaskuläre Cajal – ähnliche Zellen	5
1.3.2	Endothel	6
1.3.3	Sympathische Nerven	6
1.3.4	Glatte Muskelzellen	7
1.4	Oszillatoren und Synchronisation	9
1.4.1	Hypothesen zum Ursprung repetitiver Calciumevents	9
1.4.2	Synchronisation und Desynchronisation	11
1.5	Begriffsdefinition	13
1.6	Fragestellung	13
2	Methoden	14
2.1	Experimentelle Methode	14
2.1.1	Funktionsweise der Organbadmyographie	14
2.1.2	Versuchsaufbau	15
2.1.3	Eichung der Messinstrumente	15
2.1.4	Materialgewinnung und Beginn der Messungen	16
2.2	Substanzen, Lösungen und elektrische Stimulation	17
2.2.1	Tetraethylammonium	17
2.2.2	Indomethacin	17
2.2.3	Noradrenalin	18
2.2.4	kaliumreiche Lösung	18
2.2.5	Prazosin	19
2.2.6	Nifedipin	19
2.2.7	Tetrodotoxin	19
2.2.8	Elektrische Feldstimulation	19
2.3	Experimente	20
2.3.1	Externe Reizung und Auswirkungen von TTX, Prazosin und Nifedipin auf die Reizantwort	20
2.3.2	Bestimmung der TEA – Schwellenkonzentration für phasische Aktivität und Einfluss von Indomethacin auf die TEA Schwelle	21
2.3.3	Pharmakologische Beeinflussung induzierter Aktivität	22
2.3.4	Charakterisierung phasischer Aktivität	23
2.3.5	Funktionsweise des Analyseprogrammes	24
2.4	Statistische Auswertung	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Externe Stimulation und Auswirkungen von TTX, Prazosin und Nifedipin auf die Reizantwort	27

3.1.1	Nervale Reizung durch EFS und Wirkung des Na _v – Kanal Blockers TTX.....	27
3.1.2	Adrenerge Reizung durch NA und Wirkung des α ₁ - Rezeptorantagonisten Prazosin	29
3.1.3	Depolarisation durch kaliumreiche Lösung und Wirkung des Calciumkanalantagonisten Nifedipin.....	30
3.1.4	Korrelationsanalyse der Amplituden nach externer Stimulation	31
3.2	TEA – Schwellenkonzentration für phasische Aktivität und Einfluss von Indomethacin auf die TEA Schwelle	32
3.3	Pharmakologische Beeinflussung phasischer Aktivität	34
3.3.1	Wirkung des Calciumkanalantagonisten Nifedipin auf phasische Kontraktionen	34
3.3.2	Wirkung des Na _v – Kanal Blockers TTX auf phasische Kontraktionen.....	35
3.3.3	Wirkung des α ₁ - Rezeptorantagonisten Prazosin auf phasische Kontraktionen	36
3.3.4	Wirkung des Calciumkanalantagonisten Nifedipin auf tonische Kontraktionen	38
3.3.5	Wirkung des Na _v – Kanal Blockers TTX auf tonische Kontraktionen.....	38
3.3.6	Wirkung des α ₁ - Rezeptorantagonisten Prazosin auf tonische Kontraktionen.	38
3.4	Charakterisierung phasischer Aktivität.....	41
3.4.1	Formen phasischer Aktivität	41
3.4.2	Häufigkeitsverteilung des Antwortverhaltens nach TEA – Stimulation	43
3.4.3	Quantifizierung phasischer Kontraktionen	44
3.4.4	Korrelation phasischer Kontraktionen zu Referenzkontraktionen.....	46
3.4.5	Quantifizierung tonischer Aktivität	50
4	Diskussion.....	52
4.1	Angewandte Methode zur Untersuchung der Fragestellung	52
4.2	Wirkung externer Stimulation an Mesenterialgefäßen	53
4.2.1	Nervale Reizung durch elektrische Feldstimulation	53
4.2.2	Adrenerge Stimulation durch Noradrenalingabe	54
4.2.3	Depolarisation durch kaliumreiche Lösung	55
4.3	Initiierung phasischer Aktivität durch TEA vermittelte Effekte	55
4.4	Die Varikosität ein potentieller nervaler Oszillator.....	57
4.4.1	Vergleichbare Kinetik phasischer Kontraktionen und der EFS Reizantworten .	57
4.4.2	Abhängigkeit phasischer Aktivität von Aktionspotentialen	58
4.4.3	Bedeutung von Transmittern und der Netzbildung für phasische Aktivität	59
4.5	Zeitliche Variabilität phasischer Aktivität.....	60
4.6	Modellrechnung zu Auswirkungen phasischer Kontraktionen in vivo	62
4.7	Zusammenfassung.....	63
5	Literaturverzeichnis	65
6	Anhang.....	72
6.1	Abkürzungsverzeichnis	72
6.2	Verwendung des Anstieges zur Beschreibung der Kontraktionskinetik.....	73
6.3	Eidesstattliche Versicherung	74

6.4	Veröffentlichungen	75
6.5	Lebenslauf	76
6.6	Danksagung	77
7	Thesen	78

Abbildungen

Abbildung 1	spontane Kontraktionen von Koronararterien und der Portalvene der Ratte.....	2
Abbildung 2	Übersicht über Komponenten der Gefäßwand	5
Abbildung 3	Schematische Abbildung eines Organbadmyographen.....	15
Abbildung 4	Noradrenalin- und Kaliumkontraktionen	18
Abbildung 5	Zellen der Gefäßwand und Zielstrukturen für pharmakologische Beeinflussung.....	26
Abbildung 6	muskuläre Reaktionen der Mesenterialarterie auf verschiedene EFS Reize	27
Abbildung 7	Verteilung der maximalen Kontraktionswerte nach Gabe von kaliumreicher Lösung und Noradrenalin 10^{-5} mol/l.....	29
Abbildung 8	Regression zwischen externen Stimulationen	31
Abbildung 9	Beispiel phasischer Aktivität.....	32
Abbildung 10	Häufigkeitsverteilung des erstmaligen Auftretens etablierter phasischer Aktivität.....	33
Abbildung 11	Reaktion der glatten Muskulatur der Mesenterialarterie auf die Gabe von Nifedipin	34
Abbildung 12	Reaktion der glatten Muskulatur der Mesenterialarterie auf die Gabe von Tetrodotoxin	35
Abbildung 13	Reaktion der glatten Muskulatur der Mesenterialarterie auf die Gabe von Prazosin	37
Abbildung 14	Reaktionen tonischer Aktivität auf die Gabe von Nifedipin, TTX und Prazosin	40
Abbildung 15	Entwicklungsstufen phasischer Aktivität.....	42
Abbildung 16	Entwicklung der tonischen Aktivität aus dem Zustand etablierter phasischer Aktivität	43
Abbildung 17	Häufigkeitsverteilung der Entwicklungsstufen phasischer Aktivität	44
Abbildung 18	Regression zwischen EFS – Antwort und der Amplitudenhöhe phasischer Aktivität	48
Abbildung 19	Regression zwischen Noradrenalinantwort und der Amplitudenhöhe phasischer Aktivität	49
Abbildung 20	Regression zwischen Kontraktionen nach kaliumreicher Lösung und der Amplitudenhöhe phasischer Aktivität	50
Abbildung 21	Überlagerte Darstellung einer repräsentativen EFS sowie phasischen Kontraktion eines Präparates	57

Tabellen

Tabelle 1 EFS Kontraktionen Vergleich der Kraftentwicklung mit und ohne Vorlage von TTX 10 ⁻⁷ mol/l	28
Tabelle 2 Noradrenalin Kontraktionen Vergleich der Kraftentwicklung mit und ohne Vorlage von Prazosin 10 ⁻⁶ mol/l	30
Tabelle 3 Kaliumkontraktion Vergleich der Kraftentwicklung mit und ohne Vorlage von Nifedipin 10 ⁻⁶ mol/l.....	31
Tabelle 4 Darstellung der Reaktionen der sechs untersuchten Präparate auf Prazosin	36
Tabelle 5 Quantifizierte Darstellung der Reaktionen phasischer Aktivität auf pharmakologische Beeinflussung	38
Tabelle 6 Kennzahlen phasischer Aktivität	45
Tabelle 7 Korrelation der Amplitudenhöhe phasischer Aktivität mit Referenzkontraktionen ..	47

1 Einleitung

Die glatte Muskulatur von Blutgefäßen ist in der Lage zeitlich variable Kontraktionen auszubilden, die über Änderungen des Gefäßdurchmessers zur Regulation des Blutflusses in den versorgten Regionen beitragen. Hierdurch wird durch das Gefäßsystem sowohl Einfluss auf den systemischen Blutdruck genommen, als auch eine bedarfsgerechte Perfusion individueller Organe sichergestellt.

Die Regulation des Tonus der vaskulären Muskulatur ist für den Verlauf vieler Erkrankungen, wie beispielsweise der arteriellen Hypertonie und deren Folgeerkrankungen, von entscheidender Bedeutung. Insbesondere zeigt sich dies bei einer kardiovaskulären Mortalität von 417,4 pro 100.000 Einwohner im Jahr 2014 [1]. Durch das zunehmende Verständnis der Prozesse des glatten Muskels haben sich beispielsweise heute die sogenannten Calciumantagonisten, die direkt in den Kontraktionsvorgang der glatten Muskulatur eingreifen, als „first line“ Therapie der arteriellen Hypertonie etabliert.

Kontraktionen der Gefäßmuskulatur können durch zentrale Aktivierung des sympathischen Nervensystems oder durch vasoaktive Hormone ausgelöst werden. Dem Gefäßsystem stehen jedoch auch intrinsische Mechanismen zur Verfügung auf lokal veränderte Gegebenheiten des Blutflusses den Gefäßtonus zu variieren.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung eines dieser intrinsischen Phänomene unter Zuhilfenahme der Organbadmyographie am Modellpräparat der Mesenterialarterie der Ratte. Der verwendete Versuchsaufbau und die durchgeführten Experimente dienen in dieser Arbeit der Untersuchung der funktionellen Kopplung der Aktivität von glatter Muskulatur und dem perivaskulären nervalen Netzwerk zur Entstehung autonomer rhythmischer Kontraktionen der Gefäßstrukturen.

Im Folgenden sollen zunächst Formen von autonomer muskulärer Aktivität im vaskulären Gewebe vorgestellt werden, um dann den Forschungsschwerpunkt dieser Arbeit aus diesem Kontext herauszuarbeiten.

1.1 Autonome Aktivität der Gefäßmuskulatur

Variationen des Gefäßtonus als Folge eines veränderten Blutflusses wurden bereits 1902 von Bayliss postuliert, nachdem er nach der Freigabe eines kurzen Verschlusses der Aorta des Hundes eine übermäßig gesteigerte Umfangszunahme der unteren Extremität feststellte [2]. Jedoch erst fünfzig Jahre später fand, durch die Arbeit von Folkow [3] an denervierten Gefäßpräparaten, die bis dahin wenig beachtete Theorie zur autonomen muskulären Aktivität internationale Beachtung.

Unter dem letztlich nach Bayliss benanntem Effekt werden Kontraktion von glatten Muskelzellen der Gefäßwände auf Grund einer gesteigerten Wandspannung und Aktivierung

von Mechanorezeptoren zusammengefasst, wodurch eine konstante Perfusion der versorgten Organe gewährleistet wird [4].

Gefäßmuskeln sind jedoch auch in der Lage Kontraktionen mit höherer zeitlicher Variation auszubilden. Gegenstand der Untersuchungen zur Regulation der Widerstandsgefäße und Mikrozirkulation ist seit der Erstbeschreibung von T.W. Jones 1852 in den Venen der Fledermausflügel ein Vasomotion genanntes Phänomen. Unter diesem Begriff werden rhythmische Änderungen des Gefäßtonus auf Grund synchronisierter Schwankungen der glattmuskulären, intrazellulären Calciumkonzentration subsummiert, die unabhängig einer extravasalen Stimulation generiert werden [5, 6].

Solche rhythmischen Kontraktionen konnten im lymphatischen und venösen Gefäßsystem beobachtet werden [7]. Im lymphatischen Gefäßsystem tragen diese zum aktiven Flüssigkeitstransport bei [8]. Auch in der Portalvene dienen rhythmische Kontraktionen zur Verbesserung des Blutflusses in die Leber [9].

Ebenso konnte im arteriellen Stromgebiet das Auftreten von spontanen Kontraktionen demonstriert werden. Einen grundlegenden Beitrag zu Untersuchungen von Vasomotion in Arterien leisteten Nicoll et al. [11]. Im Verlauf konnten beispielsweise durch Kawasaki et al. [10] in proximalen Koronararterien spontane Kontraktionen registriert werden. Aalkjaer und Nilsson [12] postulierten später, dass sich Formen von Vasomotion wahrscheinlich in fast jedem Gefäß finden lassen. Die Charakteristik weist dabei jedoch deutliche Unterschiede

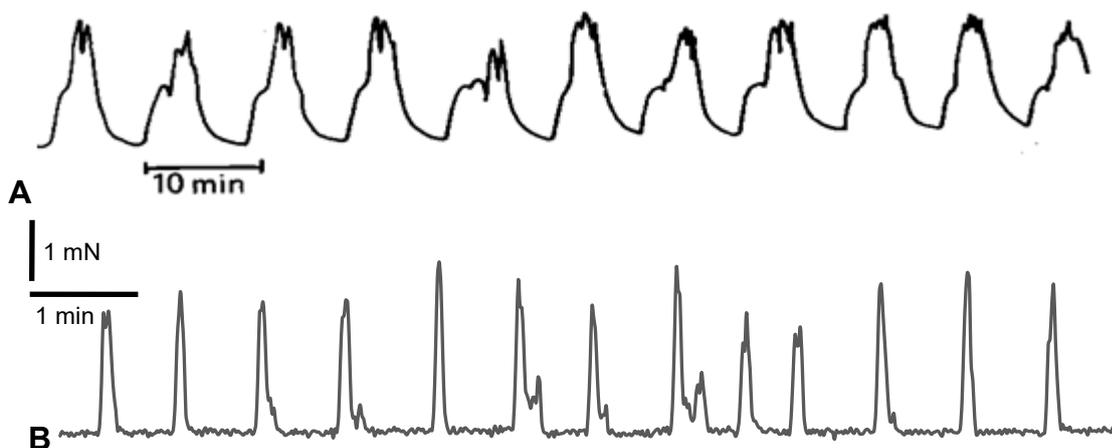


Abbildung 1 spontane Kontraktionen von Koronararterien (A) und der Portalvene der Ratte (B)
Zu sehen ist zunächst ein deutlicher Frequenzunterschied, zudem zeichnen sich die Kontraktionen der Koronararterien durch einen zweiphasigen Anstieg aus. Hingegen erreichen die Kontraktionen der Portalvene ihr Maximum auf direktem Wege. In beiden Präparaten finden sich Überlagerungen mehrerer Kontraktionen. Der Tonus der Portalvene kehrt nach Erreichen des Kontraktionsmaximums auf ein stabiles Grundniveau zurück aus dem sich weitere Kontraktionen entwickeln. In der Koronararterie ist das Tonusminimum durch den Zeitpunkt des Auftretens der Folgekontraktion bestimmt.
(A) modifiziert nach Kawasaki et al. [10]
(B) Beispieldaten aus der Arbeitsgruppe in der Organbadmyographie

zwischen den Gefäßtypen auf. So sind beispielhaft in Abbildung 1 die Kontraktionen von Koronararterien und der Portalvene abgebildet.

Während für die Portalvene, die auf Grund ihrer kombinierten Eigenschaften von vaskulärem und intestinalem Gewebe eine Sonderrolle im Gefäßbett einnimmt, als Ursprung der rhythmischen Kontraktionen vaskuläre Cajalzellen als Schrittmacherzellen diskutiert werden [13], so ist der Ursprung synchronisierter Calciumfreisetzungen in anderen Gefäßen noch immer unklar. Zusätzlich werden für individuelle Gefäßabschnitte unterschiedliche Mechanismen als Ursache vermutet [6].

Durch die einfache Verfügbarkeit und die Bedeutung für die Regulation des systemischen Widerstandes sind Mesenterialarterien in Bezug auf Vasomotion ein viel untersuchtes Modellpräparat. Unter Ruhebedingungen zeigen Mesenterialarterien keine spontanen Kontraktionen, dies wird vor allem auf den physiologisch verringerten myogenen Tonus der Arterien zurückgeführt [5]. Rhythmische Kontraktionen konnten in diesen Gefäßen durch submaximale Stimulation mit vasoaktiven Substanzen, wie beispielsweise Noradrenalin und Vasopressin, aber auch mittels elektrischer Stimulation in der Organbadmyographie sichtbar gemacht werden [14]. Synchronisierte Calciumoszillationen wurden unter anderem durch Lamboley et al. [15] und Seppely et al. [16] in der Mesenterialarterie der Ratte dargestellt. Während die Bedeutung der Kopplung der glatten Muskelzellen zu einem Netzwerk für synchronisierte Aktionen einen breiten wissenschaftlichen Konsens erfährt [17–19], spielt die Betrachtung des Zusammenwirkens weiterer zellulärer Komponenten in der Gefäßwand im Bereich der Vasomotion eher eine untergeordnete Rolle. In der grundlegenden Arbeit von Nicoll et al. [11] wurden zwar bereits die möglichen Einflüsse durch chemische, physikalische und nervale Reize diskutiert, jedoch werden mehr als modulierende Eigenschaften dem Nervensystem auch heute nicht zugesprochen [5, 19, 20].

In dieser Arbeit soll sich verstärkt mit der Frage auseinandergesetzt werden, in wie weit eine Interaktion von glattmuskulärem und nervalem Netzwerk für die Entstehung rhythmischer Kontraktionen in der Mesenterialarterie der Ratte notwendig ist. Dafür wurden zunächst rhythmische Kontraktionen der Mesenterialarterien in der Organbadmyographie etabliert und diese quantitativ analysiert. Um im nächsten Schritt die Rolle des zellulären Netzwerkes für die Entstehung dieser Kontraktionen zu untersuchen, erfolgte die pharmakologische Inhibition essentieller Strukturen für die Funktionsweise und Interaktion von glatten Muskelzellen und sympathischen Nervenfasern.

1.2 Physiologische Bedeutung von Vasomotion im arteriellen Stromgebiet

Die Bedeutung von Vasomotion für die Regulation des Blutflusses und der Mikrozirkulation ist bisher nur wenig verstanden. Aalkjaer und Nilsson [12] begründeten dies mit einem Mangel an experimentellen Daten und der Schwierigkeit Vasomotion unter physiologischen

Bedingungen zu beobachten. Pradhan und Chakravarthy [20] arbeiteten in ihrem Übersichtsartikel heraus, dass das Auftreten von Vasomotion unter physiologischen Bedingungen gewebeabhängig sei. In einigen zugrundeliegenden Studien sei Vasomotion vielmehr mit dem Vorkommen von metabolischem Stress oder verminderter Perfusion in Verbindung gebracht worden. In diesem Zusammenhang ist der durch Daut et al. [17] herausgestellte Vorteil der elektrischen Kopplung glatter Muskelzellen für die Weiterleitung metabolischer Signale wie ATP zu betrachten.

Nilsson und Aalkjaer [5] verbinden die gehäuften Beobachtungen von Vasomotion während Stresssituationen mit einer gesteigerten sympathischen Aktivität. Diese erhöhe den für Vasomotion benötigten basalen Gefäßtonus.

Beispielhaft konnten Schmidt et al. [21] zeigen, dass die Reduktion des Blutdruckes von Hasen durch Okklusion der Aorta zum Auftreten von zyklischen Flussveränderungen in der Femoralarterie führte. Ob Vasomotion in diesen Stresssituationen einen physiologischen Kompensationsmechanismus oder einen Teil der pathologischen Kaskade darstellt ist dabei unklar [12].

Gängige Überlegungen zur physiologischen Bedeutung von Vasomotion sind die verbesserten Flusseigenschaften und eine verbesserte Gewebeoxygenierung durch Schwankungen des Sauerstoffpartialdruckes in betroffenen Regionen. Diese möglichen Vorteile beruhen jedoch hauptsächlich auf theoretischen Überlegungen, eindeutige experimentelle Hinweise konnten bisher nicht erbracht werden [20]. Dagegen stehen experimentelle Daten aus denen eine erhöhte zerebrale Ischämierate bei zunehmenden rhythmischen Kontraktionen der Gefäßmuskeln hervorgeht [22].

1.3 Komponenten der Gefäßwand und deren möglicher Beitrag zur Vasomotion

Neben den Zellen der glatten Muskulatur, in denen es letztendlich zu synchronisierter Calciumfreisetzung kommt, beinhaltet die Gefäßwand noch weitere zelluläre Strukturen die einen möglichen Einfluss auf Vasomotion nehmen können. Auf die potentiellen Rollen dieser Strukturen soll hier eingegangen werden. Einen Überblick über die Zellstrukturen ist nachfolgend in Abbildung 2 dargestellt.

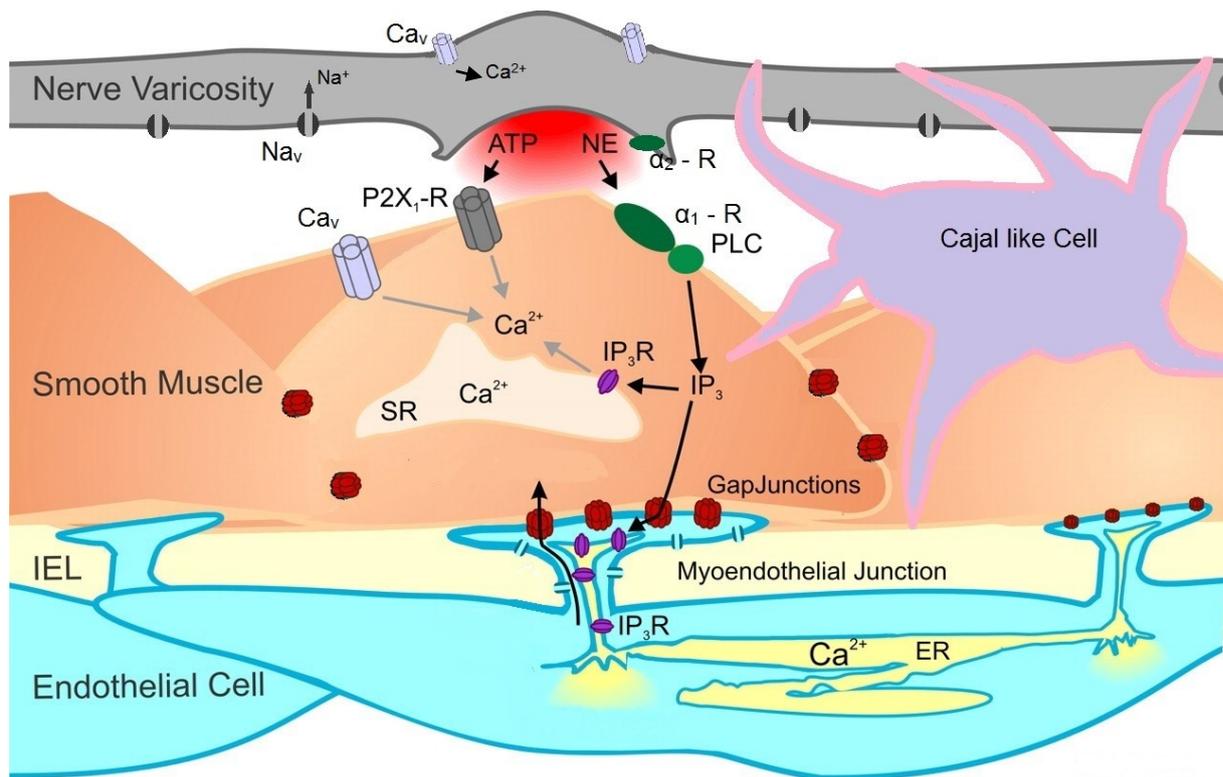


Abbildung 2 Übersicht über Komponenten der Gefäßwand mit Darstellung wichtiger Ionenkanäle und Rezeptoren, modifiziert nach Nausch et al. [23]

1.3.1 Vaskuläre Cajal – ähnliche Zellen

Über die Ausbildung spontaner „Calcium slow waves“ und die elektrische Kopplung an benachbarte Muskelzellen bilden Cajalzellen innerhalb der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltraktes den zellulären Schrittmacher für die Generierung spontaner Kontraktionen [24]. Durch Pucovsky et al. [25] konnte der Nachweis von Cajal – ähnlichen Zellen in den Mesenterialarterien des Meerschweinchens gelingen. Formey et al. [26] wiesen deren Existenz auch in den Mesenterialarterien der Ratte nach. Die tragende Rolle von Cajalzellen für die Initiierung von Spontanaktivität im Verdauungstrakt ist weithin akzeptiert. In der Portalvene werden diese Zellen ebenfalls als Schrittmacherzellen diskutiert [13]. In den Mesenterialarterien des Meerschweinchens und der Maus wurden in Cajal – ähnlichen Zellen durch Harhun et al. [13] spontane niederfrequente Calciumströme in das Zytoplasma beobachtet. Depolarisation führte in diesen Zellen jedoch reaktiv zu Auswärtsströmen, die das Membranpotential stabilisierten.

Ein Beitrag zur Vasomotion in Mesenterialarterien wird auf Grund des stabilen Membranpotentials bisher nicht gesehen [19, 27].

1.3.2 Endothel

Die Rolle des Endothels im Rahmen der Vasomotion erfährt eine kontroverse Diskussion, da die experimentellen Daten für Gefäßtypen verschiedener Regionen aber auch gleichen Ursprunges abweichende Ergebnisse zeigen [19]. Prinzipiell werden zwei Mechanismen diskutiert, über die sich das Endothel an der Vasomotion beteiligen kann. Dies kann zum einen über die elektrische Kopplung zwischen den Endothelzellen untereinander und Verbindung zu glatten Muskelzellen über gap junctions geschehen [28, 29], zum anderen über die Produktion und Diffusion von Metaboliten, wie beispielsweise NO [19].

Der, während Vasomotion, propagierende Calciumanstieg entlang der Endothelzellen geht laut Dora et al. [30], auf Grund der schlechten Diffusionseigenschaften des Calciums, auf einen depolarisierenden Strom entlang der glatten Muskelzellen und sekundäre Calciumerhöhung in den Endothelzellen zurück.

Hauptsächlich sei die Erhöhung der endothelialen Calciumkonzentration jedoch vor allem durch die Diffusion von IP_3 aus dem glatten Muskel über myoendotheliale Verbindungen verursacht [23]. Diese myoendotheliale Kopplung hatte in den Untersuchungen von Haddock et al. [31] in der Basilararterie der Ratte einen synchronisierenden Effekt für die Vasomotion. Auch zeigten Peng et al. [32], dass Vasomotion in der Mesenterialarterie der Ratte auf die Integrität des Endothels angewiesen sei. Ihre Ergebnisse implizierten den Bedarf von cGMP im glatten Muskel, dessen Vorkommen von der endothelialen NO – Produktion abhing. Hingegen gelang es Mauban und Wier [33], ebenfalls in der Mesenterialarterie der Ratte, Vasomotion nach Inhibition der NO – und auch der cGMP – Produktion auszulösen.

Für Seppely et al. [34] spielte in der Mesenterialarterie der Ratte das endothelial produzierte NO vor allem eine Rolle in der Erhaltung repetitiver Kontraktionen. Eine Reduktion der NO – Produktion führte zum Übergang in eine tonische Kontraktion

1.3.3 Sympathische Nerven

Reize des sympathischen Nervensystems werden über sich in der Adventitia befindliche Nervenstränge über Transmitter vermittelt, die aus Varikositäten genannten Abschnitten freigesetzt werden. Diese gruppieren sich in der Gefäßwand zu „hot spots“ in denen eine gesteigerte Transmitterfreisetzung registriert werden kann [35]. Die beiden Haupttransmitter sind dabei Noradrenalin und ATP. Während durch ATP über Bindung an P2X – Rezeptoren ein direkter Calciumeinstrom aus dem Extrazellularraum erfolgt [36], entfaltet Noradrenalin seine Wirkung indirekt, durch eine intrazelluläre Signalkaskade an dessen Ende die Freigabe von Calcium aus dem SR durch IP_3 steht. Die Bindung von Noradrenalin erfolgt vorrangig an α_1 – Rezeptoren der zellulären Membran, einem Vertreter der G-Protein gekoppelten Rezeptoren [37]. Während ein Großteil des einströmenden Calciums bei einer noradrenalininduzierten Kontraktion tatsächlich aus intrazellulären Speichern zur Verfügung gestellt wird, so erfolgt sekundär als Folge der Membrandepolarisation ein Einstrom von

extrazellulärem Calcium durch Ca_v – Kanäle. Dieser nifedipinsensible Teil einer Noradrenalin Kontraktion macht in der Mesenterialarterien der Ratte einen Anteil von 30% bis 40% an der Gesamtkontraktion aus [38, 39]

Nilsson und Aalkjaer [5] sehen die Rolle des vegetativen Nervensystems in einer Beeinflussung des Grundtonus der glatten Muskulatur durch die Variation der zentral gesteuerten sympathischen Aktivität. Neben der sympathischen Grundaktivität konnten an isolierten Präparaten beispielhaft von Brain et al. [40] im vas deferns der Maus und von Yamaguchi [41] in der Mesenterialarterie der Ratte jedoch auch spontane, repetitive Schwankungen des Membranpotentials der glatten Muskelzellen im Bereich dieser Varikositäten festgestellt werden. Brock et al. [42] stellten zudem eine spontane Freisetzung von Noradrenalin aus Varikositäten der Mesenterialarterie der Ratte fest.

1.3.4 Glatte Muskelzellen

Wie bereits unter Punkt 1.1 erläutert beruht Vasomotion auf einer synchronen Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration im glatten Muskel. Bei einem ausreichenden Anstieg führt dies über eine Aktivierung der Myosin – leichte – Ketten – Kinase zur Ausbildung einer Kontraktion [43].

Die Freisetzung von Calcium folgt dabei keinem einheitlichen Muster. Vielmehr finden sich, abhängig vom Stimulus, verschiedene Formen der Calciumfreisetzung. Diese unterscheiden sich sowohl in der Herkunft der Calciumionen als auch in der räumlichen und zeitlichen Auflösung. Besondere Reaktionszonen für diese Prozesse bilden Junctionszonen genannte Bereiche, die ca. 15% der Membranoberfläche der Zellen ausmachen. Dies sind Regionen in denen sich die Membranen des SR der Zelle bis auf wenige Nanometer annähern. Durch die eingeschränkten Diffusionsmöglichkeiten ist es dort möglich Schwankungen der Ionenkonzentrationen zu erzeugen ohne Einfluss auf die gesamte Zelle zu nehmen [44]. Auf Grund der Bedeutung für die Vasomotion soll über die Mechanismen der Calciumfreisetzung und Elimination im Folgenden ein kurzer Überblick gegeben werden.

1.3.4.1 Calciumfreisetzung im glatten Muskel

Dem glatten Muskel stehen mit dem Extrazellularraum und dem sarkoplasmatischen Retikulum zwei potentielle Kompartimente zur Verfügung aus denen Calciumionen zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration gewonnen werden können. Während der Großteil des Einstroms von extrazellulärem Calcium über spannungsabhängige L-Typ Calciumkanäle, hauptsächlich durch $Ca_v1.2$, geleistet wird [45, 46], findet der Einstrom aus dem SR sowohl über IP_3 – als auch über calciumsensitive Ryanodinrezeptoren (RyR) statt [47]. Die Charakteristik der Calciumfreisetzung unterscheidet sich dabei sowohl in der zeitlichen und räumlichen Auflösung, sowie anhand der primär beteiligten Ionenkanäle [47].

Während durch Aktivierung purinerge Rezeptoren ausgelöste junctionale Calciumtransients regelhaft im Rahmen der nervalen Stimulation zu einer kleinen initialen Kontraktion führen [47, 48], so sind beispielsweise die Reaktionen auf Calcium sparks in Abhängigkeit der lokalen Gegebenheiten zu betrachten. Diese lokalen Calciumströme aus RyR die im Zusammenhang mit nervaler Stimulation stehen [49, 50], können bei Co- Lokalisation mit calciumabhängigen Chloridkanälen zu einer Depolarisation und weiterem Calciumeinstrom beitragen [27, 47, 51]. In Nachbarschaft von calciumabhängigen Kaliumkanälen (BK – Kanäle) führen diese lokalen Calciumströme zu einer gesamtzellulären Hyperpolarisation und Relaxation [50–52].

Auf Grund der selbstverstärkenden Prozesse und des folgenden gesamtzellulären Anstieges der Calciumkonzentration spielen Calciumwaves eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Vasomotion [15, 19, 20]. Sie beruhen auf einem sequenziellen Calciumstrom durch Ryanodin – und IP_3 – Rezeptoren aus dem SR [47] sowie Ca_v – Kanälen der Plasmamembran [53]. Ihr Auftreten konnte sowohl spontan als auch eine Zunahme der Frequenz durch Agonisten am α_1 – Rezeptor in einigen wenigen Regionen, in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran beobachtet werden, die deshalb als „frequent discharge sites“ bezeichnet wurden [27, 47].

1.3.4.2 Calciumelimination im glatten Muskel

Der Elimination von Calciumionen über die Zellmembranen stehen zwei vorrangige Mechanismen zur Verfügung. Zum einen ist es der aktive Transport von Calcium durch Pumpen, P – ATPasen, die durch Spaltung von ATP Energie gewinnen, um den Konzentrationsgradienten zu überwinden. Auf Grund der ubiquitären Verteilung über die Zellmembranen und der gesteigerten Aktivität bei erhöhter intrazellulärer Calciumkonzentration wird ihnen die Regulation eines globalen Calciumanstieges zugesprochen [45, 54]. Auf Grund der Generierung von Calcium waves aus Kanälen des SR hat die Funktion der SERCA (P – ATPase des SR) für die Vasomotion eine besondere Bedeutung, so können nach Inhibition der SERCA Aktivität keine repetitiven Calciumoszillationen mehr beobachtet werden [12, 19].

Einen weiteren Beitrag zur Calciumelimination bilden Natrium – Calcium Tauscher, die sekundär aktiv den Natriumgradienten als Energiequelle nutzen um Calcium aus dem Zellinneren zu transportieren [45]. Wegen der niedrigen Affinität für Calciumionen bei jedoch hoher Kapazität liegt die Hauptaufgabe des Transporters im schnellen Wiederherstellen der Ruhe – Calciumkonzentration nach abgelaufenen Calcium transients im Bereich der Junctionszonen [44, 45]. Eine weitere wesentliche Eigenschaft ist die Fähigkeit, die Transportrichtung ab einem Membranpotential von $-35,7mV$ umzukehren [55]. Über diesen

Mechanismus leistet der Na/Ca – Tauscher auch einen Beitrag zum Calciumeinstrom während Kontraktionsvorgängen [56].

Um den stetigen Verlust von Calciumionen aus den Speichern des SR auszugleichen finden im Bereich der Junctionszonen regulatorische Prozesse statt, die der SERCA Calciumionen bereitstellen [45, 57, 58]. Bei einem Abstand der Plasmamembran vom SR von circa 20nm bestehen sehr eingeschränkte Möglichkeiten erzeugte Ionenkonzentrationsunterschiede durch Diffusion auszugleichen, was das Auftreten lokalisierter Calciumströme ermöglicht [44, 55]. Zusätzlich wird über die Interaktion des Na/Ca – Tauschers mit einer speziellen Na/K – ATPase das Umkehrpotential des Na/Ca – Tauschers in Richtung des lokalen Membranpotentials bewegt [59]. Eine funktionelle Kopplung zwischen Na/Ca – Tauschern und Na_v – Kanälen postulierten Ho et al. [56] auf Grund ihrer Ergebnisse an Untersuchungen der Mesenterialarterien der Ratte.

1.4 Oszillatoren und Synchronisation

Während es im vorherigen Abschnitt um die Mechanismen und Konsequenzen der verschiedenen Calciumevents ging, so soll im Folgenden näher auf die Bedingungen und nötigen Interaktionen der verschiedenen Strukturen eingegangen werden, die für eine synchrone, wiederholte Calciumfreisetzung erforderlich sind. Ergebnisse in der Literatur stammen vorrangig aus mathematischen Modellen. Dies ist vor allem der Tatsache geschuldet, dass die Vasomotion ein Gleichgewicht aus basaler und gesteigerter Aktivität der synchronisierenden und desynchronisierenden Faktoren erfordert. Unter aktuellen experimentellen Bedingungen ist es jedoch sehr schwierig basale Aktivität zu belassen und ausschließlich gesteigerte Aktivität zu hemmen [6, 12]. Es besteht daher ein großer Bedarf an Daten aus experimentellen Studien [20].

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Vasomotion das Ergebnis einer Synchronisation der Oszillationen mehrerer glatter Muskelzellen ist. Siehe dazu beispielhaft für Mesenterialarterien der Ratte Lamboley et al. [15]. Neben der Betrachtung möglicher Mechanismen für wiederkehrende Calciumevents werden daher in die Betrachtung der Vasomotion auch Strukturen und Abläufe mit einbezogen, die für die interzelluläre Synchronisation momentan diskutiert werden.

1.4.1 Hypothesen zum Ursprung repetitiver Calciumevents

Die Rolle des SR als Ursprung der Calciumoszillationen ist in der wissenschaftlichen Literatur vielfach beschrieben [19, 20]. Akute Inhibition einzelner Mechanismen, die den Calciumhaushalt des SR beeinflussen, wie zum Beispiel den Na/Ca – Tauscher [44], die SERCA [19] oder IP₃R und RyR [44, 60], führen zu veränderten Charakteristiken oder zur

absoluten Inhibition der Vasomotion. Ebenfalls, mit Ausnahme der Irisarterien, ist die Funktion von Ca_v – Kanälen nötig um Vasomotion aufrechtzuerhalten. In Mesenterialarterien der Ratte ist die Antwort auf nervale Stimulation zusätzlich abhängig von diesen Kanälen [19, 50].

Oszillationen der Calciumkonzentration wurden sowohl spontan, als auch nach Zugabe von vasoaktiven Substanzen in Mesenterialarterien der Ratte beobachtet. Die Freisetzung von Calcium aus dem SR erfolgt dabei in Sequenzen. Einem konstanten Ausstrom von Calcium aus dem SR werden in der Literatur einige Mechanismen entgegengestellt. Beispielsweise verringere die abfallende Calciumkonzentration im SR den Antrieb für die Calciumfreigabe. Weiterhin vermindere die adaptive Inaktivierung von RyR und eine zeitabhängige Inaktivierung von IP_3R und RyR kurzfristig die Stimulierbarkeit dieser Calciumkanäle durch ihre Liganden. Dies wird durch die Beobachtungen gestützt, dass die Steigerung der Oszillationsfrequenz durch pharmakologische Stimulation nur bis zu einem gewissen Grad möglich ist [14]. Eine weitere Limitierung durch die Calciumaufnahme in Mitochondrien wurde durch Schuster et al. [61] beschrieben.

Basierend auf den Beobachtungen, dass Oszillationen der Calciumkonzentration überwiegend auf Calciumwaves zurückzuführen sind [20], wurden intrinsische Mechanismen postuliert, die über eine dauerhafte oder repetitive Stimulation von IP_3R und RyR eine Freigabe von Calcium aus dem SR bewirken würden. Die calciuminduzierte Calciumfreisetzung (CICR) und eine intrinsische Aktivierung der PLC, Subtyp δ , durch Calcium stehen dabei im Fokus der Betrachtungen. Stimulationen durch nervale Einflüsse oder durch Änderungen des intraluminalen Druckes wurden bisher nur modulierende Effekte zugeschrieben [14].

1.4.1.1 Calciuminduzierte Calciumfreisetzung (CICR)

Wie bereits unter dem Punkt 1.3.4.1 beschrieben, konnte gezeigt werden, dass nicht nur RyR, sondern auch IP_3R Calcium als öffnenden Liganden aufweisen. Diese calciuminduzierte Calciumfreisetzung wird als Grundlage der Calciumwaves angesehen [27]. Dreja et al. [60] konnten beispielsweise zeigen, dass es nach einer langsamen Reduktion der RyR Expression, nach entsprechender Stimulation, immernoch zu Calciumwaves kam. Sie schlossen daraus dass es kompensatorisch zu einer vermehrten Calciumfreisetzung aus IP_3R kam. In Verbindung mit den von Aalkjaer und Nilsson [12] zusammengefassten mathematischen Modellen schlussfolgerten sie, dass die calciuminduzierte Calciumfreisetzung aus RyR und IP_3R im Wechsel mit der Calciumelimination durch die SERCA in der Lage ist eine anhaltende Oszillation aufrechtzuerhalten.

1.4.1.2 PLC - δ

Neben der PLC – β als Teil der klassischen Kaskade, ausgelöst durch Stimulation des α_1 -Rezeptors, existieren noch weitere Subtypen, von denen speziell der PLC - δ eine gesonderte Rolle für die Vasomotion zugeschrieben wird. Ihre Expression ist auch für die Mesenterialarterien der Ratte beschrieben [62]. Sie ist mit ca. 85kDa kleiner als die weiteren Subtypen und hat im Vergleich zu ihnen die höchste Affinität für Calcium. Die Bindung von Calcium an der PLC - δ geht mit einer gesteigerten enzymatischen Aktivität einher. Eine Verbindung von α_1 -Rezeptoren und der Aktivierung der PLC - δ ist zusätzlich beschrieben [63]. Auf Grund dieser Eigenschaften wird eine selbsterhaltende IP_3 Produktion der PLC - δ diskutiert, ausgelöst durch die IP_3 induzierte Calciumfreisetzung [18]. Das mathematische Modell im Bereich Vasomotion von Kapela et al. [6] zeigte jedoch, dass diese selbstinduzierte Aktivität der PLC - δ alleine nicht ausreichend sei um die Calciumoszillationen aufrechtzuerhalten.

1.4.2 **Synchronisation und Desynchronisation**

Vasomotion wird als Ergebnis von synchronisierten Einzeloszillationen der glatten Muskelzellen beschrieben. Diese einzelnen Oszillationen, die auf Grund der natürlichen Variationsbreite in unterschiedlichen Phasen auftreten, benötigen um als Vasomotion wirken zu können eine übergeordnete Synchronisation [6]. Matchkov [14] beschrieb, dass sich Vasomotion sowohl zwischen verschiedenen Spezies aber auch innerhalb dieser und sogar innerhalb des gleichen Stromgebietes unterscheidet. Es wird daher vermehrt von Faktoren gesprochen, die die Vasomotion, also die Synchronisation von Einzeloszillationen, negativ oder positiv beeinflussen. Unbestritten dabei ist beispielsweise die Kopplung der glatten Muskelzellen durch gap junctions als synchronisationsfördernd. Eindeutige Aussagen über das Signal, welches durch die gap junctions transportiert wird bestehen bisher jedoch nicht [6, 12, 18]. Matchkov et al. [64] beschrieben zusätzlich einen durch Calcium aktivierten, cGMP abhängigen Chloridkanal, dem über eine Depolarisation die Fähigkeit zur interzellulären Synchronisation zugesprochen wird.

Dem gegenüber stehen die Beobachtungen, dass die Hyperpolarisation, ausgelöst durch BK – Kanäle, die Empfindlichkeit für nervale Stimuli herabsetzen [50] und einer interzellulären Synchronisation entgegenwirken [6, 65].

1.4.2.1 Kopplung durch gap junctions

Die Kopplung der glatten Muskelzellen durch gap junctions ist eine feste Bedingung in vielen Modellen zur Synchronisation der Vasomotion [6, 18, 65]. Diese Annahmen basieren auf

experimentellen Daten, die zeigten, dass ein Herabsetzen der interzellulären Leitfähigkeit durch gap junctions zu einer Desynchronisation der Oszillationen führte [66, 67].

Unklarheit herrscht dagegen über das durch die gap junctions transportierte Signal. Während von Koenigsberger et al. [18] die Diffusion von Calciumionen als absolut nötig erachtet wird, geht aus den Modellen von Jacobsen et al. [65] und Kapela et al. [6] hervor, dass die Diffusion von Calcium eine untergeordnete Rolle für die Synchronisation spielt. In dem Modell von Kapela et al. [6] würde eine hundertfach erhöhte gap junction Leitfähigkeit für Calcium benötigt werden um eine Synchronisation zu erzeugen.

Umgekehrt verhalten sich die Äußerungen über die mögliche Rolle von IP_3 . Kapela et al. [6] sowie Koenigsberger et al. [18] beschrieben für IP_3 im Vergleich zu Calcium verbesserte Diffusions- und Passageeigenschaften durch gap junctions. Ein potentieller Beitrag zur Synchronisation während Vasomotion wurde jedoch nur von Kapela et al. [6] abgeleitet.

Eine von Jacobsen et al. [65] favorisierte Verbindung bestände in der elektrischen Kopplung durch gap junctions. Sie beziehen sich dabei auf Beobachtungen, dass Vasomotion außer in den Arterien der Iris mit Schwankungen des Membranpotentials einhergeht [12, 19] und die Aktivität von spannungsabhängigen Calciumkanälen besonders in den Mesenterialarterien der Ratte notwendig für das Auftreten von Vasomotion ist [12, 68]. Kapela et al. [6] sehen in ihrem Modell dagegen die Verschiebung des Membranpotentials als sekundäre Folge des Calciumeinstromes und der durch DAG aktivierten Kationenkanäle. Die elektrische Kopplung hat in ihrem Modell eher desynchronisierende Auswirkungen. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch Koenigsberger et al. [18].

1.4.2.2 Calciumsensitiver cGMP abhängiger Chloridkanal

Matchkov et al. [64] beschrieben in ihrer Arbeit einen depolarisierenden Strom der wahrscheinlich von Chloridionen getragen wird. In einem späteren mathematischen Modell konnte die gleiche Arbeitsgruppe zeigen, dass cGMP in einer kritischen Konzentration, in diesem Modell $6\mu\text{mol/l}$, in der Lage ist, bestehende Oszillationen im Zellverbund zu synchronisieren [65]. Kapela et al. [6] begründeten diesen Effekt durch eine Antagonisierung der repolarisierenden Ströme der BK –Kanäle.

Eine erhöhte cGMP Konzentration gehe dabei mit einer Senkung der Oszillationsfrequenz der einzelnen Muskelzellen einher [65]. Sie beziehen sich dabei auf die Arbeit von Rahman et al. [69] und schreiben diesen Effekt einer durch cGMP gesteigerten Aktivität der Na/K – ATPase zu. Eine Sensitivierung des BK- Kanals für Calcium durch die cGMP abhängige PKG ist jedoch ebenfalls möglich [47, 65].

1.4.2.3 BK – Kanal

Der BK – Kanal ist ein Kaliumkanal hoher Leitfähigkeit, der durch intrazelluläre Bindung von Calciumionen öffnet. Die aus der Öffnung resultierende Hyperpolarisation wirkt einem verstärkten Calciumeinstrom durch weitere Membrandepolarisation entgegen [47]. Im Zusammenhang mit Vasomotion konnte von McNeish et al. [70] in Cerebralarterien der Ratte beobachtet werden, dass durch Blockade der Leitfähigkeit der BK – Kanäle die Oszillationen des Membranpotentials zunahmten. Im Modell für Mesenterialarterien der Ratte von Kapela et al. [6] wurde eine desynchronisierende Wirkung der BK – Kanäle beschrieben, indem sie den Depolarisationen durch nicht selektive Kationenkanäle und cGMP abhängigen Chloridkanälen entgegenwirkten.

1.5 Begriffsdefinition

Aalkjaer und Nilsson [12] beschrieben, dass sich Formen von Vasomotion wahrscheinlich in fast jedem Gefäß finden lassen. Auch die spontanen Kontraktionen der Portalvene werden mit Vasomotion in Verbindung gebracht [71]. Der Begriff trägt jedoch den variierenden zugrundeliegenden Mechanismen, die in Abhängigkeit des Gefäßbettes diskutiert werden, wenig Rechnung. Weiterhin können auf Grund der hier verwendeten experimentellen Methode nur Rückschlüsse auf die intrazelluläre Calciumkonzentration getroffen werden, der synchrone Anstieg der Konzentration also nicht direkt beobachtet werden. Für die untersuchten Kontraktionen der Mesenterialarterien werden daher in dieser Arbeit die von Golenhofen geprägten, deskriptiven Begriffe der phasischen und tonischen Aktivität verwendet [72].

1.6 Fragestellung

In dieser Arbeit soll die Fragestellung bearbeitet werden, in wie weit zyklische Entladungen der nervalen Varikositäten zu rhythmischen Kontraktionen der glatten Muskulatur der Gefäße führen können.

Diese Untersuchungen sollen am Beispielpreparat der Mesenterialarterie der Ratte anhand der Organbadmyographie am isolierten Gefäßabschnitt durchgeführt werden. Hierzu sollen nach zuvor erfolgter Induktion rhythmischer Kontraktionen der glatten Muskulatur, unter Zuhilfenahme von Tetraethylammonium, die Reaktionen auf die Zugabe Nifedipin, Prazosin und Tetrodotoxin, die verschiedene Ebenen der nervalen Signalübertragung gezielt inhibieren, untersucht werden. Weiterhin sollen durch den Vergleich mit standardisierten Kontraktionen, ausgelöst durch Noradrenalin, elektrischer Feldstimulation und kaliumreicher Lösung Erkenntnisse über die Signalweiterleitung innerhalb des zellulären Netzwerkes während den untersuchten rhythmischen Kontraktionen gewonnen werden.

2 Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen dienten der Identifizierung der involvierten Zelltypen an der Entstehung von phasischer und tonischer Aktivität in den Mesenterialarterien der Ratte. Die ermittelten Daten entstammen Experimenten, die mit einem Organbadmyographen durchgeführt wurden, der speziell für die Messung von Kräften ausgelegt ist, die bei der Kontraktion von Gefäßen entstehen. Die Verarbeitung der Daten und Erstellung der Grafiken wurden mit dem Datenverarbeitungsprogrammen Excel und SPSS durchgeführt. Im folgenden Abschnitt 2.1 wird zunächst der Versuchsaufbau erläutert, um im weiteren Verlauf auf die einzelnen Experimente und verwendeten Pharmaka einzugehen.

2.1 Experimentelle Methode

2.1.1 Funktionsweise der Organbadmyographie

Das Prinzip der Organbadmyographie ist es Kontraktionen von isolierten muskulären Geweben aufzuzeichnen. Dazu werden muskelhaltige Präparate unterschiedlichen Ursprunges isoliert und unter Umspülung mit Salzlösungen in ein physiologisches Milieu gebracht. Um Messungen vornehmen zu können werden die Präparate zwischen zwei Halterungen eingespannt, wobei eine von beiden mit einem Kraftmessgerät verbunden ist und so die Kraft, die auf diese Halterung ausgeübt wird aufgezeichnet werden kann. In dem für diese Arbeit verwendeten Myographen wurde die Reduktion des Gefäßinnendurchmessers von Mesenterialarterien aufgezeichnet, indem zwei parallel verlaufende 0,1mm dicke Drähte aus rostfreiem Stahl durch die Gefäße gezogen wurden und mit dem Myographen verbunden wurden. Siehe dazu auch Abbildung 3. Die Methodik wurde maßgeblich durch die Arbeiten von Mulvany etabliert, siehe dazu Mulvany und Halpern [73].

Das in diesen Experimenten verwendete Kraftmessgerät war dabei in der Lage der erzeugten Kontraktion in geringem Ausmaß nachzugeben, sodass die gemessenen Kontraktionen einen auxotonischen Charakter hatten. Kontraktionen der Gefäße wurden mittels Zugabe von Pharmaka und der Applikation von elektrischem Strom in das Organbad erzeugt.

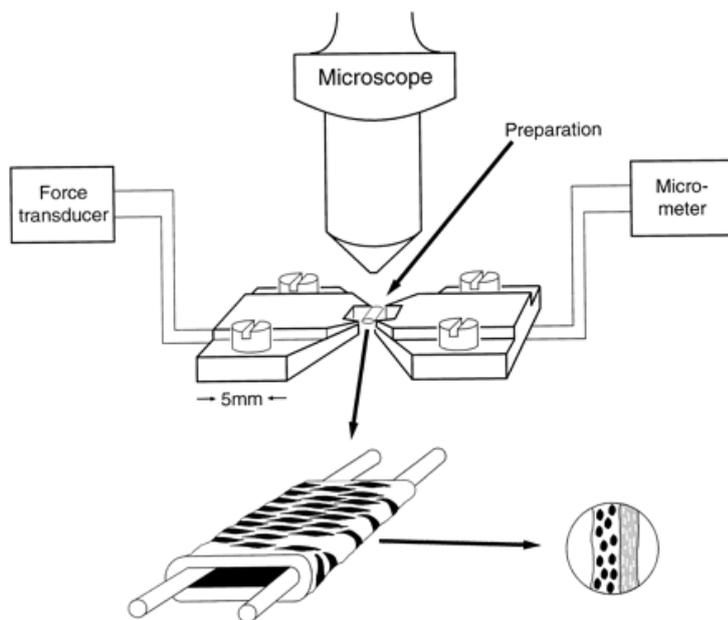


Abbildung 3 Schematische Abbildung eines Organbadmyographen mit vergrößerter Darstellung der mit Drähten durchzogenen Mesenterialarterie aus Verlohren 2005 [74]

2.1.2 Versuchsaufbau

Für die Messungen wurde ein Organbadmyograph nach Mulvany (Experimenteria Ltd., Budapest, Ungarn) verwendet. Das Organbad besaß ein Fassungsvermögen von 5ml und wurde aus drei regulierbaren Düsen begast, um eine konstante Sauerstoffversorgung sowie einen physiologischen pH – Wert zu gewährleisten. Weiterhin befanden sich die Befestigungen für die Drähte, die durch das zu untersuchende Gefäß gezogen wurden, innerhalb des Bades. Die auf diese Befestigungen ausgeübten Kräfte wurden in elektrische Spannung umgewandelt und zu einem Analog – Digitalwandler (ADInstruments PowerLab 2/25, ADI Dunedin, Neuseeland) übertragen. Dieser digitalisierte das Signal, sodass es auf einem Windows Computer mit dem Programm LabChartReader5 (ADInstruments Dunedin, Neuseeland) ausgelesen und die Daten bearbeitet werden konnten. Innerhalb des Organbades wurden zwei Elektroden platziert, die an einen Stimulator (Grass medical Instruments Quincy, USA) angeschlossen waren. Mit diesen wurden für bestimmte Versuche definierte elektrische Ströme durch das Organbad geleitet und so die Gefäße zur Kontraktion gebracht.

2.1.3 Eichung der Messinstrumente

Mit Hilfe eines definierten Gewichtes erfolgte die Zuordnung der vom Myographen erzeugten elektrischen Spannung zu einer definierten Kraft. Nachdem das elektrische Signal mittels Regler am Powelab unter Ruhebedingungen auf 0 Volt gesetzt wurde, wurde das Organbad senkrecht aufgestellt und an den kraftmessenden Arm mittels Faden ein Gewicht angebracht, welches mittels Schwerkraft einen direkten Zug ausübte. Die dadurch erzeugte

Spannung entsprach der nach Newton errechneten, durch das Gewicht erzeugten Kraft. Anhand dieser Messwerte erfolgte nach Eingabe in das LabChartReader Programm die direkte Umrechnung der während der Versuche gemessenen elektrischen Spannung in die entsprechende Kraft. Unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen entsprach die gewählte Vorspannung der Präparate mit 5mN einem transmuralen Druck von circa 15mmHg. Anhand der von Mulvany [73] etablierten Methode für die Organbadmyographie von Gefäßen errechnete sich der transmurale Druck nach folgender Formel:

$$P \text{ [N/m}^2\text{]} = 2\pi T / ((2+\pi)d+2f)$$

Die Wandspannung wurde zuvor nach folgender Formel berechnet:

$$T \text{ [N/m]} = F/2g$$

wobei T – Wandspannung, F – gemessene Kraft, g – Gefäßlänge, d – Drahtdicke, f – Drahtabstand.

2.1.4 Materialgewinnung und Beginn der Messungen

Die Gewinnung von Organpräparaten erfolgte aus Ratten der Stämme Wistar und CD. Wichtigstes Kriterium für die Auswahl der Versuchstiere war ihre Größe, da sich die Gefäße bei ausgewachsenen Tieren als am geeignetsten für die Präparationsschritte erwiesen hatten. Nach Sedierung durch eine Äthernarkose erfolgte das Töten der Versuchstiere durch Dekapitation. Anschließend wurde der Bauchraum eröffnet und mit Präparationslösung durchspült, um die Gefäße vor Austrocknung zu bewahren. Nach Entnahme des gesamten Dünndarmes mitsamt der am Abgang der Aorta abgetrennten Gefäße und Einbringen des Präparates in Präparierlösung, erfolgten die weiteren Schritte unter Auflichtmikroskopie. Bei dem im Halbkreis aufgespannten Dünndarmpaket stellten sich die Mesenterialgefäße wie Speichen eines Rades dar. Nach Befreien der Arterien vom umgebenen Fett, separieren von der Vene und schneiden in circa 4mm lange Ringe, wurden die Arterienringe in ein weiteres Präpariergefäß überführt und mit zwei Drähten durchzogen. Es wurde dabei darauf geachtet so wenig wie möglich in Berührung mit dem Endothel zu kommen, um dies so intakt wie möglich zu erhalten. Am besten eigneten sich hierfür die erst- und zweitgradigen Abgänge des Mesenterialarterienhauptstammes. Letztlich wurden die Drähte noch rechtwinklig gebogen um das spätere Einspannen in den Myographen zu erleichtern. Das Präparat konnte dann in das Organbad überführt werden, welches mit 37°C warmer Krebslösung gefüllt war. Es erfolgte anschließend die Fixierung der Drahtenden in dem Myographen. Nach einer Phase der Äquilibrierung wurden die Gefäßringe unter eine Vorspannung von 5mN gebracht und nach einer weiteren Adaptationsphase mittels elektrischer Stimulation nach einem Standardschema, auf welches unter Abschnitt 2.2.8 näher eingegangen wird, auf Reagibilität überprüft. Sofern eine prompte und reproduzierbare Kontraktion folgte, wurde das Präparat als vital eingestuft. In anderen Fällen wurde das Präparat verworfen.

2.2 Substanzen, Lösungen und elektrische Stimulation

Für die Präparation der Gefäße wurde eine spezielle, pH stabile Lösung verwendet um die Gefäße vor austretendem Darminhalt abzuschirmen. Sie setzte sich wie folgt zusammen: NaCl 144,9mmol/l, KCl 4,5mmol/l, NaH₂PO₄ + 1H₂O 1,2mmol/l, MgSO₄ 5mmol/l, CaCl₂ 0,1mmol/l, EDTA 0,025mmol/l, HEPES 5mmol/l.

Für die Organbadversuche wurde eine Salzlösung, auch als Krebslösung bezeichnet, genutzt, deren Elektrolytkonzentration physiologischen Verhältnissen entsprach. Sie bestand aus: NaCl 112mmol/l, NaHCO₃ 25mmol/l, KH₂PO₄ 1,2mmol/l, KCl 4,7mmol/l, MgCl₂ + 6H₂O 1,2mmol/l, CaCl + 2H₂O 2,5mmol/l, Glucose 11,5mmol/l.

Die Krebslösung wurde aus Stammlösungen ohne Glucose und CaCl₂ vorgefertigt und bei 8°C gelagert. Glucose und Calciumchlorid wurden erst am Versuchstag hinzugegeben. Dies diente der Beschränkung von bakterieller Kontamination und dem Verhindern der Bildung von Salzkristallen. Diese würden aus Calciumverbindungen ausfallen, wenn keine konstante Carbogenbegasung zugeführt werden würde. Die Experimente im Organbad erfolgten unter konstanter Begasung mit Carbogengas, bestehend aus 95% O₂ und 5% CO₂. Es wurde damit sowohl die Versorgung mit Sauerstoff gewährleistet als auch durch den entstehenden Bikarbonatpuffer ein konstanter pH-Wert von 7,4 eingestellt.

In nachfolgenden Experimenten erfolgte die Zugabe von Pharmaka mit dem Ziel sowohl Kontraktionen der Gefäße zu erzeugen als auch einzuschränken. Als Lösungsmittel diente nach Herstellerangaben destilliertes Wasser oder Dimethylsufoxid. Auswirkungen der Lösungsmittel auf das Reaktionsverhalten der Präparate wurde in Vorversuchen ausgeschlossen. Auf die Wirkungsweise der Wirkstoffe soll im Folgenden eingegangen werden.

2.2.1 Tetraethylammonium

Zur unspezifischen Inhibierung von Kaliumströmen der Typen K_v, K_{Ca}, K_{Na} und teilweise K_{ir} [75, 76], wurde TEA in einer Konzentration von 10⁻² mol/l verwendet. Es erfolgte der Einsatz von TEA der Firma Sigma – Aldrich Co. St. Louis, USA.

2.2.2 Indomethacin

Indomethacin ist ein Inhibitor der Cyclooxygenasen eins und zwei und verhindert somit unter anderem die Produktion von Prostaglandinen [77]. Ziel in dieser Arbeit war es die endotheliale Produktion von PGI₂ zu hemmen. Dazu wurde Indomethacin in einer Konzentration von 10⁻⁶ mol/l eingesetzt.

Es erfolgte der Einsatz von Indomethacin der Firma Sigma – Aldrich Co. St. Louis, USA.

2.2.3 Noradrenalin

Zur Auslösung maximaler Kontraktionen wurde in diesen Versuchen Noradrenalin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l eingesetzt. Die Dosisermittlung erfolgte durch vorhergehende Dosis-Wirkungsexperimente. Es erfolgte der Einsatz von Noradrenalin der Firma Sigma – Aldrich Co. St. Louis, USA.

2.2.4 kaliumreiche Lösung

Die Zugabe dieser Lösung erfolgte um mit Hilfe einer erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration von 40 mmol/l Depolarisationen der Zellmembranen zu erzeugen, die zu einer Öffnung spannungsabhängiger Ionenkanäle führen würden, um letztlich durch Calciumströme Kontraktionen der glatten Muskelzellen zu erzeugen. Um Effekten vorzubeugen, die durch eine Verschiebung der Osmolarität erzeugt werden könnten, bestand die Lösung aus einer modifizierten Krebslösung. Hierfür erfolgte der äquimolare Austausch von NaCl zugunsten von KCl auf eine KCl Konzentration von 38,8mmol/l. Während der Experimente erfolgte die Zugabe in Form eines kompletten Austausches der vorher entfernten Standardkrebslösung.

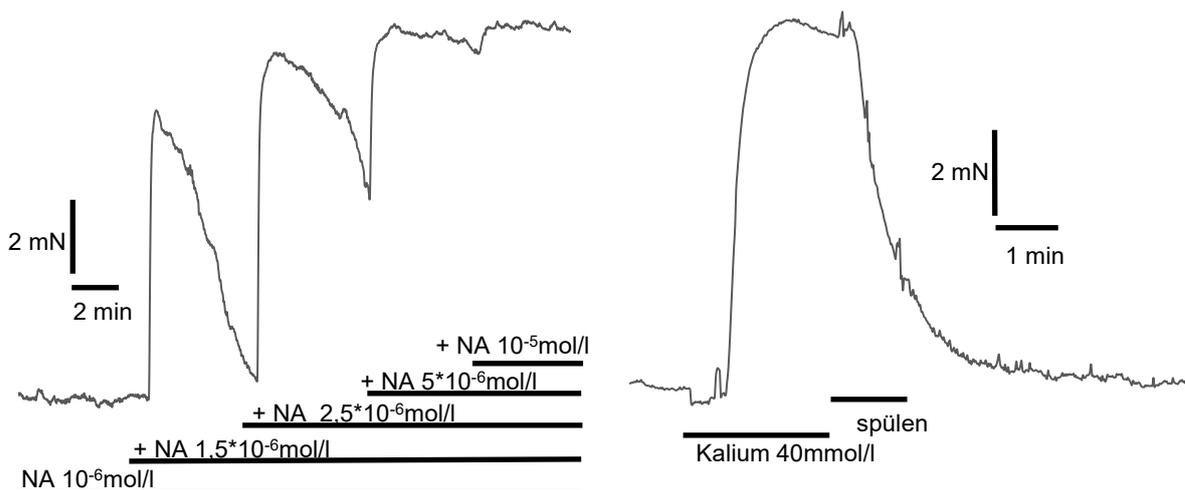


Abbildung 4 Noradrenalin- und Kaliumkontraktionen

A: Noradrenalinantwortverhalten – Erhöhung der im Organbad enthaltenen NoradrenalinKonzentration alle fünf Minuten um dargestellte Beträge, maximale Reaktion bei 10^{-5} mol/l; B: Kalium Antwortverhalten – Austausch der Organbadlösung mit einer kaliumreichen Lösung (40mmol/l), Wiederherstellung der physiologischen Elektrolytkonzentration durch spülen mit Krebslösung.

2.2.5 Prazosin

Als Antagonist adrenerger Signalübertragung an den Rezeptoren α_{1A} , α_{1D} , α_{1B} , α_{2A} , α_{2B} und α_{2C} [76] wurde in dieser Arbeit Prazosin in einer Konzentration von 10^{-6} mol/l eingesetzt. Es erfolgte der Einsatz von Prazosin der Firma Tocris bioscience Ellisville, USA.

2.2.6 Nifedipin

Nifedipin ist ein Inhibitor für spannungsabhängige Kationenkanäle der Typen $K_v1.2$, $Ca_v1.1$ und $Ca_v1.2$ [76]. Wobei für die in dieser Arbeit verwendeten Gewebe und Konzentration von 10^{-6} mol/l die Inhibition der $Ca_v1.2$ Kanäle der glattmuskulären Membran von Bedeutung ist [78]. Auf Grund der Lichtempfindlichkeit von Nifedipin wurden die Experimente in völliger Dunkelheit durchgeführt. Es erfolgte der Einsatz von Nifedipin der Firma Research Biochemicals International Natick, USA.

2.2.7 Tetrodotoxin

Tetrodotoxin ist ein Kanalblocker spannungsabhängigen Natriumkanäle (Na_v) [79], die im Allgemeinen für die Ausbreitung und Aufrechterhaltung von Aktionspotentialen verantwortlich sind. In den Widerstandgefäßen der Ratte findet sich der $Na_v1.7$, der neben Spinalwurzelzellen und neuroendokrinen Zellen auch in den Zellen des sympathischen Nervensystems exprimiert ist [80]. Zusätzlich bestehen Hinweise auf Na_v – Kanäle auf glatten Muskelzellen der Mesenterialarterien der Ratte [81]. Die verwendete Wirkstoffkonzentration von TTX war mit 10^{-7} mol/l bemessen.

Es erfolgte der Einsatz von Tetrodotoxin der Firma Tocris bioscience Ellisville, USA.

2.2.8 Elektrische Feldstimulation

Mit Hilfe von zwei in das Organbad eingebrachten Elektroden konnten elektrische Ströme in Verlaufsrichtung der Gefäße appliziert werden. Die elektrische Feldstimulation diente in Experimenten mit Mesenterialarterien bisher zur Untersuchung nervaler Strukturen. Lamont et al. [82] beschrieben, dass mittels EFS eine Freisetzung von Transmittern aus nervalen Endigungen erzeugt werden könne, wie sie in ihrer Stärke und Zusammensetzung durch externe Applikation nur schwer zu simulieren wäre. Weiterhin konnte im Hinblick auf phasische Aktivität beobachtet werden, dass die EFS zu einer Synchronisation von Prozessen beiträgt [65]. Das in dieser Arbeit verwendete Paradigma zur Stromapplikation ist in leicht abgewandelter Form seit vielen Jahren innerhalb der Arbeitsgruppe an unterschiedlichsten Geweben erfolgreich erprobt worden. Die durch einen Generator erzeugten Spannungen von 50V und 70V wurden mit Hilfe eines 1k Ω Widerstandes in Stromstärken von 50mA und 70mA transformiert und mit einer Gesamtdauer von drei

Sekunden appliziert. Diese Impulse setzten sich wiederum aus, mit einer Frequenz von 50Hz, wiederkehrenden Rechteckströmen zusammen, die in ihrer Einzeldauer im Bereich von 1ms bis 10ms variiert wurden.

Wenn nicht anders erwähnt wurde als Standard ein Reiz folgender Zusammensetzung abgegeben: 3s (Gesamtdauer) 50Hz (Frequenz der Einzelimpulse) 50mA 5ms (Einzelimpulsdauer).

2.3 Experimente

Für die Charakterisierung der Kontraktionen der Widerstandsgefäße wurden die jeweiligen zellulären Komponenten spezifisch mit kontraktionsfördernden Pharmaka oder elektrischen Reizen adressiert. Weiterhin wurden nach induzieren phasischer oder tonischer Aktivität, einzelne Zellstrukturen durch die Gabe von Pharmaka in ihrer Aktivität blockiert. Der Ablauf der Experimente erfolgte nach zuvor festgelegten Standards, die sowohl die Qualität der Testlösungen als auch die Abläufe beinhalteten. Die Zugabe der Pharmaka in die Organbadlösung erfolgte stets an einer definierten Stelle um Diffusionsbedingte Unterschiede im Anfluten zu reduzieren.

2.3.1 Externe Reizung und Auswirkungen von TTX, Prazosin und Nifedipin auf die Reizantwort

Zielsetzung dieser ersten Experimente war es sowohl das Ansprechen der Präparate sowie die Möglichkeit der pharmakologischen Beeinflussung der Reizantwort zu überprüfen und zu dokumentieren. Die drei verwendeten Pharmaka Nifedipin, Prazosin und TTX hatten zum Ziel sowohl transmittervermittelte Erregungen als auch Reaktionen durch depolarisierende Vorgänge einzuschränken.

2.3.1.1 Elektrische Feldstimulation und Wirkung von Tetrodotoxin

Mit der elektrischen Feldstimulation sollte sowohl die Antwort auf das Auslösen von nervalen Aktionspotentialen überprüft werden als auch die Inhibition der Aktionspotentiale durch Tetrodotoxin demonstriert werden. Die elektrischen Stimulationen wurden nach definiertem Paradigma durchgeführt, in dem eine Variation der applizierten Stromstärke sowie der Dauer der Einzelimpulse vorgenommen wurde. Die Reizdauer von 3s sowie die Frequenz von 50Hz blieben dabei konstant und es erfolgten jeweils Durchläufe für die Stromstärken 50mA und 70mA. In jedem Durchlauf wurden im Abstand von zwei Minuten vier Reize gesetzt, die aufsteigend eine Einzelimpulsdauer von 1ms, 2ms, 5ms und 10ms beinhalteten. Unter Vorlage von Tetrodotoxin wurde dieses Paradigma erneut durchlaufen und die Amplituden

der zugehörigen Stimulationen verglichen. Die Bestimmung der Amplitudengröße erfolgte unter Zuhilfenahme einer eigens programmierten Excel-Makro, auf die im weiteren Verlauf näher eingegangen wird.

2.3.1.2 Noradrenalin und Wirkung von Prazosin

Maximale Kontraktionen ausgelöst durch Noradrenalin wurden für spätere Auswertungen als Referenzwerte herangezogen. Für dieses, sowie auch für alle weiteren Experimente mit Noradrenalin wurde eine Konzentration von 10^{-5} mol/l verwendet. Zur Demonstration der Prazosinwirkung erfolgte zunächst eine maximale Noradrenalin Kontraktion und dann nach mehrfachen Ausspülen des Organbades unter Vorlage von Prazosin eine erneute Noradrenalingabe. Zur Quantifizierung wurde jeweils die maximal erreichte Kraft, nach Abzug des Ruhetonus, herangezogen, die mit Hilfe des LabChartReader bestimmt wurde.

2.3.1.3 kaliumreiche Lösung und Wirkung von Nifedipin

Kontraktionen durch erhöhte Kaliumkonzentration dienten ebenfalls als Referenzwerte. Anders als Noradrenalin wurden hier jedoch keine maximalen Kontraktionen angestrebt. Es wurde eine Konzentration verwendet, die unter physiologischen Druckbedingungen gerade ausreichend ist, um einen vollständigen Verschluss des Gefäßlumens zu erzeugen. VanBavel et al. [83] konnten dies für eine Kaliumkonzentration von 40 mmol/l demonstrieren. Der experimentelle Ablauf und die Quantifizierung der Inhibition der Kaliumkontraktion durch Nifedipin erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie für die Noradrenalin – Prazosin Interaktion.

Im Anschluss an diese Experimente erfolgte eine vergleichende Auswertung der durch Stimulation erzeugten Amplituden. Mittels Korrelationsanalyse nach Pearson wurden die Kontraktionen nach Standard EFS und unter erhöhter Kaliumkonzentration jeweils bezogen auf die Amplitude der zugehörigen Noradrenalin Kontraktion analysiert. Es wurde hierfür diejenige EFS Kontraktion ausgewählt, die unmittelbar vor Zugabe von Noradrenalin ausgelöst wurde. Weiterhin erfolgte aus den jeweiligen Datenpaaren die Berechnung und graphische Darstellung der zugehörigen Regressionsgerade.

2.3.2 Bestimmung der TEA – Schwellenkonzentration für phasische Aktivität und Einfluss von Indomethacin auf die TEA Schwelle

Das folgend beschriebene Experiment diente der Bestimmung der nötigen Wirkstoffkonzentration für die Induktion der phasischen Aktivität. Zusätzlich wurde untersucht, ob das Endothelprodukt PGI_2 einen hemmenden Einfluss auf die phasische

Aktivität ausübt und damit die TEA Schwelle beeinflusst. Dazu wurden bei den untersuchten Präparaten die Organbadlösung mit TEA von 10^{-4} mol/l beginnend alle zehn Minuten nach folgendem Schema, ohne zwischenzeitliches Spülen der Lösung, auftitriert: 10^{-4} mol/l → $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l → 10^{-3} mol/l → $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l → 10^{-2} mol/l.

Fünf Minuten nach Erhöhung der TEA Konzentration erfolgte jeweils eine elektrische Stimulation nach dem bekannten Standardschema (3s 50Hz 50mA 5ms), um dessen synchronisierenden Effekt zu nutzen. Die Messung wurde beendet sobald sich phasische Aktivität etablierte.

Zwischen den Vergleichsmessungen erfolgte mindestens eine Pause von 20min um den Präparaten Zeit zu geben Stoffwechselprodukte zu resynthetisieren sowie Transmitter für Signalübertragungen wieder bereitzustellen.

Für die Vergleichsmessungen wurde Indomethacin in einer Konzentration von 10^{-6} mol/l mindestens zehn Minuten vor der ersten TEA Zugabe vorgelegt. Nach zehn minütiger Wirkungszeit wurde das Präparat nochmals gespült, mit dem Ziel möglichst alle Prostaglandine aus der Lösung zu entfernen. Im Anschluss daran erfolgte sofort wieder die Zugabe von Indomethacin 10^{-6} mol/l. Bei jeweils der Hälfte der Präparate erfolgte der erste Untersuchungsdurchlauf ohne, im zweiten Durchlauf dann mit Indomethacin. Bei der anderen Hälfte verhielt sich die Reihenfolge umgekehrt. Dieses Vorgehen wurde gewählt um ein eventuell früheres Ansprechen der Präparate auf TEA im zweiten Durchlauf, bedingt durch die TEA – Gaben im vorherigen Durchgang, aufzudecken und von eventuellen Wirkungen des Indomethacins unterscheiden zu können.

2.3.3 Pharmakologische Beeinflussung induzierter Aktivität

Wesentliche Intention dieser Arbeit war es, durch Ausschalten spezifischer Signalwege das Verhalten phasischer Aktivität zu analysieren. Durch die Vorexperimente sollte die Wirksamkeit der gewählten Pharmaka zur Inhibition der verschiedenen Ebenen der Signalübertragung im sympathischen Nervensystem überprüft werden. In diesen Experimenten erfolgte die gezielte Elimination dieser Signalwege während TEA induzierter phasischer und tonischer Kontraktionen.

2.3.3.1 Pharmakologische Beeinflussung phasischer Kontraktionen

Nach erfolgter Reagibilitätsprüfung mittels des Standard EFS Reizes wurden die Mesenterialarterien mit Hilfe von TEA 10^{-2} mol/l in den Zustand phasischer Kontraktionen versetzt. Sobald sich repetitive Kontraktionen für mehr als fünf Minuten etabliert hatten, wurde jeweils Nifedipin, Prazosin oder TTX in oben genannter Konzentration, in das Organbad eingebracht und die Reaktionen der Präparate für weitere fünf Minuten

beobachtet. Als Messparameter dienten sowohl die Anzahl phasischer Kontraktionen fünf Minuten vor und nach Zugabe der Pharmaka, sowie die mittlere Kraft in eben diesem Vergleichszeitraum. Die Auszählung der phasischen Kontraktionen erfolgte mit einem speziellen Makro innerhalb Excels, welches unter Punkt 2.3.5 näher erläutert wird. Die Berechnung der mittleren Kraft wurde mit Hilfe des LabChartReader durchgeführt und von den Messwerten noch der Ruhetonus subtrahiert.

2.3.3.2 Pharmakologische Beeinflussung tonischer Kontraktionen

Wiederum nach erfolgter Reagibilitätsprüfung mittels Standard EFS wurde dem Organbad TEA 10^{-2} mol/l zugesetzt. Erfolgte nun spontan oder über den Weg der phasischen Aktivität die Entwicklung einer tonischen Kontraktion, so wurde diese beobachtet, bis sich eine relativ konstante Plateauphase eingestellt hatte. Es wurde nun erneut jeweils Nifedipin, Prazosin oder TTX in den definierten Konzentrationen hinzugegeben und die Reaktion beobachtet bis sich ein neues Kraftniveau etablierte. Als Messparameter diente die im Mittel erzeugte Kraft während der Plateauphase vier Minuten vor Zugabe der Pharmaka verglichen mit dem durchschnittlichen Kraftniveau nach Zugabe der Pharmaka und Stabilisierung in einem maximalen Zeitraum von vier Minuten. Von diesen Messwerten wurde wiederum der Ruhetonus abgezogen.

2.3.4 Charakterisierung phasischer Aktivität

Um eine genaue Charakterisierung des Phänomens der phasischen Aktivität vornehmen zu können, erfolgte eine ausgiebige Beschreibung nach qualitativen und quantitativen Gesichtspunkten. Um quantitative Aussagen über das Ausmaß der spontanen Kontraktionen der Mesenterialgefäße machen zu können, wurden von allen Präparaten, die phasische Aktivität zuverlässig etablieren konnten, ausgewählte Bereiche analysiert.

Bei diesen Bereichen handelte es sich um Cluster vermehrter Aktivität auf deren Beschreibung genauer im Ergebnisteil eingegangen wird. Bei mehreren zur Verfügung stehenden Clustern erfolgte die Auswahl unter Berücksichtigung möglichst weniger Überlagerungen von Einzelkontraktionen und der größtmöglichen Dauer. Innerhalb der ausgewählten Bereiche wurde die durchschnittliche Amplitudenhöhe und der durchschnittliche Kraftanstieg, sowie der mittlere Abstand zur vorherigen Kontraktion aller im Cluster enthaltenen Einzelkontraktionen bestimmt. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der durchschnittlichen Kraft über dem Ruhetonus im ausgewählten Zeitraum. Der Ruhetonus wurde, wenn nicht anders erwähnt, definiert durch die durchschnittliche Kraft im Bereich von 1,5min vor TEA – Zugabe.

Für die Berechnungen wurden alle einzelnen Kontraktionen im ausgewählten Bereich nach den oben genannten Parametern vermessen und im Folgenden für das jeweilige Präparat das arithmetische Mittel für Amplitudenhöhe, Kraftanstieg und Abstand zur vorhergehenden Kontraktion gebildet. Dies war notwendig, um die unterschiedliche Länge der analysierten Bereiche pro Präparat und die damit verbundene Variation der Anzahl an gemessenen Kontraktionen auszugleichen. Alle weiteren Berechnungen und Analysen wurden dann mit diesen gemittelten Messwerten durchgeführt.

Für den Zweck der Erfassung der gesuchten Kontraktionen und deren Vermessung wurde eigens eine Excel Makro programmiert. Dieses Programm innerhalb einer Excelanwendung ermöglichte es aus den Rohdaten, die aus dem LabChart ausgelesen wurden, eigenständig Kontraktionen zu erkennen und die oben genannten Parameter zu berechnen. Eine genauere Beschreibung der Funktionsweise des Quellcodes findet im nachfolgenden Punkt statt.

Um das Phänomen phasischer Kontraktionen vergleichbar zu quantifizieren und nähere Erkenntnisse über die möglichen Auswirkungen in vivo zu erhalten, wurde die Kraftentwicklung der phasischen Aktivität mit Kontraktionsstärken von Referenzkontraktionen verglichen. Dazu wurden Präparate zusätzlich mit Noradrenalin, Kalium oder Standard EFS als Referenz kontrahiert und die maximale Amplitudenhöhe nach dieser Stimulation mit der durchschnittlichen Amplitudenhöhe der phasischen Kontraktionen verglichen. Es erfolgte dazu eine Korrelationsanalyse nach Pearson und die graphische Darstellung der Regressionsgerade.

Eine Betrachtung zu Kennzahlen der tonischen Aktivität wurde ebenfalls durchgeführt. Es erfolgte die Messung der durchschnittlich erreichten Kraft im Bereich vier Minuten vor Terminierung des Tonus durch pharmakologische Beeinflussung oder Spülung. Weiterhin erfolgte die Bestimmung der Zeit von TEA – Gabe bis zum Übergang von phasischen Kontraktionen in einen stetigen Tonus. Präparate, die direkt nach TEA – Gabe eine tonische Reaktion zeigten wurden für diese Betrachtung nicht beachtet. Eine genaue Beschreibung der Reaktionsformen nach TEA – Gabe wird im Ergebnisteil näher betrachtet.

2.3.5 Funktionsweise des Analyseprogrammes

Die Auswertung der Kontraktionen erfolgte mittels einer eigens programmierten Excel Makro. Die für die Berechnung benötigten Daten wurden aus dem LabChart entnommen. Dazu wurde aus den untersuchten Bereichen pro Sekunde zehn Messwerte der gemessenen Kraft ausgelesen, dem genauen Zeitpunkt zugeordnet und in die Auswertmaske übertragen. Die Auswertung von Kontraktionen erforderte einen Referenzbereich als Bezugsgröße, um durch das Grundrauschen bedingte Schwankungen der gemessenen Kraft von echten

Kontraktionen unterscheiden zu können. Als Referenzbereich für die Auswertung phasischer Kontraktionen wurden jeweils die 1,5min vor TEA - Zugabe gewählt. Aus diesem Bereich wurde eine Referenzamplitude bestimmt. In der späteren Messung musste dieser Kraftunterschied von einer Kontraktion überschritten werden, um als echte Kontraktion gewertet werden zu können. Als Referenzamplitude wurde der größte Kraftunterschied festgelegt, der innerhalb eines Zeitraumes von fünf Sekunden erzielt werden konnte.

Die Auswertung des Messbereiches erfolgte nach folgendem Prinzip: Die einzelnen Messpunkte wurden schrittweise gegeneinander verglichen. Und dabei zunächst eine potentielle Kontraktion gesucht. Dazu musste ein Kraftanstieg ausgehend vom aktuellen Messwert über die zuvor bestimmte Referenzamplitude innerhalb von 1,5s erreicht werden. War dies nicht der Fall wurden vom nächsten Messpunkt aus die folgenden 1,5s abgetastet. Konnte ein relevanter Ausschlag verzeichnet werden so wurde im Bereich dieser 1,5s der kleinste Messwert bestimmt und als Start der Kontraktion markiert. Nachdem es zu einem Anstieg und nachfolgendem Abfall der Kraft kam, wurde das Ende der Kontraktion dadurch bestimmt, dass der nachfolgende Messwert größer war als sein Bezugswert direkt davor. Um Störungen dieses Algorithmus durch das Grundrauschen vorzubeugen, musste der Kraftabfall ebenfalls größer sein als die zuvor bestimmte Referenzamplitude. Der größte Messwert in diesem Intervall wurde als Amplitudenmaximum markiert.

Die Amplitudengröße errechnete sich aus der Subtraktion der Messwerte von Amplitudenmaximum und Kontraktionsstart. Aus dieser Amplitude und dem dazwischenliegenden Zeitintervall errechnete sich der Kontraktionsanstieg. Der Abstand zur Vorkontraktion ergab sich aus der zeitlichen Differenz zwischen den jeweiligen Amplitudenmaxima.

2.4 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind jeweils als Mittelwert \pm SEM und n als der Anzahl der Stichproben dargestellt. Für vergleichende Analysen der Mittelwerte wurde in Abhängigkeit der Untersuchungen der t-Test für unverbundene, sowie für verbundene Stichproben durchgeführt. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe der in Excel integrierten Anwendungen. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert $< 0,05$ festgelegt. Die Verteilung der Variablen bzw. deren Differenzen bei verbundenen Stichproben innerhalb einer Normalverteilung wurde zuvor in SPSS mit Hilfe des Shapiro – Wilk Tests überprüft.

Für Korrelationsanalysen wurden, ebenfalls mit Hilfe von Excel, die Korrelationen nach Pearson berechnet und die Regressionsgeraden grafisch dargestellt.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Experimente zur Untersuchung phasischer und tonischer Aktivität in der Mesenterialarterie der Ratte sollen im Folgenden vorgestellt werden. Um einen möglichen neuralen Ursprung des Phänomens der phasischen und tonischen Kontraktionen des glatten Muskels, die in dieser Arbeit durch TEA induziert wurden, zu untersuchen folgten die durchgeführten Experimente nachfolgenden Überlegungen.

Zunächst erfolgten standardisierte Reize auf verschiedenen Ebenen der neuralen – glattmuskulären Interaktion. Dies wurde durch Auslösung neuraler Aktionspotentiale durch EFS, Stimulation glattmuskulärer α_1 – Rezeptoren durch Noradrenalin sowie Öffnung vor allem glattmuskulärer Ca_v – Kanäle durch kaliumreiche Lösung umgesetzt. Hiermit sollte sowohl die Kinetik der daraus resultierenden Kontraktionen als auch die Möglichkeit der spezifischen Inhibition der jeweiligen Interaktionsebene durch TTX, Prazosin und Nifedipin untersucht werden. Weiterhin dienten diese durch spezifische Reize ausgelösten Kontraktionen als Referenz für spätere Analysen der Charakteristik phasischer Kontraktionen. Im nachfolgenden Schritt wurden nun phasische und tonische Aktivität auf die Reaktionen nach Gabe von TTX zur Inhibition von Aktionspotentialen, Prazosin zur Antagonisierung neural freigesetzten Noradrenalins und Nifedipin zur Blockade spannungsabhängiger Calciumkanäle auf der glattmuskulären Membran untersucht.

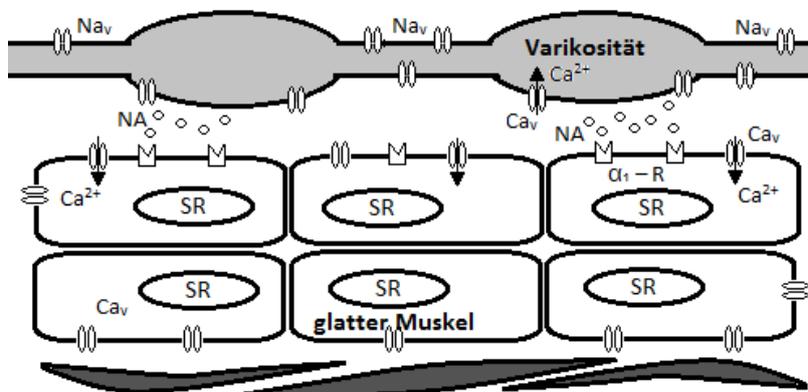


Abbildung 5 Zellen der Gefäßwand und Zielstrukturen für pharmakologische Beeinflussung

Unter Ruhebedingungen zeigten die Mesenterialarterien zunächst keine selbstständige, kontraktile Aktivität. Dem Vorspannen im Organbad begegneten sie mit einem passiven Verhalten. So konnte nach erstmaligem Vorspannen zunächst eine Reduktion des Tonus beobachtet werden, der durch erneutes Spannen auf die gewünschten 5mN eingestellt wurde. Eine myogene Kontraktion als Reaktion auf Erhöhung der Vorspannung konnte nicht beobachtet werden. Hatte sich der Ruhetonus auf ein Niveau eingestellt, war noch lediglich eine sehr geringe Reduktion des Tonus über den Verlauf der Experimente zu beobachten.

3.1 Externe Stimulation und Auswirkungen von TTX, Prazosin und Nifedipin auf die Reizantwort

Mit diesen ersten Experimenten wurde das Reaktionsverhalten der Präparate auf standardisierte externe Reize und die Veränderungen der Reaktionen nach pharmakologischer Inhibition von Rezeptor und Ionenkanälen untersucht. Mittels der Pharmaka sollte überprüft werden, in wie weit die Antwort nach nervaler Reizung mit EFS durch den Na_v – Kanal Blocker TTX, nach adrenerger Stimulation durch den α_1 – Rezeptorantagonisten Prazosin und nach Depolarisation mit kaliumreicher Lösung durch den Calciumkanalantagonisten Nifedipin zu beeinflussen ist.

3.1.1 **Nervale Reizung durch EFS und Wirkung des Na_v – Kanal Blockers TTX**

Die elektrische Feldstimulation ist eine etablierte Methode zur Reizung nervaler Strukturen im Organbad. Die systematische Stimulation der Präparate mit EFS Reizen erfolgte nach einem festgelegten Schema für dessen Beschreibung auf den Methodenteil verwiesen wird. Die Kontraktionen zeichneten sich durch einen schnellen Aufstrich und ohne Ausbildung einer Plateauphase durch ein ebenso schnelles Abfallen der Kraft auf das Grundniveau aus, beispielhaft dargestellt in Abbildung 6.

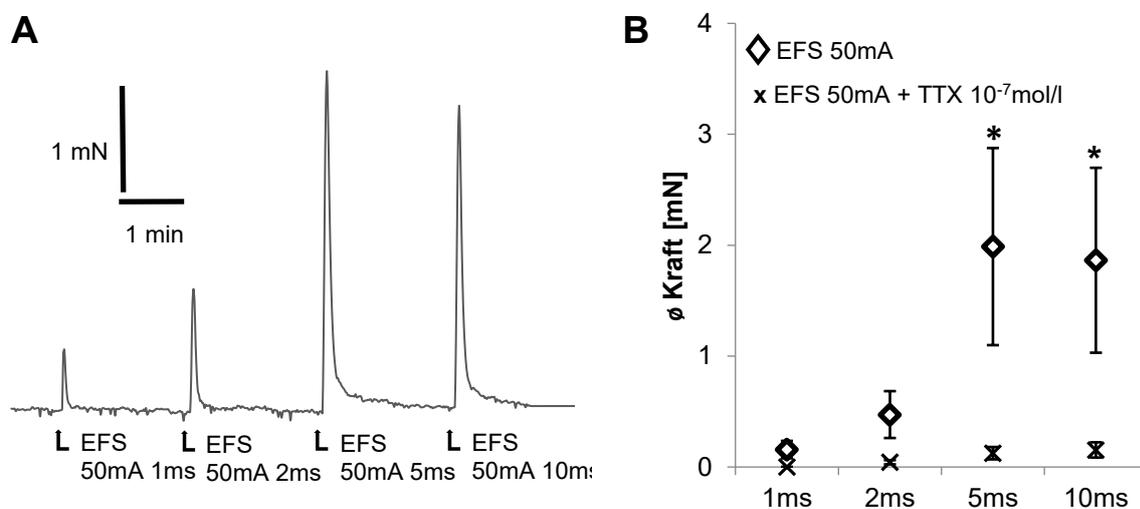


Abbildung 6 muskuläre Reaktionen der Mesenterialarterie auf verschiedene EFS Reize

A: Abfolge von EFS Stimulationen Reizdauer 3s, Rechteckstromfrequenz 50Hz, Stromstärke 50mA, Variation der Rechteckstromdauer von 1ms – 10ms; In der Regel zeigte sich ein Rückgang der Reizantwort bei 10ms Reizung

B: Unterschiede in der Kraftentwicklung zwischen EFS Reizung bei 50mA mit und ohne Vorlage von TTX 10⁻⁷mol/l ± SEM.

* Signifikante Unterschiede in der Reizantwort bei 5ms und 10ms Reizung

Der Kraftanstieg, gemessen von Beginn der Kontraktion bis zum Erreichen des Kontraktionsmaximums konnte auf durchschnittlich $0,52 \pm 0,02\text{mN/s}$ ($n = 193$) beziffert werden. Präparate, die eine verlängerte Relaxationsphase nach elektrischer Stimulation

zeigten, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Dies wurde zumeist bei Präparaten beobachtet, bei denen das Einführen der Drähte nur unter vermehrter mechanischer Beanspruchung des Gefäßes möglich war und es somit eventuell zu Schäden in der Gefäßwand gekommen sein könnte.

Mit Zunahme der Stromstärke, sowie der Einzelimpulsdauer konnte eine Erhöhung der Kontraktionsamplitude verzeichnet werden, bei dem Schritt von 5ms auf 10ms zeigte sich jedoch eine abschwächende Tendenz.

In der vergleichenden Messung unter TTX 10^{-7} mol/l konnte für den Großteil der Stimulationsstufen eine deutliche Inhibition der Kontraktion verzeichnet werden.

Nur in den Stimulationsstufen 50mA 1ms und 2ms sowie 70mA 1ms, in denen die Reizung auch unter Normalbedingungen teilweise unterschwellig blieb, konnte keine signifikante Reduktion der Reizantwort auf TTX Zugabe gezeigt werden. Der TTX resistente Teil der Kontraktionen bildete dabei die Reaktion auf Depolarisation der Präsynapse und nachfolgende Transmitterfreisetzung, sowie die direkte muskuläre Reizung ab. Als Standardreiz sollte diejenige Stimulationsstufe gewählt werden, deren Reiz stets zur Kontraktion führte und einen möglichst geringen Anteil extranervaler Erregung verursachte. In der dafür ausgewählten Reizstufe von (3s, 50Hz, 50mA, 5ms) machte diese TTX resistente Kontraktion durchschnittlich einen Anteil von lediglich 6% an der Gesamtkontraktion aus.

	50mA			
	1ms	2ms	5ms	10ms
∅ EFS [mN] ± SEM	0,16 ±0,14	0,47 ±0,19	1,99 ±0,36	1,86 ±0,28
∅ EFS + TTX 10^{-7}M [mN] ± SEM	0	0,04 ±0,04	0,12 ±0,09	0,15 ±0,11
p -Wert	*	>0,05	<0,05	<0,05
n	4	5	5	5

	70mA			
	1ms	2ms	5ms	10ms
∅ EFS [mN] ± SEM	0,31 ±0,10	1,55 ±0,33	2,90 ±0,26	2,80 ±0,23
∅ EFS + TTX 10^{-7}M [mN] ± SEM	0,06 ±0,04	0,09 ±0,08	0,28 ±0,12	0,30 ±0,11
p -Wert	>0,05	<0,05	<0,05	<0,05
n	4	5	5	5

Tabelle 1 EFS Kontraktionen Vergleich der Kraftentwicklung mit und ohne Vorlage von TTX 10^{-7} mol/l
* Bedingungen für Signifikanztestung nicht erfüllt

3.1.2 Adrenerge Reizung durch NA und Wirkung des α_1 - Rezeptorantagonisten Prazosin

Zur Stimulation vorrangig der α_1 – Rezeptoren der glatten Muskulatur erfolgte die Gabe von NA 10^{-5} mol/l. Zur Initiierung einer maximalen Kontraktion konnte durch Vorexperimente diese Konzentration definiert werden, siehe auch Abbildung 4. Die Kontraktionen zeichneten sich durch einen schnellen initialen Anstieg und anschließendem Übergang in einen Sättigungsverlauf aus. Der Anstieg vom Beginn der Kontraktion bis zum Erreichen des Maximalausschlages konnte mit $0,1 \pm 0,02$ mN/s ($n = 10$) beziffert werden. Für die Berechnung des Anstieges wurden ausschließlich Präparate verwendet, die einer sofortigen Gabe von NA 10^{-5} mol/l ausgesetzt wurden. Versuche, in denen eine NA Konzentration von 10^{-5} mol/l durch Titration erreicht wurde, wurden nicht mit in die Berechnung aufgenommen. Nach Erreichen des Kontraktionsmaximums konnte sowohl ein Bestehen der Kontraktion in einer Plateauphase sowie, in einem verzögerten Verlauf, die komplette Rückkehr zum Ausgangstonus beobachtet werden. Zusätzlich zeigte sich die Stärke der Kontraktion nach Noradrenalingabe individuell sehr verschieden. Im Gegensatz zur Gabe von Kalium 40 mmol/l wonach sich sehr stabile absolute Kontraktionswerte erzeugen ließen, reichte die Spanne der Noradrenalin Kontraktionen von minimal 0,06mN bis hin zu Messwerten von maximal 10,39mN. Die Streuung der Noradrenalinantwort im Vergleich zu Kontraktionen unter Kalium ist in nachfolgender Abbildung dargestellt.

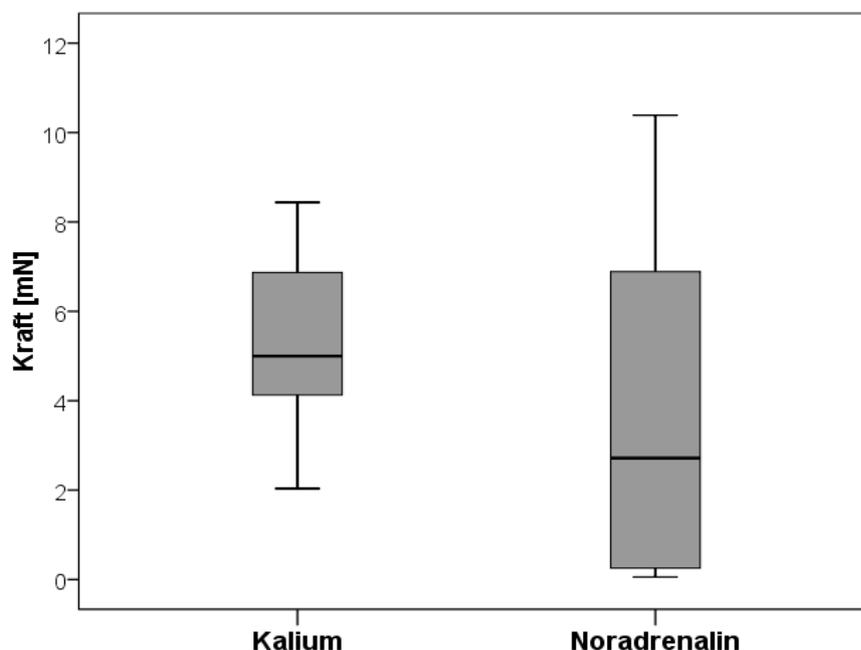


Abbildung 7 Verteilung der maximalen Kontraktionswerte nach Gabe von kaliumreicher Lösung ($n = 27$) und Noradrenalin 10^{-5} mol/l ($n=24$)

Die teilweise minimalen Ausschläge nach Noradrenalingabe waren für diese Arbeit kein Kriterium zum Verwerfen dieser Präparate. Da es sich zeigte, dass das Antwortverhalten auf Noradrenalingabe keinen zuverlässigen Prädiktor für das Antwortverhalten in weiteren Experimenten darstellte. Durch Vorlage von Prazosin, einem kompetitiven α_1 – Rezeptorantagonisten, konnte eine deutliche Inhibition der Noradrenalinantwort gemessen werden. Auf Grund nicht normalverteilter Differenzen der Wertepaare, waren die Bedingungen zur Durchführung des t-Tests jedoch nicht erfüllt.

Ø Noradrenalin [mN] ± SEM	0,99 ± 0,58
Ø Noradrenalin + Prazosin [mN] ± SEM	0,05 ± 0,02
n	5

Tabelle 2 Noradrenalininkontraktionen Vergleich der Kraftentwicklung mit und ohne Vorlage von Prazosin 10^{-6} mol/l

*Die Bedingungen zur Signifikanztestung waren nicht erfüllt

3.1.3 Depolarisation durch kaliumreiche Lösung und Wirkung des Calciumkanalantagonisten Nifedipin

Kontraktionen durch Depolarisation und nachfolgendem Calciumeinstrom in die glatten Muskelzellen wurden durch den Austausch der Standardkrebslösung durch eine modifizierte Krebslösung mit einer Kaliumkonzentration von 40mmol/l erzeugt. Wie bereits in Abbildung 7 dargestellt konnten mittels kaliumreicher Lösung Kontraktionen konstanten Ausmaßes erzeugt werden. Ebenso wie die Kontraktionen unter Noradrenalin konnte bei Verwendung einer kaliumreichen Lösung ein initial steiler Kontraktionsverlauf mit nachfolgendem Übergang in eine Sättigung beobachtet werden. Folgend kam es regelhaft zur Ausbildung eines Kontraktionsplateaus. Einige Präparate konnten jedoch das erhöhte Kraftniveau nicht stabil halten, woraufhin es zu einer langsamen Abnahme der Kontraktionskraft kam. Der Anstieg vom Beginn der Kontraktion bis zum Erreichen des maximalen Ausschlages wurde mit $0,16 \pm 0,01$ mN/s (n=27) gemessen und lag somit im Bereich der Noradrenalininkontraktionen.

Eine Inhibition der Kaliumkontraktion durch Vorlage von Nifedipin 10^{-6} mol/l konnte in signifikanter Weise gezeigt werden. Es kam sowohl zu einer deutlichen Reduktion der Maximalamplitude als auch zu einer sofortigen Rückkehr auf das Niveau des Ruhetonus. Die Ausbildung einer Plateauphase konnte nach Vorlage von Nifedipin nicht beobachtet werden. Die initiale Kontraktion trotz Nifedipingabe ist nicht als unvollständige Blockade der spannungsabhängigen Calciumkanäle zu werten. Vielmehr wird durch die Depolarisation die Freisetzung von Neurotransmittern ausgelöst und durch Freisetzung von intrazellulärem Calcium eine Kontraktion ausgelöst, die durch Blockade spannungsabhängiger

Calciumkanäle nicht inhibiert werden kann [84]. Auf Grund instabiler Plateauphasen in den Kontrollversuchen wurde trotz dieser Überlagerung von Ionenströmen die maximale Antwort als Messparameter herangezogen.

Ø Kalium [mN] ± SEM	5,14 ± 0,67
Ø Kalium + Nifedipin [mN] ± SEM	1,04 ± 0,39
p - Wert	<0,05
n	7

Tabelle 3 Kaliumkontraktion Vergleich der Kraftentwicklung mit und ohne Vorlage von Nifedipin 10^{-6} mol/l

3.1.4 Korrelationsanalyse der Amplituden nach externer Stimulation

Das variierende Antwortverhalten nach Noradrenalingabe im Vergleich zu kaliumreicher Lösung konnte bereits in Abbildung 7 dargestellt werden. Diese Beobachtung spiegelte sich auch in der Korrelation der jeweiligen Wertepaare der ermittelten Kontraktionsamplituden wieder. Hier ergab sich lediglich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,64$ ($n = 17$). Die Analyse der EFS Kontraktion bezogen auf die Noradrenalin Kontraktion ergab hingegen einen Koeffizienten von $r = 0,91$ ($n = 24$). Die jeweiligen Regressionsgeraden finden sich nachfolgend abgebildet. Die hohe Korrelation zwischen Noradrenalin – und EFS – Kontraktionen unterstreicht dabei die Abhängigkeit der EFS – Reizantwort von adrenergen Rezeptoren auf der glattmuskulären Membran. Jedoch kann bei einer nur mittleren Korrelation der Kontraktionsstärken nach Noradrenalingabe und kaliumreicher Lösung nicht von einer gleichmäßigen Verteilung der adrenergen Rezeptoren auf alle Muskelzellen ausgegangen werden.

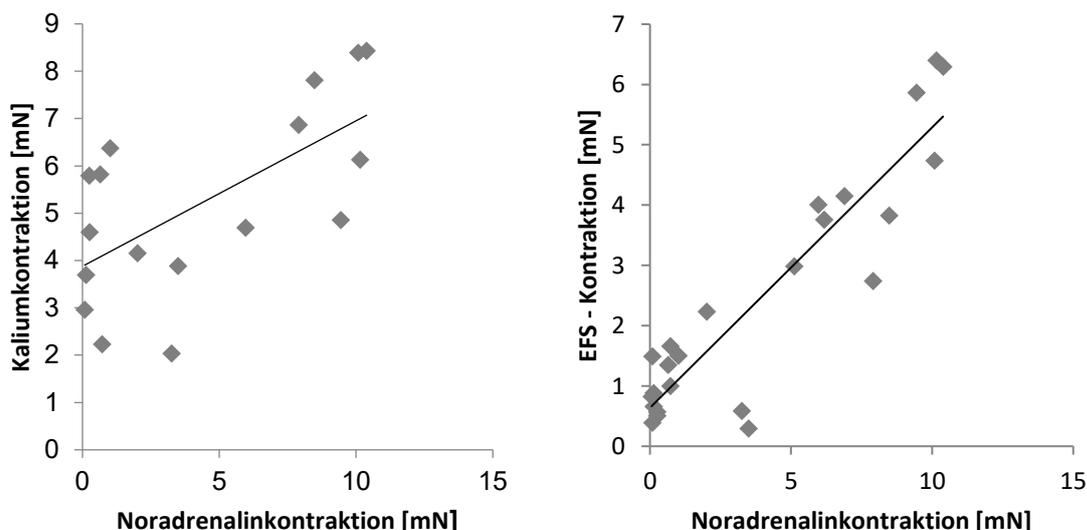


Abbildung 8 Regression zwischen externen Stimulationen Noradrenalin – und Kaliumkontraktionen (links) sowie Noradrenalin – und EFS Kontraktionen (rechts);

3.2 TEA – Schwellenkonzentration für phasische Aktivität und Einfluss von Indomethacin auf die TEA Schwelle

Phasische Aktivität zeichnete sich durch ein repetitives Auftreten spontaner Kontraktionen aus, die ausgehend von einem basalen Kraftniveau entsprangen. Ohne Auftreten einer Plateauphase kam es zur Rückbildung der Kontraktion, mit Rückkehr des Gefäßtonus auf das Basalniveau. Eine detaillierte Beschreibung dieses Phänomens findet sich unter Punkt 3.4.1, beispielhaft ist eine Aufzeichnung phasischer Aktivität nachfolgend abgebildet.

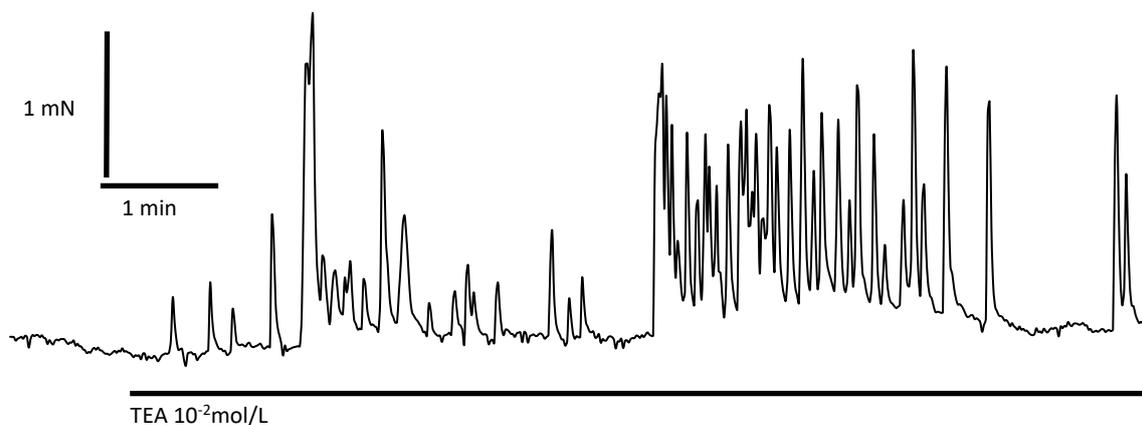


Abbildung 9 Beispiel phasischer Aktivität induziert durch Vorlage von TEA 10^{-2} mol/l Kontraktion durch Kalium 40mmol/l bei 7,98mN als Vergleichswert

Hayashida et al. [85] konnten in Untersuchungen der Aorta der Ratte spontane Oszillationen ohne vorhergehende Stimulation messen. Für die wesentlich kleineren Mesenterialarterien wurde in vorangegangenen Studien für die Initiierung der phasischen Aktivität vorrangig auf Agonisten an α_1 – Rezeptoren wie Phenylephrin oder Noradrenalin zurückgegriffen [15, 16, 68, 86]. Repetitive Kontraktionen, ausgelöst durch das Hinzufügen von TEA in eine Organbadlösung, konnten bereits in der Arterie des Rattenschwanzes [87], der Basilararterie des Hasen [88] sowie der posterioren Cerebralarterie der Ratte [89] beobachtet werden.

Für die Untersuchung der TEA Schwelle zur Induktion phasischer Aktivität und dessen Indomethacinabhängigkeit wurden fünf Präparate untersucht. Bei vier Präparaten erfolgte eine vergleichende Untersuchung mit und ohne Vorlage von Indomethacin. Ein Präparat durchlief nur die Titrationsreihe ohne Indomethacin und wurde daher ausschließlich für die Bestimmung der TEA Schwelle herangezogen. Erste vereinzelt auftretende Kontraktionen

konnten in indomethacinfreien Durchgängen bereits bei TEA Konzentrationen von $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$ ($n = 1$) und 10^{-3} mol/l ($n = 1$) beobachtet werden. Unter Indomethacin zeigten sich erste Reaktionen bei einer TEA - Konzentration von $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ ($n = 2$) sowie ein sofortiges etablieren der phasischen Aktivität ($n = 2$). Dementsprechend konnte jedoch für TEA - Konzentrationsbereiche kleiner $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ keine etablierte Aktivität gemessen werden. Das Auftreten etablierter Aktivität beschränkte sich in beiden Experimenten auf die zwei Konzentrationsstufen von $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ und 10^{-2} mol/l , mit einer ausgeglichenen Verteilung unabhängig von der Reihenfolge der Experimente. Die Häufigkeitsverteilung ist unter Abbildung 10 dargestellt. In der Frage nach der Indomethacinabhängigkeit der TEA Schwelle zeigt die ermittelte Häufigkeitsverteilung ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen den beiden Versuchssarmen auf. Auf Grund dessen wurde an dieser Stelle auf eine Signifikanzanalyse verzichtet. Eine Beeinflussung der TEA Schwelle durch Indomethacin oder durch die in ihrer Synthese gehemmten Prostaglandine, speziell Prostaglandin I_2 , konnte nicht gezeigt werden. Weiterhin zeigte sich keine Veränderung in der Kontraktionskinetik, weder in der Kontraktions- noch in der Relaxationsphase, nach Vorlage von Indomethacin.

In Bezug auf die TEA Schwellenkonzentration ohne Indomethacineinfluss gingen alle Präparate bei einer Konzentration von $\geq 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ in etablierte phasische Aktivität über. Es wurde daher für weitere Experimente die TEA Konzentration zur Initiierung phasischer Aktivität auf 10^{-2} mol/l festgesetzt.

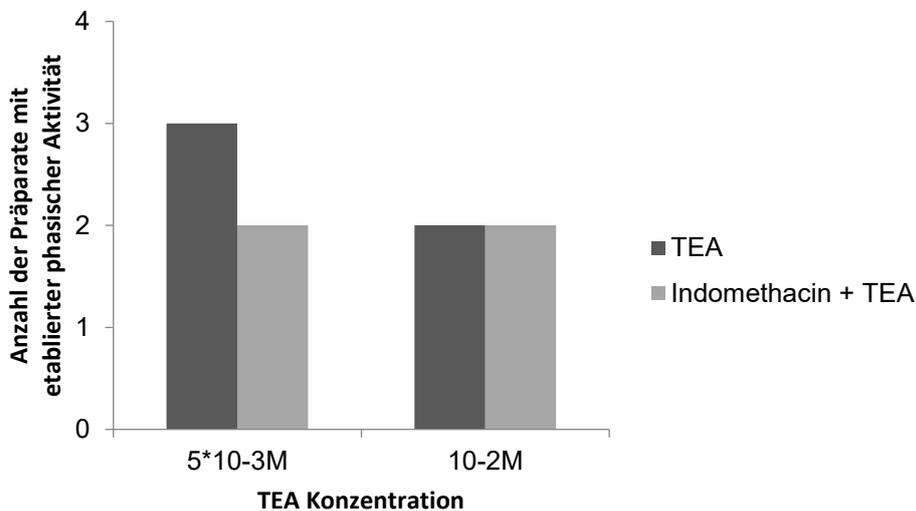


Abbildung 10 Häufigkeitsverteilung des erstmaligen Auftretens etablierter phasischer Aktivität nach schrittweiser Erhöhung der TEA Konzentration mit und ohne Vorlage von Indomethacin 10^{-6} mol/l

3.3 Pharmakologische Beeinflussung phasischer Aktivität

Die in den Vorexperimenten gezeigten inhibitorischen Effekte auf die Funktionsweise von spannungsabhängigen Calcium (Ca_v) – und Natriumkanäle (Na_v), sowie der α_1 – Rezeptoren sollten ebenfalls hinsichtlich ihrer Wirkung auf die phasische Aktivität überprüft werden.

Die Bedingung für die pharmakologische Beeinflussung war das Vorhandensein etablierter Aktivität. Im Falle der phasischen Kontraktionen wurde eine Mindestdauer von fünf Minuten etablierter phasischer Aktivität vor Zugabe der Pharmaka festgelegt. Weiterhin erfolgte, zur Darstellung größtmöglicher Unterschiede, die Gabe der Pharmaka inmitten eines Kontraktionsclusters. Die Reaktionen der tonischen Aktivität wurden, in einer kleinen Versuchsreihe, ebenfalls hinsichtlich ihrer Reaktionen untersucht. Die Zugabe der Pharmaka erfolgte nach etablieren einer stabilen Plateauphase. Auf Grund der Versuchsanzahl wird sich bei den letzten Experimenten auf eine Beschreibung der Beobachtungen beschränkt.

3.3.1 Wirkung des Calciumkanalantagonisten Nifedipin auf phasische Kontraktionen

Die Verwendung von Nifedipin diente der Blockade spannungsabhängiger Calciumkanäle im Bereich des glatten Muskels und der Varikosität. Die stark verminderte Reaktion der Präparate auf Depolarisationen konnte unter Verwendung von Nifedipin in vorherigen Experimenten gezeigt werden. Das Hinzufügen von Nifedipin zu etablierter phasischer Aktivität führte umgehend zu einer deutlichen Reduktion der Aktivität.

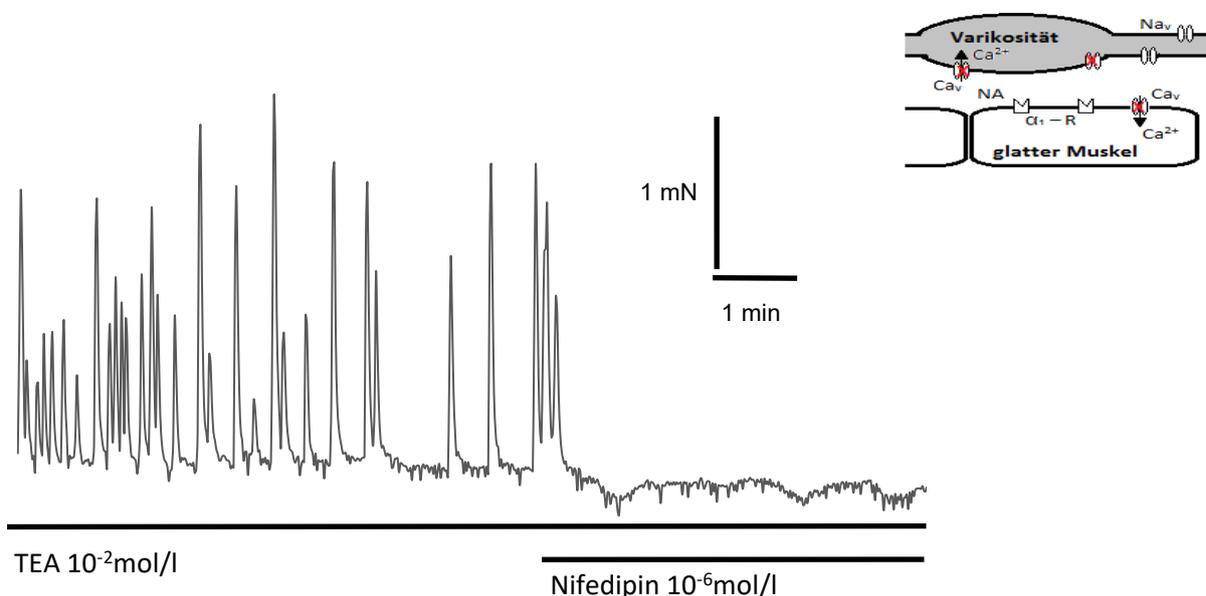


Abbildung 11 Reaktion der glatten Muskulatur der Mesenterialarterie auf die Gabe von Nifedipin

Das Durchbrechen einzelner Kontraktionen konnte nach Nifedipingabe nur noch vereinzelt registriert werden. Zusätzlich kam es zu einer Reduktion des leicht gesteigerten Grundtonus.

Die Vergleiche des durchschnittlichen Kraftniveaus und der registrierten Kontraktionen fünf Minuten vor und nach Zugabe von Nifedipin ergaben jeweils signifikante Unterschiede. Eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 5. Die hier beobachtete phasische Aktivität wies somit eine klare Abhängigkeit von nifedipinsensiblen Ca_v – Kanälen und daher von extrazellulärem Calcium auf.

3.3.2 Wirkung des Na_v – Kanal Blockers TTX auf phasische Kontraktionen

Die inhibitorische Wirkung von TTX auf spannungsabhängige Natriumkanäle ist eine etablierte Methode zur Unterdrückung der nervalen Antwort. Auch in dieser Arbeit konnte die inhibitorische Wirkung von TTX durch signifikante Reduktion der EFS – Antwort gezeigt werden.

Nach Zugabe von TTX 10^{-7} mol/l zu etablierter phasischer Aktivität kam es, wie unter Nifedipin, unverzüglich zu einem Sistieren der repetitiven Kontraktionen und zusätzlich zu einer Reduktion des gesteigerten Grundtonus. Beispielhaft findet sich nachfolgend die Reaktion abgebildet.

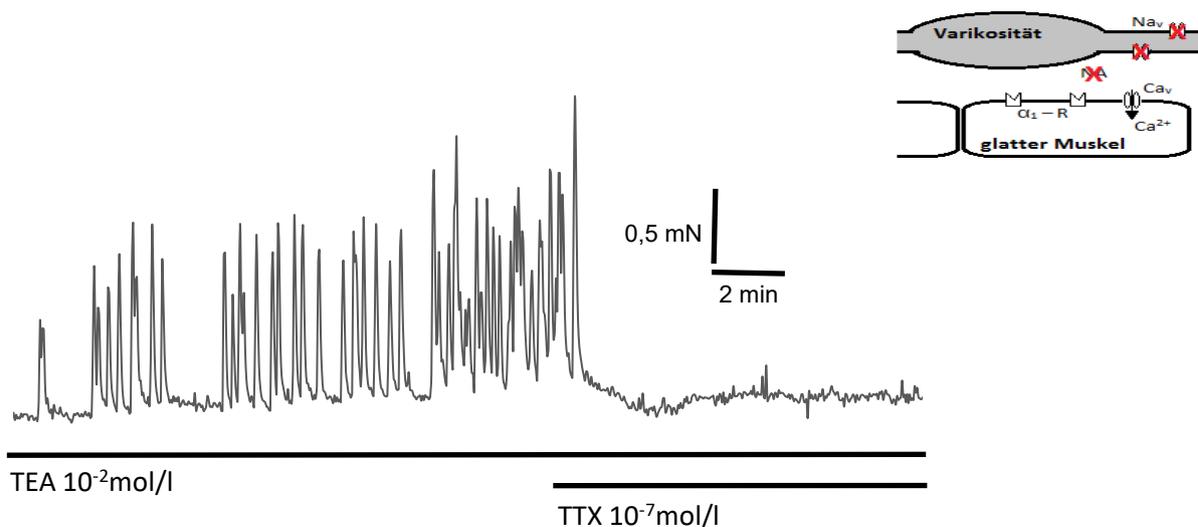


Abbildung 12 Reaktion der glatten Muskulatur der Mesenterialarterie auf die Gabe von Tetrodotoxin

Die daraus resultierende Reduktion der durchschnittlichen Kraft über dem Ruhetonus fünf Minuten nach TTX Gabe war bezogen auf den Vergleichszeitraum fünf Minuten vor Gabe signifikant. Die Wirkung von TTX drückte sich ebenfalls in einer fast vollständigen Reduktion der registrierten Kontraktionen aus. Mit einer Reduktion um mehr als 80% war auch dieser Unterschied signifikant. Der hier gesehene Zusammenhang von Na_v – Kanal – Funktion und phasischer Aktivität hat in den bisher gängigen Betrachtungen zur Vasomotion in

Mesenterialarterien noch keine Beachtung gefunden und stellt somit die Beteiligung perivaskulärer Nervenfasern, als hauptsächlichen Ort der Na_v – Kanal – Expremierung, an der Entstehung phasischer Aktivität zur Debatte.

TEA		TEA + Prazosin			
\varnothing	Kraft [mN]	Anzahl Kontraktionen	\varnothing	Kraft [mN]	Anzahl Kontraktionen
0,29		19	0,11		2
0,58		16	0,26		3
0,34		11	0,22		5
0,87		46	0,3		39
0,41		18	0,45		24
0,59		38	0,76		45

Tabelle 4 Darstellung der Reaktionen der sechs untersuchten Präparate auf Prazosin
Abgebildet sind die durchschnittliche Kraft über dem Ruhetonus sowie die gemessene Anzahl der Kontraktionen fünf Minuten vor und nach Prazosin.

3.3.3 Wirkung des α_1 - Rezeptorantagonisten Prazosin auf phasische Kontraktionen

Nachdem die inhibitorische Wirkung von Prazosin auf Noradrenalin Kontraktionen überprüft wurde, erfolgte, mit dem Hintergrund der TTX Sensitivität phasischer Aktivität, die Zugabe von Prazosin zur Testung einer Abhängigkeit der phasischen Kontraktionen von adrenerger Signalübertragung.

Hier zeigte sich im Vergleich zu den vorherigen Experimenten ein differenzierteres Reaktionsverhalten. Bei einem Teil der Präparate konnte sowohl eine deutliche Reduktion des durchschnittlichen Kraftniveaus als auch der Kontraktionsanzahl nach Prazosin festgestellt werden. Die andere Hälfte der Präparate reagierte hingegen mit einer gleichbleibenden oder auch gesteigerten Aktivität. Beispielhaft finden sich die Reaktionen in Abbildung 13 dargestellt. Eine quantifizierte Darstellung der Reaktionen auf Prazosin ist in Tabelle 4 wiedergegeben.

Insgesamt ergab sich somit, wie in Tabelle 5 dargestellt, kein signifikanter Unterschied im Reaktionsverhalten nach Prazosin. Die Tatsache, dass in den durchgeführten Experimenten die Hälfte der Präparate auf die Gabe von Prazosin mit einer Reduktion der Kontraktionsaktivität reagierte, ist jedoch ein Hinweis auf eine mögliche Abhängigkeit phasischer Aktivität von α_1 – Rezeptor vermittelter Signalübertragung. Eine mögliche Erklärung für die Resistenz einiger Präparate auf die Prazosin wäre die primäre Bindung von Prazosin an α_2 – Rezeptoren der Präsynapse [77]. Eine Blockade dieser Rezeptoren, die unter physiologischen Bedingungen die Freisetzung von Transmittern

inhibieren [90], würde zu einer paradoxen Verstärkung der Transmitterfreisetzung aus den Varikositäten führen. Weiterhin ist eine Verdrängung Prazosins von der Bindung zu den postsynaptischen α_1 – Rezeptoren durch einen starken Konzentrationsanstieg von Noradrenalin im synaptischen Spalt eine weitere zu diskutierende Möglichkeit. So wäre weiterhin über einzelne Varikositäten die Aktivierung des glattmuskulären Netzwerkes möglich.

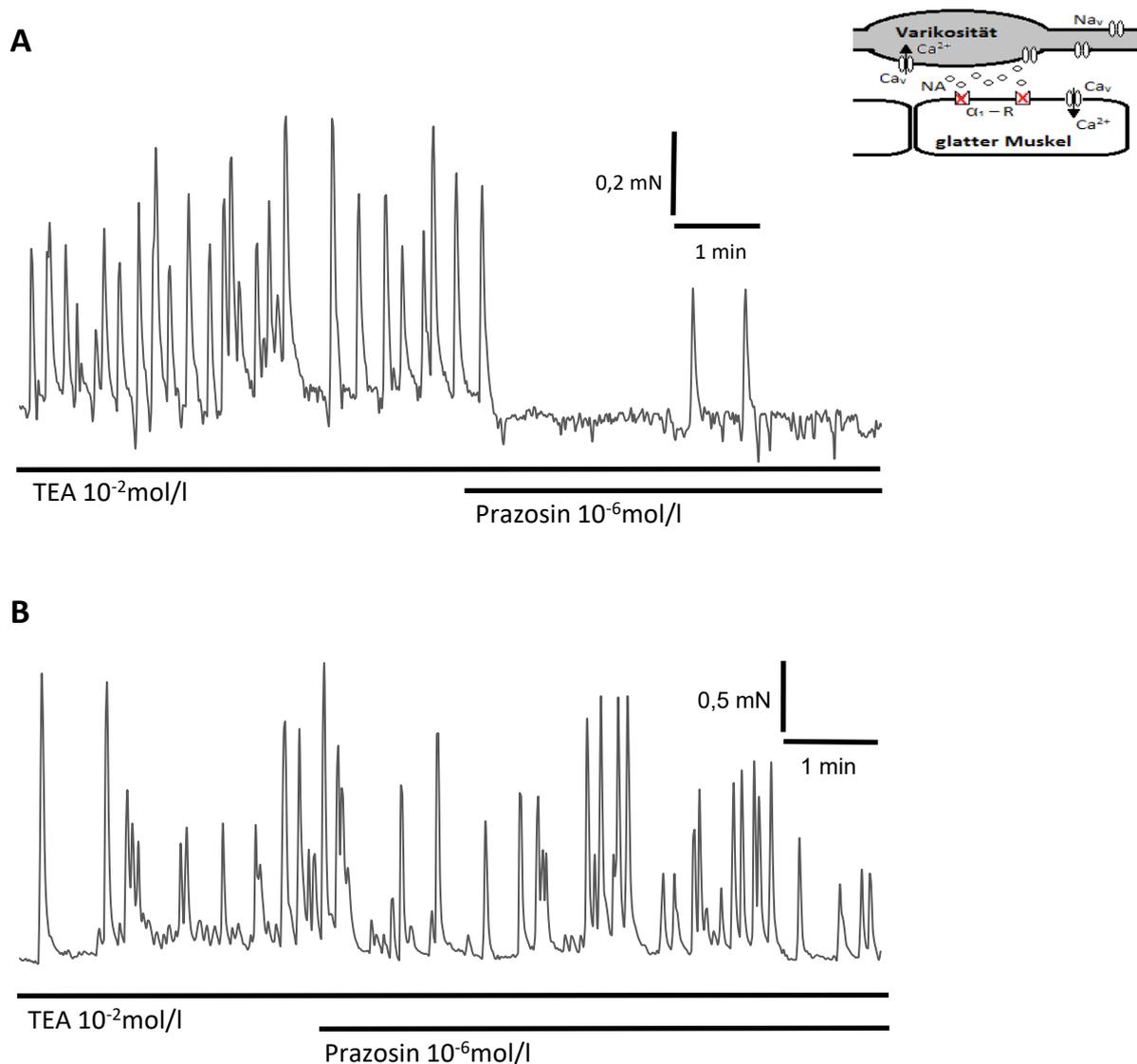


Abbildung 13 Reaktion der glatten Muskulatur der Mesenterialarterie auf die Gabe von Prazosin
A: Beispiel einer Reduktion des Kraftniveaus und der Kontraktionsanzahl nach Prazosingabe
B: Beispiel einer gesteigerten Kontraktionsaktivität nach Prazosingabe

TEA			+ Testsubstanz		Signifikanz		
\bar{x} Kraft [mN] ± SEM	Anzahl Kontraktionen ± SEM	Test- substanz	\bar{x} Kraft [mN] ± SEM	Anzahl Kontraktionen ± SEM	p Wert \bar{x} Kraft	p - Wert Anzahl Kontraktionen	n
0,73 ± 0,17	15,75 ± 2,70	Nifedipin	0,32 ± 0,08	4,25 ± 2,19	<0,05	<0,05	4
0,77 ± 0,13	27,83 ± 3,01	TTX	0,36 ± 0,16	4,50 ± 2,04	<0,05	<0,05	6
0,51 ± 0,08	24,67 ± 5,19	Prazosin	0,35 ± 0,09	19,67 ± 7,15	>0,05	>0,05	6

Tabelle 5 Quantifizierte Darstellung der Reaktionen phasischer Aktivität auf pharmakologische Beeinflussung

Dargestellt sind die Mittelwerte der durchschnittlichen Kraft und Anzahl der gemessenen Kontraktionen im Zeitraum 5 min vor und nach Zugabe der Testsubstanzen. Ein signifikanter Unterschied der Messwerte vor und nach Zugabe der jeweiligen Testsubstanz ist durch einen p – Wert <0,05 definiert.

3.3.4 Wirkung des Calciumkanalantagonisten Nifedipin auf tonische Kontraktionen

Die tonische Aktivität zeigte, unter Berücksichtigung der Versuchsanzahl, eine ausgeprägte Reaktion nach Nifedipin. An den beiden Präparaten erfolgte ein Rückgang der Kraft um 89,6% bzw. 78,6%. Es stellte sich ein neues stabiles Kraftniveau ein. Zum Auftreten spontaner Kontraktionen kam es nicht mehr. Beide Präparate entwickelten die tonische Aktivität aus zuvor etablierter phasischer Aktivität.

3.3.5 Wirkung des Na_v – Kanal Blockers TTX auf tonische Kontraktionen

Nach Zugabe von TTX zu tonischer Aktivität kam es ebenfalls zu einer Reduktion des Kraftniveaus. Alle hier untersuchten Präparate entwickelten die tonische Aktivität direkt als Folge der TEA – Gabe, ohne die Vorstufe der phasischen Kontraktionen zu durchlaufen. Die Gabe von Nifedipin schien tendenziell eine stärkere Reduktion zu bewirken. Unter TTX kam es lediglich zu einer Reduktion des Kraftniveaus um 63 ± 12,9% (n= 4). Ein Wiederauftreten phasischer Kontraktionen nach Reduktion des gesteigerten Kraftniveaus konnte auch hier nicht beobachtet werden.

3.3.6 Wirkung des α_1 - Rezeptorantagonisten Prazosin auf tonische Kontraktionen

Anders als bei phasischen Kontraktionen war nach Zugabe von Prazosin zu tonischer Aktivität eine deutlichere Reaktion zu erkennen.

Eins der Präparate entwickelte die tonische Kontraktion dabei in Folge anhaltender phasischer Kontraktionen. Hier erfolgte die Reduktion des Kraftniveaus nach Prazosingabe um 30,7%. Das zweite Präparat, welches nach TEA – Gabe sofort tonische Aktivität ausbildete, zeigte eine Reduktion von 94,2%, hier kam es bei Rückkehr des Kraftniveaus in den Bereich des vorherigen Ruhetonus zum Einsetzen phasischer Kontraktionen. An dieser Stelle ist auffallend, dass der Resttonus nach Prazosingabe bei dem Präparat stärker

ausgeprägt ist, welches den Tonus langsam entwickelte. Die Änderungen des zellulären Milieus schienen im Vergleich dieser zwei Präparate bei sofortiger Tonusentwicklung noch eine größere Reversibilität aufzuweisen.

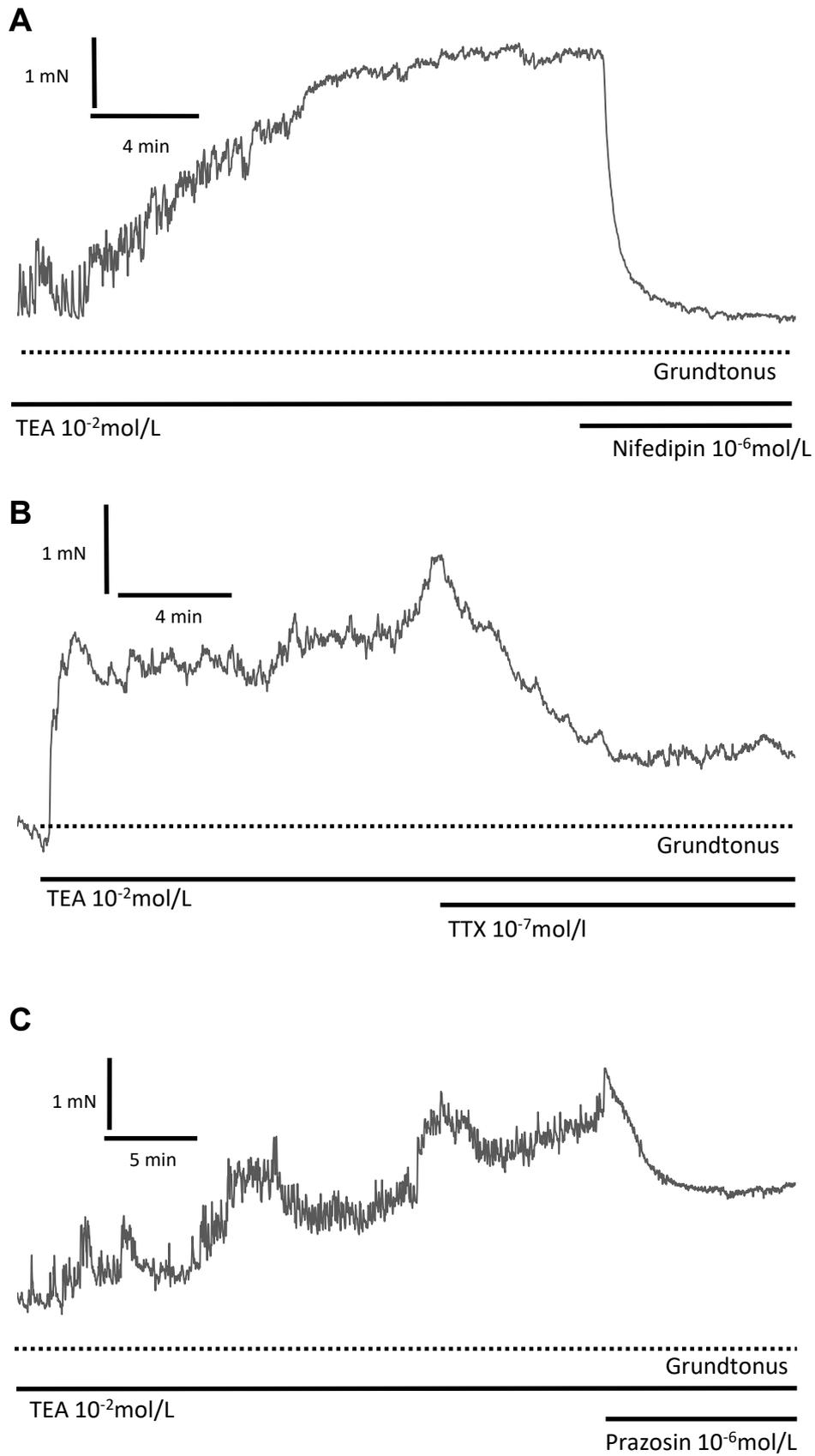


Abbildung 14 Reaktionen tonischer Aktivität auf die Gabe von Nifedipin (A), TTX (B) und Prazosin (C)

3.4 Charakterisierung phasischer Aktivität

3.4.1 Formen phasischer Aktivität

Bei dem, im gesamten Verlauf der Arbeit, als phasische Aktivität beschriebenen Zustand handelt es sich um repetitive Kontraktionen der Mesenterialarterien, die auftraten ohne dass jeder einzelnen Kontraktion ein externer Stimulus vorausging.

Phasische Aktivität wurde in dieser Arbeit durch die Verwendung von TEA in einer Konzentration von 10^{-2} mol/l initiiert. Ein Auftreten phasischer Kontraktionen spontan oder in Folge von stimulierten Kontraktionen durch EFS- Reizung, Noradrenalin oder Kaliumsubstitution, konnte in keinem der Experimente ohne die Zugabe von TEA beobachtet werden. Phasische Aktivität der Mesenterialarterien ist dabei nicht als fixierter Zustand anzusehen, sondern ist ein fortschreitender Prozess, der im Verlauf verschiedene Formen annehmen kann, die im Folgenden beschrieben werden.

Nachdem dem Organbad TEA zugesetzt wurde, konnten nach variierender Latenzzeit erste Kontraktionen spontan oder nach Stimulation durch Standard EFS beobachtet werden. Die einfachste Form phasischer Aktivität zeigte sich nach elektrischer Stimulation. Diese als Nachreaktionen bezeichneten Kontraktionen traten auf, nachdem eine durch Standard EFS ausgelöste Kontraktion ihren Maximalwert erreicht hatte. Anstatt einen rapiden Abfall zurück auf das Niveau des Grundtonus zu beobachten, traten hier während der Relaxationsphase erneute Kontraktionen auf, siehe Abbildung 15 Abschnitt A.

Als weiteren Zustand konnte nicht – etablierte phasische Aktivität beobachtet werden. Diese trat entweder im Anschluss an Nachreaktionen oder spontan nach TEA Gabe auf. Sie zeichnete sich durch das vereinzelte Auftreten von Kontraktionen aus, die in keinem direkten Zusammenhang zu einer externen Stimulation standen. Ebenso wie während etablierter phasischer Aktivität, auf die im Folgenden eingegangen wird, folgte der Ablauf einer einzelnen Kontraktion einem wiederkehrenden Muster. Aus dem Niveau des Grundtonus heraus kam es zu einem schnellen Kraftanstieg bis zum Erreichen des Maximalwertes. Sobald dieser erreicht wurde kam es ohne Ausbildung einer Plateauphase wieder direkt zu einem schnellen Abfall des Kraftniveaus bis zurück auf den Bereich des Grundtonus. Der Verlauf dieser Kontraktionen wies eine große Ähnlichkeit zu den durch EFS ausgelösten Reaktionen auf. Im Falle der Überlagerung von zwei Kontraktionen änderte sich die Kontraktionsform entsprechend des Zeitpunktes des Eintreffens der zweiten Kontraktion.

Die nächste Stufe wurde als etablierte phasische Aktivität bezeichnet. Sie konnte sich sowohl aus nicht – etablierter Aktivität entwickeln als auch direkt nach TEA Zugabe entstehen. Als charakteristisches Merkmal zeigte sich hier ein gehäuftes Auftreten von Kontraktionen. Diese Kontraktionen gruppieren sich zu Clustern erhöhter Aktivität, die von

Phasen ohne oder nur mit vereinzelt auftretenden Kontraktionen unterbrochen wurden. Der Verlauf einer phasischen Kontraktion ist bereits oben dargelegt, es kam jedoch überwiegend im Bereich der Cluster zu einem Anstieg des allgemeinen Grundtonus. Weiterhin konnte es innerhalb der Cluster gehäuft zu Überlagerungen einzelner Kontraktionen kommen.

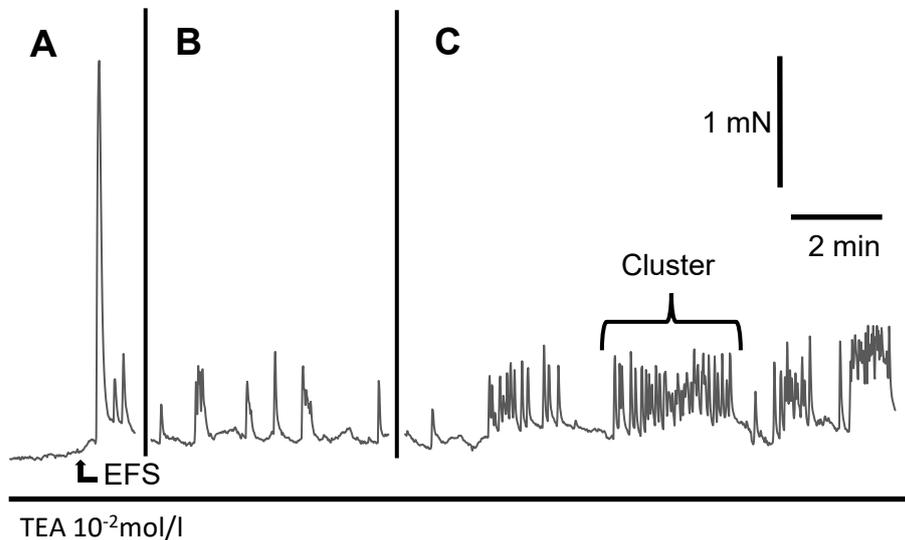


Abbildung 15 Entwicklungsstufen phasischer Aktivität am Beispiel einer kontinuierlichen Aufzeichnung eines Präparates – thematisch Unterteilt
 Die alleinige Vorlage von TEA $10^{-2}M$ führte zunächst zu keiner Reaktion. Nach Stimulation mittels Standard EFS erschienen während der Relaxation zwei Nachreaktionen (Abschnitt A). Die folgenden, vereinzelt auftretenden Kontraktionen waren charakteristisch für nicht-etablierte phasische Aktivität (Abschnitt B). Der Übergang zu etablierter phasischer Aktivität wurde durch das Auftreten von Kontraktionsclustern mit dazwischenliegenden Kontraktionspausen markiert (Abschnitt C).

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Formen konnte man bei etablierter phasischer Aktivität kein spontanes Sistieren beobachten. Sollte diese Aktivität nicht durch Pharmaka oder Spülung des Organbades unterbrochen werden, so entwickelte sich aus den geordneten Einzelkontraktionen mit weitestgehender Rückkehr zum Grundtonus ein zunehmend unkoordiniertes Kontraktionsmuster. Es kam vermehrt zu Überlagerungen und die Einzelkontraktionen nahmen in ihrer Amplitudengröße ab. Dafür kam es zu einem stetigen Anstieg des Grundtonus mit im Verlauf nicht mehr zu differenzierenden Einzelkontraktionen. Dieser Tonus schritt bis zur Entwicklung eines Plateaus fort, welches in längeren Zyklen um ein erhöhtes Kraftniveau Schwankungen unterliegen konnte. Eine spontane Rückkehr zum Grundtonus oder ein Wiederauftreten geordneter phasischer Kontraktionen konnte in diesem Zustand nicht beobachtet werden.

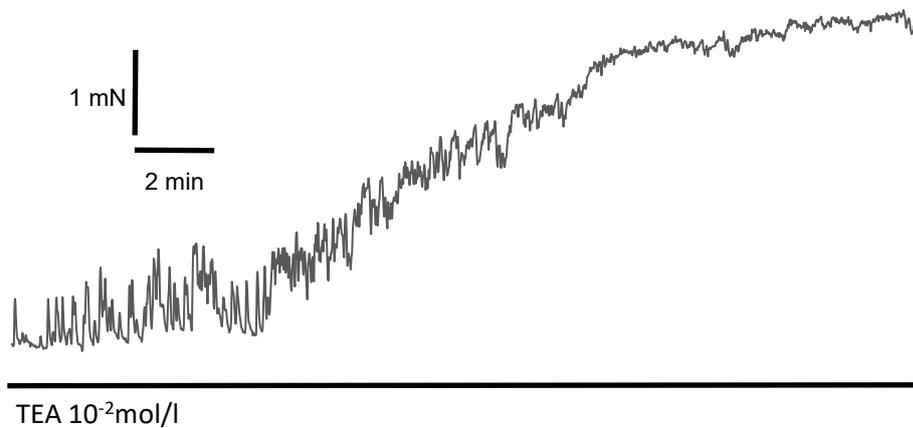


Abbildung 16 Entwicklung der tonischen Aktivität aus dem Zustand etablierter phasischer Aktivität
Sichtbar zunehmende Überlagerung der Einzelkontraktionen und sukzessiver Anstieg des Grundtonus
bis zum Verschwinden sichtbarer Einzelkontraktionen beim Übergang in eine Plateauphase.

Wie auch in den zuvor beschriebenen Zuständen war ein direkter Übergang in eine tonische Kontraktionsform nach TEA – Gabe, ohne Durchlaufen der oben beschriebenen Vorstufen, möglich. Insbesondere wurde dies beobachtet, wenn Präparate im Rahmen eines Vorversuches anhaltend sub- / maximal kontrahiert wurden.

3.4.2 Häufigkeitsverteilung des Antwortverhaltens nach TEA – Stimulation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 74 Präparate einer TEA – Konzentration von 10^{-2} mol/l ausgesetzt und das höchste Niveau des oben beschriebenen Antwortverhaltens dokumentiert. Als höchstes Niveau wurde hier das Erreichen etablierter phasischer Aktivität gewertet und die Entwicklung eines Kontraktionstonus nur dokumentiert, wenn sich dieser direkt nach TEA Zugabe entwickelte.

Die genaue Häufigkeitsverteilung findet sich in Abbildung 17 dargestellt.

In aufsteigender Häufigkeit zeigten sich ausschließlich Kontraktionen in Folge einer elektrischen Stimulation ohne spontane Fortsetzung ($n= 2$; $\triangleq 2,7\%$). Eine weitere Gruppe konnte nicht – etablierte phasische Aktivität ausbilden, ohne Tendenz zur Verstärkung der Aktivität ($n=11$; $\triangleq 14,9\%$).

Einige Präparate entwickelten sofort eine tonisch imponierende Reaktion ohne vorhergehende phasische Komponente ($n= 12$; $\triangleq 16,2\%$). Eine solche Reaktion konnte im Allgemeinen beobachtet werden, in Fällen bei denen sich das Präparat zuvor über lange Zeit einer hohen Aktivierung ausgesetzt sah, beispielsweise durch lange Phasen phasischer Kontraktionen im Verlauf vorhergehender Experimente. Ebenfalls konnten vorhergehende

sub-/maximale Kontraktionen, ausgelöst durch NA oder kaliumreiche Lösungen, zu einem entsprechendem Antwortverhalten führen.

Die größte Gruppe stellten die Präparate, die nach Zugabe von TEA die oben beschriebene etablierte phasische Aktivität ausbildeten (n=41; \pm 55,4%). Es verblieben 8 Präparate (\pm 10,8%), die weder auf TEA noch nach zusätzlicher elektrischer Reizung Kontraktionen ausbildeten. Die EFS – Stimulation von Präparaten, die spontan keine Reaktion auf die TEA – Zugabe entwickelten, hat sich insgesamt jedoch als effektive Methode erwiesen. Bei 19 von 27 Präparaten (\pm 70,4%) konnte mittels EFS – Stimulation unter TEA 10^{-2} mol/l noch messbare phasische Aktivität erzeugt werden.

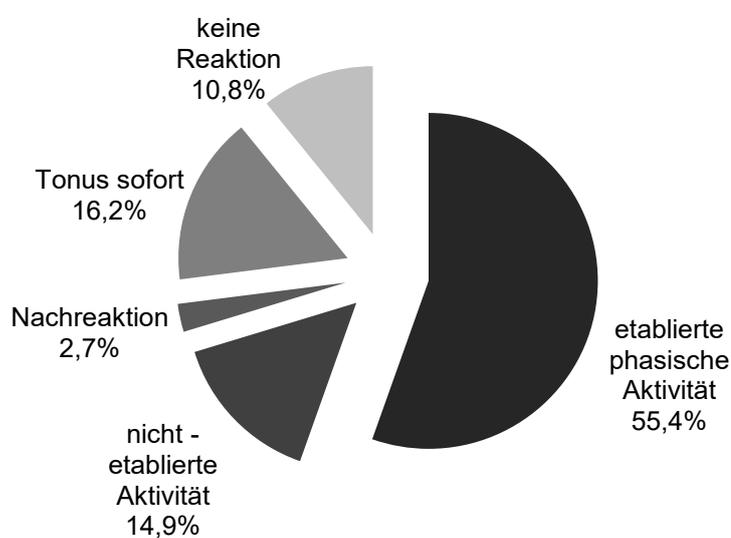


Abbildung 17 Häufigkeitsverteilung der Entwicklungsstufen phasischer Aktivität

3.4.3 Quantifizierung phasischer Kontraktionen

Insgesamt wurden für diese Analyse 627 Einzelkontraktionen, unter Zuhilfenahme des eigens programmierten Analyseprogrammes, ausgewertet. Mit Ausnahme des Zeitpunktes bis zum spontanen Auftreten einer ersten phasischen Kontraktion wurde für alle weiteren Analysen ein Bereich geclusteter phasischer Aktivität je Präparat ausgewählt. Die Kriterien für die Auswahl des Clusters wurden bereits im Methodenteil dargelegt. Die zusammenfassende Darstellung dieser Auswertung findet sich nachfolgend in Tabelle 6 abgebildet.

n = 36	t bis erste Kontraktion [min] *	Clusterdauer [min]	Kontraktionszahl	Abstand Einzelkontraktionen [s]
min	00:06,1	00:57	4,00	3,64
max	09:47,9	09:14	37,00	29,36
Ø ± SEM	01:01,3 ± 00:21,6	02:54 ± 00:19	17,42 ± 1,24	10,06 ± 0,97

n = 36	Anstieg [mN/s]	Amplituden-höhe [mN]	Kraftzuwachs [mN]
min	0,13	0,09	0,22
max	1,68	4,95	2,04
Ø ± SEM	0,50 ± 0,05	0,92 ± 0,13	0,66 ± 0,07

Tabelle 6 Kennzahlen phasischer Aktivität

* Bestimmung der Dauer von TEA – Gabe bis zur ersten phasischen Kontraktion nur bei Präparaten, die keine Stimulation durch EFS unter TEA erhalten haben, daher abweichend n=28.

Anders als bei prokontraktiven Pharmaka, wie Noradrenalin oder Kalium, zeigte sich die Reaktion auf TEA – Zugabe mit zum Teil erheblicher Latenz und hoher Variabilität. Für acht Präparate, die im Verlauf etablierte phasische Aktivität ausbilden konnten, war eine Stimulation mittels Standard EFS nötig, um Reaktionen zu erzeugen. Für die Messung der Latenzzeit fanden sie daher keine Beachtung.

Ebenso variabel zeigte sich das Auftreten von Einzelkontraktionen im Verlauf phasischer Aktivität. Im Bereich nicht – etablierter und außerhalb geclusteter Aktivität imponierte das Auftreten von Kontraktionen im weitesten Sinne zufällig. Der Übergang von nicht – etablierter zu etablierter phasischer Aktivität wurde zwar in den meisten Fällen durch das oben beschriebene clusterhafte Auftreten von Einzelkontraktionen markiert, in Einzelfällen konnte diese klare Grenze jedoch nicht gezogen werden. Hier konnte sich die Phase erhöhter Aktivität auf, im Minimalfall, vier Kontraktionen beschränken, umgeben von weit auseinanderliegenden Einzelkontraktionen. Genauso konnte sich ein Cluster phasischer Aktivität durch ein regelmäßigeres Auftreten von Einzelkontraktionen umgeben von unregelmäßiger Aktivität definieren.

Die Abstände zwischen den Einzelkontraktionen innerhalb eines Clusters konnten daher bis auf 29,36s vergrößert sein. In der weit überwiegenden Zahl zeichneten sich die Kontraktionscluster jedoch durch eine kürzere Kontraktionsfolge aus, was zu einem durchschnittlichen Kontraktionsabstand von $10,06 \pm 0,97$ s führte. Phasische Aktivität war damit durch eine Minutenrhythmik von 2/min bis 16/min, im Durchschnitt jedoch im Bereich von 6/min bestimmt. Dies entsprach einer Frequenz von 0,1Hz.

Die phasischen Kontraktionen zeichneten sich durch eine schnelle Kraftentwicklung und schnelles Erreichen des Kontraktionsmaximums ohne vorheriges Ausbilden eines Sättigungsverlaufes aus. Diese Beobachtung führte bereits im Rahmen der qualitativen

Betrachtung zum Vergleich mit EFS Kontraktionen, die sich ebenfalls durch ein solches Kontraktionsmuster auszeichneten.

Die qualitative Beobachtung der Ähnlichkeit von phasischen und EFS Kontraktionen konnte durch Messung der Kontraktionskinetik bestätigt werden. Im Mittel wurde für die phasischen Kontraktionen ein Kraftanstieg von $0,50 \pm 0,05$ mN/s ($n= 627$) ermittelt. Dieser errechnete sich wie schon in den vorherigen Experimenten aus der erreichten Amplitudenhöhe und dem Zeitintervall zwischen Beginn der Kontraktion und Erreichen des Maximums. Die in gleicher Weise vermessenen EFS Kontraktionen zeigten Kontraktionsanstiege von durchschnittlich $0,52 \pm 0,02$ mN/s ($n=193$). Eine Signifikanzanalyse durch den t – Test konnte auf Grund nicht normalverteilter Werte der jeweiligen Grundgesamtheit nicht durchgeführt werden.

Wie auch die vorherigen Parameter unterlag die Höhe der Amplitude einer hohen interindividuellen Schwankung. Dies geht auch aus den hier dargestellten Minimal- und Maximalmesswerten hervor. Diese Werte sind in diesem Fall nicht das Ergebnis einer Mittelung der Kontraktionen eines Präparates, sondern stellen von den 627 untersuchten Kontraktionen den größten und kleinsten gemessenen Ausschlag dar. Für Vergleichsmessungen mit Referenzkontraktionen auf die im nächsten Punkt näher eingegangen wird, wurden aber wieder die gemittelten Werte pro Cluster herangezogen. Während es im Bereich der nicht – etablierten phasischen Aktivität noch zu stärkeren Schwankungen in der Amplitudenhöhe kommen konnte, fiel die Streuung der Amplitudenhöhe im Bereich der Kontraktionscluster weitaus geringer aus und daher ließen sich diese zu Vergleichsmessungen heranziehen.

Mit dem Kraftzuwachs, der sich über eine durchschnittliche Kraft von $0,66 \pm 0,07$ mN während der Cluster darstellte und somit bei mehr als zwei Dritteln der durchschnittlich erreichten Amplitudenhöhe lag, wurde sowohl der Anstieg des allgemeinen Grundtonus mit beachtet sowie die Stärke der phasischen Aktivität einbezogen. In der Stärke der phasischen Aktivität bildet sich sowohl die Amplitudenhöhe als auch die Dichte der Einzelamplituden ab und daher wurde der Kraftzuwachs oder auch die durchschnittliche Kraft im gemessenen Zeitintervall als Messparameter zur Wirksamkeit der pharmakologischen Inhibition phasischer Aktivität verwendet.

3.4.4 Korrelation phasischer Kontraktionen zu Referenzkontraktionen

Die vergleichende Analyse zwischen durchschnittlicher Amplitudenhöhe phasischer Kontraktionen und den zusätzlich durchgeführten Referenzkontraktionen konnte starke Unterschiede zwischen den verwendeten Stimulationsformen darstellen. Die zugrundeliegenden Messwerte sind in Tabelle 7 wiedergegeben.

Referenz- kontraktion	Ø Amplitudenhöhe phasischer Aktivität [mN] ± SEM	Ø Amplitudenhöhe Referenzkontraktion [mN] ± SEM
EFS	0,92 ± 0,13	2,18 ± 0,27
Kalium	0,75 ± 0,11	5,23 ± 0,53
Noradrenalin	0,65 ± 0,10	2,90 ± 0,98

Referenz- kontraktion	phasische Aktivität / Referenzkontraktion ± SEM	Korrelation r	Anzahl n
EFS	0,99 ± 0,20	0,34	35
Kalium	0,14 ± 0,01	0,81	14
Noradrenalin	1,82 ± 0,66	0,66	13

Tabelle 7 Korrelation der Amplitudenhöhe phasischer Aktivität mit Referenzkontraktionen

Die Berechnung des Quotienten aus Amplitudenhöhe phasischer Aktivität und Referenzkontraktion erfolgte für das jeweilige Wertepaar eines Präparates. Der in Tabelle 7 dargestellte Mittelwert ist das Resultat dieser Einzelberechnungen. In der Diskrepanz zwischen dem, ausgehend von den gemittelten Kontraktionswerten, erwarteten Quotienten und dem tatsächlich berechneten, lassen sich bereits erste Rückschlüsse zu nachfolgender Korrelationsberechnung ziehen.

3.4.4.1 Korrelation phasischer Kontraktionen zu EFS Kontraktionen

EFS Reize dienten der Darstellung der glattmuskulären Erregbarkeit durch nervale Stimulation oder direkt muskulär erzeugter Aktionspotentiale. Die Kontraktionen, folgend auf Standard – EFS Reizung, präsentierten sich mit einem breiten Amplitudenspektrum, wohingegen sich die zugehörigen phasischen Kontraktionen bis auf wenige Ausnahmen auf einen vergleichsweise eng definierten Kraftbereich beschränkten. Dieser Zusammenhang führte zu einer Korrelation der Kraftentwicklung durch phasische Aktivität im Vergleich zu Standard – EFS Reizung von $r = 0,34$ ($n = 35$).

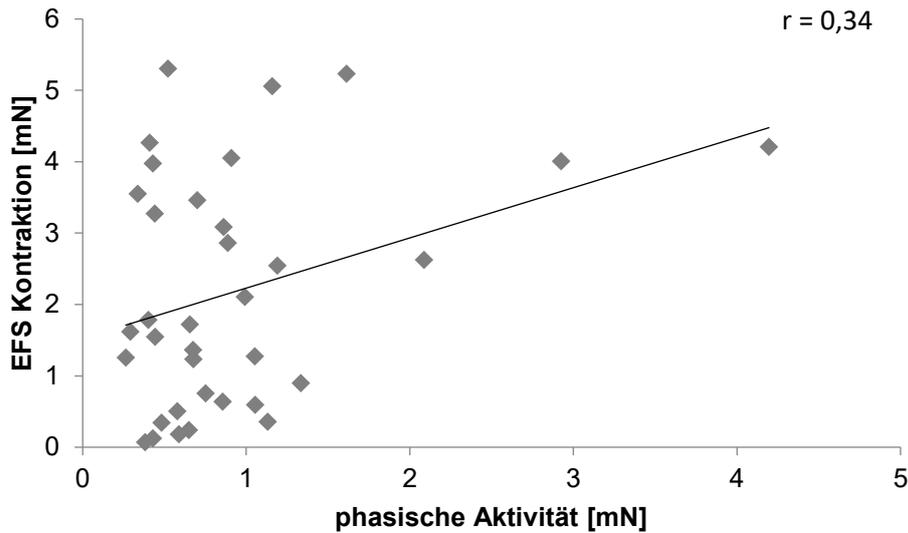


Abbildung 18 Regression zwischen EFS – Antwort und der Amplitudenhöhe phasischer Aktivität
 Der ermittelte Korrelationskoeffizient r und die resultierende Regressionsgerade findet sich mit abgebildet ($n = 35$)

Es zeigte sich, dass bei diesen morphologisch sehr ähnlichen Kontraktionen mit einer jedoch nur niedrigen Korrelationsrate der Amplitudenhöhen, das Ausmaß der Kraftentwicklung weitgehend unabhängig voneinander anzusehen ist.

3.4.4.2 Korrelation phasischer Kontraktionen zu Noradrenalin Kontraktionen

Noradrenalin Kontraktionen durch $NA\ 10^{-5}\ \text{mol/l}$ sollten die maximal möglichen α_1 – Rezeptor vermittelten Kontraktionen erzeugen. Bereits in oben geschilderten Vorbetrachtungen zeigten sich die Noradrenalin Kontraktionen einer vergleichsweise hohen Schwankung ausgesetzt. Dies spiegelte sich auch in der Korrelation zu nachfolgend erzeugten phasischen Kontraktionen wieder. Hier erreichte die Korrelationsanalyse nach Pearson einen Wert von $r = 0,66$ ($n = 13$).

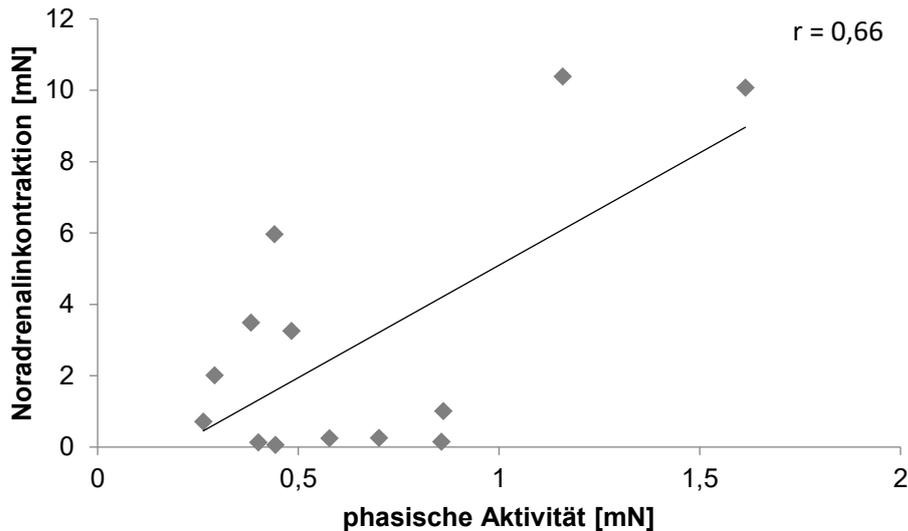


Abbildung 19 Regression zwischen Noradrenalinantwort und der Amplitudenhöhe phasischer Aktivität. Der ermittelte Korrelationskoeffizient r und die resultierende Regressionsgerade findet sich mit abgebildet ($n = 13$)

Wie bereits nach EFS – Reizung konnte auch die Stimulation der glattmuskulären α_1 – Rezeptoren keinen zuverlässigen Prädiktor für die Kraftentwicklung phasischer Aktivität darstellen.

3.4.4.3 Korrelation phasischer Kontraktionen zu Kaliumkontraktionen

Anders als bei den gerade beschriebenen Referenzkontraktionen verhielt sich der Vergleich mit Kontraktionen durch kaliumreiche Lösung. Mit dieser Form der Reizung, die durch direkte Depolarisation einen zyttoplasmatischen Calciumanstieg in allen glatten Muskelzellen erzeugte, konnten bereits im Vorfeld sehr stabile Ergebnisse erzielt werden. Verglichen mit zugehörigen Kontraktionswerten phasischer Aktivität zeigte sich hier eine Korrelation von $r = 0,81$ ($n = 14$).

Von den untersuchten Referenzkontraktionen konnten somit die Kontraktionen durch Kalium 40 mmol/l den größten Zusammenhang mit der Kraftentwicklung phasischer Aktivität aufzeigen. Somit konnte gezeigt werden, dass durch Depolarisation der glattmuskulären Zelle ausgelöste Mechanismen einen engeren Zusammenhang mit der Kraftentwicklung phasischer Aktivität aufwiesen als das die Reagibilität auf Rezeptorstimulation wie nach EFS Reizung und NA – Gabe.

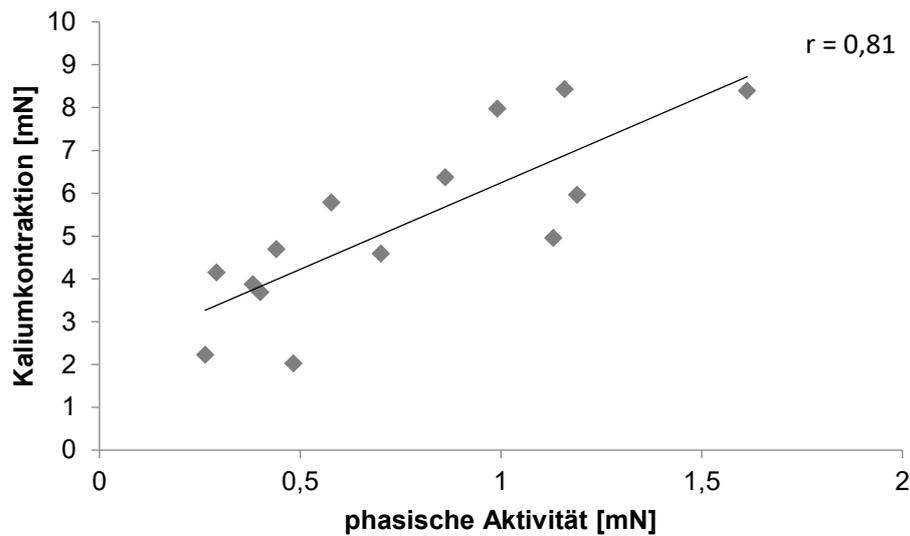


Abbildung 20 Regression zwischen Kontraktionen nach kaliumreicher Lösung und der Amplitudenhöhe phasischer Aktivität
 Der ermittelte Korrelationskoeffizient r und die resultierende Regressionsgerade findet sich mit abgebildet ($n = 14$)

3.4.5 Quantifizierung tonischer Aktivität

Tonische Aktivität konnte auf zwei Wegen erreicht werden. Zum einen als direkte tonische Antwort nach TEA – Gabe oder zum anderen als Endstufe nach zuvor etablierter phasischer Aktivität. Auf Grund dieser zwei Entstehungsformen ist zu vermuten, dass tonische Aktivität ein bestimmtes Aktivitätsniveau der involvierten Zelltypen erfordert. Einige Präparate erreichten dieses Aktivitätsniveau bereits kurz nach TEA – Gabe, dies war vor allem dann zu beobachten, wenn es zuvor bereits zu lang anhaltenden sub- / maximalen Kontraktionen gekommen war. Sollte sich die tonische Reaktionsform aus zuvor etablierter phasischer Aktivität entwickelt haben, wurde dafür mit durchschnittlich $40:55,5 \pm 03:01,4\text{min}$ ($n = 5$), gemessen vom Zeitpunkt der TEA – Gabe bis zum eindeutigen Anstieg des Kraftniveaus, ein vergleichsweise langer Zeitraum beansprucht. Zudem kam es in diesem Szenario, wie unter Punkt 3.4.1 bereits beschrieben, zu keinem plötzlichen Übergang von etablierter phasischer Aktivität zu tonischer Aktivität. Vielmehr kam es zu einem schrittweisen Übergang. Die Vermutung dass die tonische Aktivität das Resultat einer gesteigerten Aktivität prokontraktiler Prozesse ist, die zunehmend die Kapazitäten der relaxierenden Mechanismen übersteigt, wird Gegenstand der nachfolgenden Diskussion sein.

Ungeachtet der Entstehungsform erreichten diese tonischen Reaktionen ein durchschnittliches Kraftniveau, im Bereich vier Minuten vor Terminierung des Tonus, von $3,88 \pm 0,27\text{mN}$ ($n = 14$). Das erreichte Kraftniveau der tonischen Aktivität nach Tonusentwicklung aus phasischer Aktivität lag bei $3,68 \pm 0,23\text{mN}$ ($n = 5$) bzw. bei $112 \pm 34\%$ ($n = 3$) im Vergleich zu einer beim gleichen Präparat durchgeführten Kontraktion durch

Kalium 40mmol/l. Bei sofortiger Tonusentwicklung betrug die durchschnittliche Kraftentwicklung $4,98 \pm 0,48\text{mN}$ ($n = 9$). Der Zusammenhang zu Kontraktionen durch Kalium konnte zweimal untersucht werden. Das Verhältnis betrug jeweils 91% und 50%.

4 Diskussion

Diese Arbeit hatte zum Ziel phasische Kontraktionen im Versuchsaufbau einer Organbadmyographie reproduzierbar zu etablieren und die Rolle des zellulären Netzwerkes zur Initiierung und Aufrechterhaltung dieser repetitiven Kontraktionen zu untersuchen. Im folgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse dieser Arbeit interpretiert und in Bezug zur Fachliteratur gestellt werden.

4.1 Angewandte Methode zur Untersuchung der Fragestellung

Die Experimente mittels Organbadmyographie ermöglichten die Untersuchungen phasischer Aktivität in Mesenterialarterien am intakten Gewebepräparat. Um den Ursprung phasischer Aktivität als Resultat einer interzellulären Koordination zu untersuchen, wies diese Methode bedeutende Vorteile gegenüber der Untersuchung einzelner zellulärer Komponenten auf. Sowohl die Anordnung als auch die Funktion und Struktur der interzellulären Verschaltungen, auch zwischen Zellen verschiedenen Gewebersprungs, konnten mit dieser Methode erhalten werden. Im Gegenzug zu Untersuchungen in vivo konnten zudem die externen Bedingungen stabil gehalten werden. Einflüsse durch systemische Metaboliten mussten somit in der Interpretation der Ergebnisse keine Beachtung finden.

Weiterhin konnte eine gezielte Manipulation der extrazellulären Elektrolytzusammensetzung erfolgen ohne systemische Kompensationsmechanismen zu initiieren. Auf Grund der Isolation des Gefäßabschnittes wurde eine zentrale nervale Steuerung jedoch aufgehoben, sodass lediglich auf die Funktionen der postganglionären Nervenstrukturen Rückschlüsse gezogen werden konnte. Dass jedoch vom Zellsoma getrennte sympathische Nervenendigungen sowohl auf Stimulation als auch spontan zur Freisetzung von Transmittern in der Lage sind, konnte bereits in verschiedenen Studien demonstriert werden [40, 42, 91].

Bei der Interpretation der Ergebnisse gilt es jedoch die Grenzen der Organbadmyographie zu beachten. Auf Grund des nötigen Durchzuges zweier Drähte durch das Gefäßlumen war der minimale Gefäßdurchmesser limitiert, da auch das Endothel möglichst unbeschädigt belassen werden sollte. Dünnere Drähte wiesen in Vorexperimenten eine zu geringe Stabilität auf, sodass Gefäßkontraktionen durch die Elastizität der Drähte nicht registriert werden konnten. Eine Untersuchung peripherer liegender Gefäße, deren Beitrag zur Perfusionsregulation bedeutender anzusehen ist, war daher jedoch nicht möglich. Eine geringe Schädigung des Endothels war zusätzlich auch durch sorgfältige Präparation nicht auszuschließen.

Die gemessenen Kraftentwicklungen der Präparate basierten in dieser Arbeit auf

auxotonischen Kontraktionen. Dunn et al. [92] konnten zeigen, dass sich für rein isometrische Kontraktionen die physiologische, tonische Kontraktion als Reaktion auf Druckveränderungen verringert. Weiterhin zeigten die Gefäßpräparate im Vergleich zu Untersuchungen unter isobaren Eigenschaften eine geringere Reagibilität gegenüber vasoaktiven Substanzen. Durch die unter dem verwendeten Myographen resultierenden auxotonischen Kontraktion, mit jedoch überwiegend isometrischer Komponente, erfolgte daher durch die verwendete Methode eine weitere Einschränkung der physiologischen Abläufe des intakten Zellverbandes. Zusätzliche Einschränkungen ergeben sich aus dem Fehlen von longitudinalem Stress an der Gefäßwand [93].

Bei alleiniger Verwendung der Organbadmyographie stützte sich die Ergebnisinterpretation auf Annahmen bezüglich der Verteilung von Ionenkanälen, Rezeptoren und der intrazellulären Wirkung bei deren Stimulation. Diese Annahmen erfolgten auf Grundlage der aktuellen Fachliteratur. Eine direkte Visualisierung der intrazellulären Vorgänge konnte mit dieser Methode jedoch nicht erfolgen.

4.2 Wirkung externer Stimulation an Mesenterialgefäßen

Die Reaktion von Mesenterialgefäßen auf endogen freigesetzte sowie exogen zugeführte Stimuli ist von wesentlicher Bedeutung für die Regulation der Hämodynamik sowie zur Perfusion der versorgten viszerale Organe. Unter physiologischen Bedingungen erfolgt durch die Regulation der viszerale Durchblutung, beispielsweise bei gesteigerter muskulärer Aktivität, eine bedarfsadaptierte Umverteilung des Blutes. Von pathophysiologischer Bedeutung ist die Regulation der mesenteriale Durchblutung in Zeiten systemischen Volumenmangels oder pathologischen Veränderungen, die zum Bild Mesenterialischämie führen können. Die Reaktionen der Mesenterialarterien auf kontrahierende Reize sollten durch die nachfolgend diskutierten Versuche simuliert werden, um die Grundlagen zur Interpretation weiterer vorgenommener Experimente zu schaffen.

4.2.1 Nervale Reizung durch elektrische Feldstimulation

Mit der elektrischen Feldstimulation konnte zunächst eine Methode etabliert werden, die es erlaubte durch nervale Reizung eine limitierte Menge Transmitter in physiologischer Zusammensetzung freizusetzen [82] und die Kinetik dieser Reaktion zu vermessen. Unter Verwendung abweichender Paradigma der Stromapplikation ist die elektrische Feldstimulation bereits in vorhergehenden Studien als Mittel zur Reizung nervaler Strukturen beschrieben worden [50, 82]. Es ist jedoch zu beachten, dass auch auf der glattmuskulären Membran Na_v – Kanäle nachgewiesen werden konnten [81, 94]. Daher ist das Auslösen von Aktionspotentialen am glatten Muskel als ein zusätzlicher Wirkmechanismus der EFS in Betracht zu ziehen. Die Rolle dieses Kanals für die muskuläre Kontraktion ist dabei noch

nicht abschließend untersucht. Für ein Überwiegen einer transmitterinduzierten Kontraktion nach EFS – Reizung in den durchgeführten Experimenten spricht die hier gesehene hohe Korrelation zwischen den Kontraktionsstärken nach EFS – Reizung und Noradrenalingabe unter Punkt 3.1.4.

Das in dieser Arbeit verwendete Paradigma erwies sich als spezifisch für die Stimulation spannungsabhängiger Natriumkanäle. Auf Grund des weitgehenden Ausbleibens einer muskulären Antwort nach Vorlage von TTX und damit Blockade der Na_v – Kanäle ist die Wirkungsweise der Feldstimulation auf die Initiierung von Aktionspotentialen zurückzuführen. Lediglich bei höheren Stromstärken und verlängerter Reizdauer zeigten sich geringe TTX resistente Kontraktionen. Deren Ursprung liegt zum einen in einem unspezifischen Calciumeinstrom durch Depolarisation des glatten Muskels, eine Freisetzung kleinerer Mengen von transmitterbeladenen Vesikeln durch Depolarisation der Präsynapse ist ebenfalls möglich.

Die hohe Korrelation von $r = 0,91$ ($n = 24$) zwischen den Amplituden nach EFS – Reizung und NA – Gabe, unter Punkt 3.1.4, sprach dabei für die Wirkung der EFS über hauptsächlich rezeptorvermittelte Prozesse. Auch Ho et al. [56] konnten in ihrer Arbeit die Abhängigkeit der EFS Antwort von der Freisetzung präsynaptischer Transmitter zeigen. Sie sahen die Rolle der myozytären Na_v – Kanäle eher in einer funktionellen Kopplung mit Na/Ca – Tauschern zur Förderung des reversen Calciumtransportes, siehe dazu auch Abschnitt 1.3.4.2.

4.2.2 Adrenerge Stimulation durch Noradrenalingabe

Noradrenalin ist neben ATP und dem Neuropeptid Y einer von drei Transmittern die hauptsächlich vom sympathischen Nervensystem aus den Varikositäten in den peripheren Arterien freigesetzt werden. Es entfaltet seine Wirkung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme der intrazellulären Calciumkonzentrationen bewirken können. Bisher sind mindestens neun Subtypen identifiziert worden. In Widerstandsgefäßen finden sich Noradrenalinrezeptoren in Form von $\alpha_{2A/D}$, α_{2c} , β_1 , β_2 und β_3 auf Endothelzellen, $\alpha_{2A/D}$ und α_{2c} finden sich an der Präsynapse. Die Hauptwirkung jedoch entfaltet Noradrenalin am glatten Muskel absteigend an ihrem Beitrag zur Kontraktion über α_{1A} , α_{1D} und α_{1B} Rezeptoren [95].

Die Reaktionen auf Zugabe von Noradrenalin zeigten sich während der Experimente als sehr variabel. Dass es sich dabei um kein Einzelphänomen handelte, wurde unter anderem durch die Darstellungen von Hasibeder [96] verdeutlicht. Er betonte unter anderem die Bedeutung dieser individuellen Unterschiede auf die Reagibilität auf Vasopressortherapie in der Anästhesie und Intensivtherapie. Bereits 1976 konnte von Immink et al. [97] im Tierexperiment gezeigt werden, dass die Applikation von Noradrenalin in verschiedene Segmente der Mesenterialarterien zu stark variierenden Kontraktionen führte. Die Ergebnisse aus den hier durchgeführten Experimenten unterstützen diese Beobachtungen.

Die individuelle Reagibilität, insbesondere der Mesenterialarterien, auf noradrenerge Reize hat dabei einen multifaktoriellen Ursprung. Einflussfaktoren sind dabei die Rezeptoraffinität [98], endothelabhängige Relaxation [99] und ein negativer Effekt des Alters der Versuchstiere [100]. Weiterhin ist eine Variation der Dichte sympathischer Varikositäten in der Adventitia zu diskutieren.

Wegen dieser vielfältigen Einflüsse ergaben die Reaktionen auf EFS und Noradrenalingabe lediglich ein Abbild über die Kontraktionsfähigkeit der Muskelzellen, die auf Grund der lokalen Gegebenheiten auf eine Transmitterfreisetzung mit einer Kontraktion reagieren konnten.

4.2.3 Depolarisation durch kaliumreiche Lösung

Kontraktionen durch kaliumreiche Lösung zeichneten sich, verglichen mit Noradrenalin, durch ein enger definiertes Reaktionsspektrum aus, siehe dazu auch Abbildung 7. Auch Präparate die nur minimal auf Noradrenalingabe reagierten, zeigten ein konstant gutes Ansprechen. Dies findet in einer Korrelation von lediglich $r = 0,64$ ($n = 17$) beim Vergleich der Reaktion nach Noradrenalingabe und kaliumreicher Lösung Ausdruck. Auf Grund des direkt depolarisierenden Effektes am glatten Muskel mit nachfolgendem Calciumeinstrom bildet somit die Reaktion auf Kalium die Kontraktionsfähigkeit des gesamten muskulären Netzwerkes weitaus besser ab als die oben erwähnten überwiegend rezeptorvermittelten Kontraktionen.

4.3 Initiierung phasischer Aktivität durch TEA vermittelte Effekte

In den Untersuchungen zur nötigen TEA Schwellenkonzentration für die Initiierung phasischer Aktivität erwies sich eine Konzentration von mindestens $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l als notwendig. Das mittels Zugabe von TEA in ein Organbad repetitive Kontraktionen in Gefäßen ausgelöst werden können, konnte beispielsweise bereits von Droogmans [101] sowie Young et al. [88] demonstriert werden. Auch in diesen Arbeiten zeigten sich spontan auftretende Kontraktionen erst ab TEA Konzentrationen größer 10^{-3} mol/l.

In diesem Konzentrationsbereich bewirkt TEA eine unspezifische Blockade glattmuskulärer Kaliumkanäle der Subtypen K_{Ca} , K_{Na} , sowie eine inkomplette Blockade der K_v -Kanäle [75]. Mit einer Blockade dieser Kanäle auf Ebene des Endothels und der vegetativen Nervenbahnen ist ebenfalls zu rechnen. Durch TEA werden somit auftretende Aktionspotentiale oder andere depolarisierende Ströme über die physiologische Dauer verlängert [88] und über eine Reduktion der Kaliumleitfähigkeit führt TEA zu einer Depolarisation im Bereich von -40mV - -30mV [101], was Oszillationen der Plasmamembran durch zusätzlich depolarisierende Reize erleichtert. Droogmans [101] beschrieb

dahingehend, dass es eine Erhöhung des Membranpotentials über -35mV notwendig war, um repetitive Kontraktionen unter TEA auszulösen.

Die Abhängigkeit der TEA induzierten Kontraktionen von der Kalziumleitfähigkeit konnte in mehrfachen Experimenten gezeigt werden [87, 88, 101, 102] und auch in der vorliegenden Arbeit führte die Zugabe von Nifedipin zu einer Inhibition der phasischen Kontraktionen. Es ist daher anzunehmen, dass die TEA vermittelten Kontraktionen über die Aktivierung von in der Plasmamembran der Varikositäten und vor allem des glatten Muskels lokalisierten Ca_v – Kanälen getragen werden. Eine eventuelle Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum über RyR oder IP_3 – Rezeptoren erscheint auf Grund der ermittelten Daten nicht ausreichend für die Ausbildung einer Kontraktion zu sein.

Für das Auftreten phasischer Kontraktionen erscheint die Blockade von K_v – Kanälen von entscheidender Bedeutung, da bei geringeren TEA Konzentrationen bereits die Blockade der K_{Ca} und K_{Na} erfolgte und lediglich eine verstärkte Reaktion auf beispielsweise Noradrenalin zu verzeichnen war [88]. Dies wird durch die Beobachtungen von Wu et al. unterstützt, die bei spezifischer Blockade der K_{Ca} – Kanäle keine repetitiven Kontraktionen oder Änderungen des Grundtonus beobachten konnten. Eine spezifische Blockade der K_v – Kanäle führte jedoch zum Auftreten einer tonischen Kontraktion [87]. Bei einer TEA Konzentration von 10^{-2} mol/l ist jedoch nicht von einer vollständigen Blockade der K_v – Kanäle auszugehen [75].

Einen weiteren Beitrag zum Wirkungsspektrum von TEA lieferten Kannan und Daniel [103], sowie Watts et al. [104] mit ihrer Beschreibung über den vermehrten Einbau von gap junctions in die glattmuskulären Membranen. Unter TEA würden somit Erregungen, über die verstärkte elektrische Kopplung, umfassender über das muskuläre Netzwerk verbreitet.

Durch die Betrachtung der Ergebnisse und der Literatur wird verdeutlicht, dass die Wirkung von TEA zur Auslösung phasischer Kontraktionen in Mesenterialarterien in der Gesamtheit der Wirkmechanismen zu sehen ist. Weiterhin konnten durch die oben genannten Erläuterungen bisher nur Faktoren diskutiert werden, die für das Auftreten repetitiver Kontraktionen das notwendige Milieu schaffen. Die Grundlage der Oszillationen intrazellulärer Calciumkonzentrationen können durch die TEA Wirkung allein bisher nicht geklärt werden.

Die muskelrelaxierende Wirkung sowie die stabilisierenden Effekte auf das Membranpotential, die PGI_2 zugesprochen werden, scheinen in dieser Arbeit für die Wirkung von TEA keinen messbaren Effekt zu haben. Unter Vorlage von Indomethacin konnte kein Unterschied in der nötigen TEA Konzentration zur Initiierung phasischer Kontraktionen festgestellt werden. Eine Änderung der Charakteristik der Kontraktionen wurde ebenfalls nicht beobachtet. Auch in den Arbeiten von Bertuglia et al. [105] und Osol und Halpern [89] zeigte sich die Vasomotion nicht durch Indomethacingabe beeinflusst.

4.4 Die Varikosität ein potentieller nervaler Oszillator

Wie im vorhergehenden Abschnitt dargelegt kann allein durch die TEA - vermittelten Effekte die Entstehung phasischer Aktivität nicht hinreichend erklärt werden. Als notwendig für das Auftreten von Vasomotion wird das Vorhandensein einer oder mehrerer funktionell gekoppelter Strukturen gesehen, die eine oszillierende Erregung ausbilden [12, 14, 20]. Die involvierten Strukturen sind in der Literatur viel diskutiert, wobei das gleichzeitige Vorkommen multipler Oszillatoren in der gleichen Gefäßregion als möglich erachtet wird [14]. Ein Hauptaugenmerk lag dabei jedoch bisher auf einer autonomen Aktivität der glatten Muskelzellen, bedingt durch eine intramuskuläre Oszillation. Auf Grund der experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit soll hier ein weiterer potentieller Ursprung oszillierender Erregung außerhalb des glatten Muskels vorgestellt werden.

4.4.1 Vergleichbare Kinetik phasischer Kontraktionen und der EFS Reizantworten

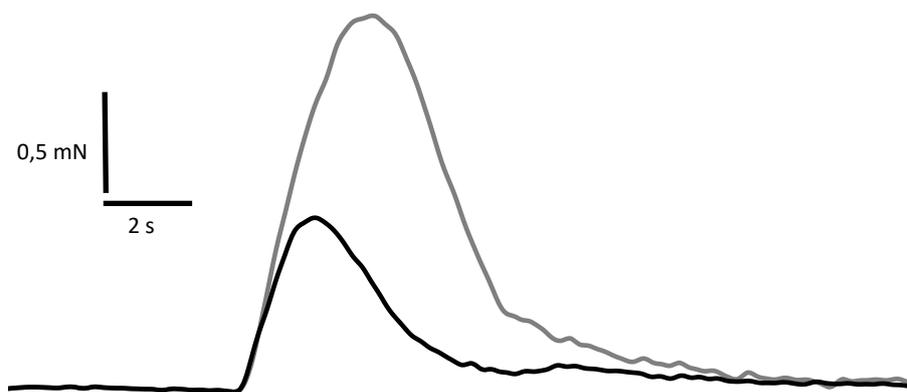


Abbildung 21 Überlagerte Darstellung einer repräsentativen EFS sowie phasischer Kontraktion eines Präparates

EFS- Kontraktion (grau) Amplitude von 1,87mN und Anstieg von 0,44mN/s

phasische Kontraktion (schwarz) Amplitude von 0,84mN und Anstieg von 0,47mN/s

Die Kontraktionen durch EFS und während etablierter phasischer Aktivität wiesen eine auffallende Ähnlichkeit auf. Quantifizieren ließ sich diese qualitative Beobachtung anhand der Anstiegsdaten phasischer und EFS Kontraktionen. Diese befanden sich mit $0,50 \pm 0,05$ mN/s ($n= 627$) und $0,52 \pm 0,02$ mN/s ($n=193$) in einem sehr ähnlichen Bereich. Es konnte daher vermutet werden, dass es sich bei den EFS und phasischen Kontraktionen um muskuläre Antworten handelte, denen ähnliche auslösende Mechanismen zugrunde lagen. Die Wirkung von TTX zur Inhibition beider Kontraktionsformen unterstützt dabei diese getroffene Annahme.

Die EFS wurde in den Mesenterialarterien der Ratte bisher als selektiver Mechanismus zur Stimulation der nervalen Funktion gesehen [50, 56, 82] und auch die hier vorliegenden Daten, Korrelation von EFS – und NA – Antwort von $r = 0,91$ ($n = 24$), weisen auf eine überwiegend nervale Komponente der EFS Kontraktionen hin.

Dass der mögliche Auslösende Mechanismus für die Calciumoszillationen der glatten Muskelzellen auch in nervalen Strukturen zu sehen ist, geht unter anderem aus der Arbeit von Schmidt et al. [21] hervor. Hier führte eine chirurgische Denervierung zum Stoppen der Vasomotion in der untersuchten Femoralarterie eines Hasen. Auch an isolierten Präparaten der Mesenterialarterie und des Vas deferens konnten unter anderem von Yamaguchi [41] und Brain et al. [40] spontane Transmitterfreisetzungen aus Varikositäten beobachtet werden.

4.4.2 Abhängigkeit phasischer Aktivität von Aktionspotentialen

Die Abhängigkeit phasischer Aktivität von Aktionspotentialen, generiert durch Na_v – Kanäle, sollte wie zuvor für die EFS Antwort überprüft werden. Es zeigte sich, dass TTX sowohl zu einer signifikanten Reduktion des Kraftniveaus als auch zu einem Sistieren der repetitiven Kontraktionen führte, siehe Abbildung 12 sowie Tabelle 5. Es konnte somit die Bedeutung von Na_v – Kanal vermittelten Aktionspotentialen als essentieller Bestandteil phasischer Kontraktionen in der Mesenterialarterie der Ratte dargestellt werden.

In bisherigen Untersuchungen zu Vasomotion konnte diese TTX Sensitivität nicht gezeigt werden. In Arteriolen des Hippocampus [106], des Cerebrums [102] sowie der Basilararterie der Ratte [107] zeigte sich Vasomotion resistent gegenüber TTX Applikation. Über den Ursprung phasischer Aktivität oder Vasomotion wurden bisher hauptsächlich intrinsische Mechanismen des glatten Muskels diskutiert [20]. Beispiele hierfür sind die calciuminduzierte Calciumfreisetzung sowie die spezifische Aktivität der PLC - δ für deren detaillierte Beschreibung auf Punkt 1.4.1.2 der Einleitung verwiesen wird.

Die blockierende Wirkung von TTX auf den Ionenstrom durch spannungsabhängige Natriumkanäle im Nervensystem ist allgemein akzeptiert [79]. Dagegen ist die Rolle vereinzelt auftretender Na_v – Kanäle im Bereich des glatten Muskels noch weitgehend unklar. So war beispielsweise der Nachweis von Na_v – Kanälen in den Untersuchungen von Berra-Romani et al. [81] abhängig vom gewählten Verfahren der Zellseparation. Die durch Ho et al. postulierte funktionale Kopplung von Na/Ca – Tauscher und myozytärer Na_v – Kanäle basiert auf experimentellen Daten unter Annahme eines Funktionsverlustes der vegetativen Nerven durch selektive Zerstörung durch Gabe von 6-Hydroxydopamin. Die Ergebnisse konnten jedoch in der gleichen Arbeit nach Gabe von Guanethidin, einem Inhibitor der nervalen Transmitterfreisetzung, als Kontrolle zum Wirkprinzip von 6-Hydroxydopamin nicht reproduziert werden [56]. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit unterstützen vielmehr die spezifische Wirkung von TTX an Na_v – Kanälen der vegetativen Nerven. So folgten beispielsweise die Kontraktionen phasischer Aktivität und nach EFS einer

ähnlichen Kinetik, siehe dazu Punkt 4.4.1, auch konnte durch die Gabe von Prazosin eine partielle Inhibition phasischer Aktivität registriert werden.

Die Inhibition phasischer Kontraktionen durch spezifische Blockade nervaler Na_v – Kanäle weist dabei stark auf eine oszillierende Freisetzung von Transmittern aus den Varikositäten als Ursache phasischer Aktivität hin.

Im Gegensatz zu phasischer Aktivität bestand nach Zugabe von TTX zu tonischer Aktivität eine deutlich messbare Restaktivität. Dieser TTX resistente Anteil tonischer Aktivität, im Durchschnitt $37 \pm 12,9\%$ ($n= 4$) des ursprünglich erreichten Kraftniveaus, spricht dabei für eine Na_v – Kanal unabhängige Depolarisation ab einem bestimmten Aktivitätslevel. Nach dem von Koenigsberger et al. [108] postulierten Modell, siehe dazu nachfolgend Punkt 4.5, lässt sich diese Beobachtung durch eine Calciumakkumulation innerhalb des glatten Muskels erklären, die einen dauerhaften Strom durch Ca_v – Kanäle nach sich zieht.

4.4.3 Bedeutung von Transmittern und der Netzbildung für phasische Aktivität

Zur Überprüfung ob es sich bei der beobachteten phasischen Aktivität um das Resultat einer repetitiven Noradrenalinfreisetzung aus Varikositäten handelte, wurde das Verhalten gegenüber Prazosin untersucht. Im Ergebnis zeigte eine Hälfte der Präparate eine deutliche Reaktion, mit Reduktion des Kraftniveaus und der Kontraktionszahl. Zum anderen Teil jedoch kam es nach Prazosinzugabe zu einer gleichbleibenden oder auch gesteigerten Aktivität. Somit konnte zwar insgesamt kein signifikanter Unterschied dargestellt werden, aber auf Grund dieser zwei gegensätzlichen Reaktionsformen auf Prazosinangabe kann von einer Unabhängigkeit phasischer Aktivität von Noradrenalin nicht gesprochen werden.

Im Gegensatz hierzu zeigte die tonische Kontraktionsform eine klare Abhängigkeit von α_1 – Rezeptor vermittelter Stimulation mit einer Reduktion des Tonus um 30,7% bzw. 94,2%. Der große Unterschied im bestehenden Resttonus nach Prazosinangabe wird auf die Entstehungsform der tonischen Kontraktion zurückgeführt. Es wird davon ausgegangen, dass es bei langsamer Tonusentwicklung zu einer stärkeren Akkumulation von Calciumionen im glatten Muskel gekommen war, deren Elimination weniger reversibel war als nach sofortigem Übergang in eine tonische Kontraktionsform. Auf die Rolle der intrazellulären Calciumkonzentration für die Charakteristik phasischer und tonischer Aktivität wird ausführlicher im folgenden Punkt eingegangen.

Eine Erklärung für die uneinheitliche Reaktion phasischer Aktivität auf die Gabe von Prazosin ist die mögliche Bindung von Prazosin an präsynaptische, inhibitorische α_2 – Rezeptoren. Wie bereits unter Punkt 3.3.3 erläutert, würde die Bindung von Prazosin an diese Rezeptoren zu einer paradox verstärkten Transmitterfreisetzung führen und somit bei betroffenen Präparaten die Noradrenalinwirkung nicht inhibieren, sondern verstärken. Die Verwendung von Prazosin in höherer Konzentration würde an dieser Stelle möglicherweise zu einheitlicheren Ergebnissen führen. Eine Beteiligung von Noradrenalin an der Entstehung

phasischer Aktivität erscheint unter Berücksichtigung dieser Überlegungen jedoch als möglich.

Bei dauerhaft aktivierten, perivaskulären Nerven durch TEA vermittelte Depolarisation wäre eine repetitive Noradrenalinfreisetzung durch konzentrationsabhängige Autoinhibition der Varikositäten durch α_2 – Rezeptoren ein mögliches oszillierendes System. In den beispielhaft angeführten Untersuchungen von Mshghina et al. [109] an der Schwanzarterie der Ratte konnten bei lang anhaltender nervaler Aktivierung durch elektrische Reizung jedoch keine relevanten Schwankungen in der postsynaptischen Aktivität gemessen werden. Der Einfluss von α_2 – Rezeptoren beschränkte sich hier auf eine generelle Reduktion der postsynaptischen Aktivität, unabhängig der Reizdauer.

Die potentielle Rolle der perivaskulären Nervenfasern als Oszillator während phasischer Aktivität wird durch die Untersuchungen von Brock et al. [42] unterstützt. Sie konnten eine Freisetzung von Noradrenalin aus perivaskulären Nerven in der Mesenterialarterie der Ratte spontan, ohne nervale Reizung, messen. Die Frequenz belief sich auf einen Bereich von circa einem Ereignis pro Minute. Ein möglicher auslösender Mechanismus für die spontane Freisetzung geht aus den Ergebnissen nicht hervor.

Für die Entstehung phasischer Aktivität als Resultat einer repetitiven Transmitterfreigabe ist die Bedeutung des zellulären Netzwerkes innerhalb der Gefäßwand herauszustellen. In den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen zeigte sich, dass die Korrelation zwischen Amplituden phasischer Kontraktionen mit der Kraft einer Kalium 40mmol/l Kontraktion viel höher ausfiel ($r = 0,81$; $n = 14$) als im Vergleich zu den rezeptorvermittelten Reizen, wie NA und EFS ($r = 0,66$; $n = 13$ bzw. $r = 0,34$; $n = 35$). Die Kraft der glatten Muskelzellen während phasischer Kontraktionen scheint daher weniger von der Affinität und Dichte ihrer Rezeptoren abzuhängen, sondern vielmehr von dem kontraktilen Potential des Verbundes aus Muskelzellen. Über die Verschaltung der Muskelzellen durch gap junctions sind Erregungen an definierten Orten („hot spots“) der Gefäßwand ausreichend, um das Kontraktionssignal über ein Netzwerk zu verteilen [110].

Sollte die untersuchte phasische Aktivität auf eine autonome nervale Aktivität zurückzuführen sein, so implizieren diese Ergebnisse, dass die Kontraktionen nicht auf einer synchronen Transmitterfreigabe mehrerer Varikositäten beruhen, sondern die Erregung im Bereich einzelner Varikositäten erzeugt wird und über das Netzwerk der glatten Muskelzellen weitergeleitet wird.

4.5 Zeitliche Variabilität phasischer Aktivität

Im Unterschied zur Stimulation mit direkten Agonisten kam es zum Auftreten phasischer Kontraktionen erst nach einer gewissen Latenzzeit von durchschnittlich $01:01,3 \pm 00:21,6$ min. Weiterhin konnte sowohl ein Ausbleiben einer Reaktion in 10,8% als auch ein direkter

Übergang in eine tonische Komponente in 16,2% der untersuchten Präparate festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass für das Auftreten phasischer Aktivität gewisse zelluläre Voraussetzungen vorhanden sein müssen. Diese können struktureller Natur sein, wie der oben beschriebene Einbau von gap junctions, oder auch auf einen benötigten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zurückzuführen sein. Koenigsberger et al. [108] beschreiben in ihrem Modell zur Vasomotion drei Schwellen intrazellulärer Calciumkonzentrationen. Über eine zunächst unsynchronisierte Calciumfreisetzung in den glatten Muskelzellen kommt es bei Erhöhung des externen Stimulus zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und daraus resultierender oszillierender synchroner Calciumfreisetzung in einem Netzwerk aus verbundenen glatten Muskelzellen. Ein weiterer Anstieg der Calciumkonzentration bewirkt ein Ende der Oszillationen und führt zu einer konstanten Kontraktion. In der vorliegenden Arbeit konnte diese postulierte Transformation in Abhängigkeit der Dauer phasischer Aktivität beobachtet werden. So konnte bei Präparaten, die zuvor längere Zeit maximal stimuliert wurden mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eine direkte tonische Reaktion nach TEA Gabe beobachtet werden. Weiterhin spricht für diese Hypothese der kritischen Calciumkonzentration, dass phasische Aktivität, bei initial TEA resistenten Präparaten, durch EFS Stimulation ausgelöst werden konnte. Diese synchronisierenden Eigenschaften der EFS wurden bereits unter anderem von Jacobsen et al. [65] beschrieben. Die Transformation von nicht – etablierter phasischer Aktivität hin zur Entwicklung eines Kontraktionstonus deutet darauf hin, dass es sich bei dem beobachteten Phänomen um einen sich selbst verstärkenden Prozess handelt.

Dass die sich entwickelnde tonische Kontraktion maßgeblich über den Einstrom vom Calcium durch Ca_v – Kanäle gesteuert wird, konnte durch die deutliche Reduktion des Tonus durch die Gabe von Nifedipin gezeigt werden. Die Entstehung der tonischen Reaktion ist, auf Grund der Beobachtungen, am wahrscheinlichsten durch einen schrittweisen Anstieg des intrazellulären Calciums zurückzuführen. Im Verlauf kam es daraufhin zu einer Dekompensation der Mechanismen zur Calciumelimination. Eine mögliche calciuminduzierte Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, wie sie von Aalkjaer und Nilsson [12] als möglicher Mechanismus zur Aufrechterhaltung von Vasomotion beschrieben wurde, kann zur Dekompensation des Gleichgewichtes beigetragen haben. Die Abhängigkeit sowohl der phasischer Kontraktionen als auch der tonischen Reaktionsform von Ca_v – Kanälen spricht jedoch dagegen, dass eine calciuminduzierte Calciumfreisetzung alleine in der Lage wäre die beobachtete phasische Aktivität aufrechtzuerhalten.

4.6 Modellrechnung zu Auswirkungen phasischer Kontraktionen in vivo

Die physiologische Funktion zeitlich variabler Kontraktionen in Widerstandsgefäßen ist bisher noch wenig verstanden. Neben einer möglichen, verbesserten Sauerstoffversorgung durch variierende Sauerstoffpartialdrücke [20] ist die Verstärkung von Filtrationsprozessen eine weitere potentielle Wirkung von Vasomotion. Eine lokale Reduktion des Gefäßquerschnittes durch eine zeitlich terminierte muskuläre Kontraktion würde bei einem gleichbleibenden systemischen Blutdruck zu einer Erhöhung des transmuralen Druckes führen und somit die Filtrationsprozesse begünstigen.

Weiterhin wirken sich die Schwankungen des Gefäßdurchmessers auf die Durchblutung des nachgeschalteten Gefäßbettes aus. Auf Grundlage der Untersuchungen zur Korrelation phasischer Kontraktionen und Kontraktionen durch Kalium 40mmol/l ließen sich Modellrechnungen zu den Auswirkungen der phasischen Kontraktionen auf die Durchblutung des Gefäßabschnittes in vivo durchführen. Im Durchschnitt belief sich die Amplitude der phasischen Kontraktionen auf $14,25 \pm 1,35\%$ ($n = 14$) der zugehörigen Kaliumkontraktion. Bei Annahme eines kompletten Gefäßverschlusses durch Kalium 40 mmol/l, siehe dazu auch VanBavel et al. [83], würde phasische Aktivität somit zu einer Reduktion des Gefäßquerschnittes auf 85,75% des Ausgangswertes führen. Nimmt man für den Gefäßquerschnitt eine Kreisform an, so würde sich der Radius auf 92,6% des Ruhewertes reduzieren. Diese Reduktion des Radius würde in einer Steigerung des Widerstandes auf 135,99% im Vergleich zum Ruhetonus resultieren. Die Berechnung erfolgte nach folgender Überlegung:

$$R_1 = \frac{8 * \eta * l}{\pi * r^4}$$

$$R_2 = \frac{1}{0,926^4} * R_1$$

$$R_2 = 1,3599 * R_1$$

Für den Fluss über das Gefäßsegment hätte der reduzierte Gefäßquerschnitt während der maximalen Kontraktion phasischer Aktivität eine Verringerung auf 73,53% des Ausgangswertes zur Auswirkung. Die Berechnung erfolgte unter Verwendung des Gesetzes nach Hagen – Poiseuille:

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

$$\dot{Q}_2 = 0,926^4 * \dot{Q}_1$$

$$\dot{Q}_2 = 0,7353 * \dot{Q}_1$$

4.7 Zusammenfassung

Zeitlich variable Kontraktionen glatter Muskulatur bilden die Grundlage vieler vegetativer Prozesse im Körper. Von besonderem Interesse für diese Arbeit war die unter dem Begriff der Vasomotion subsummierte Fähigkeit von Gefäßen sich ohne übergeordnete Steuerung repetitiv zu kontrahieren. Am Modellpräparat der Mesenterialarterie der Ratte wurde, durch die durch Mulvany und Halpern [73] etablierte Methode der Organbadmyographie für Gefäße, dieses Phänomen untersucht. Hierfür wurden phasische und tonische Kontraktionen durch die Gabe von TEA, einem unspezifischen Kaliumkanalblocker, induziert. Die nachfolgenden Experimente dienten der Fragestellung nach einem Zusammenhang autonomer Aktivität perivaskulärer Nerven und phasischer Kontraktionen der Gefäßmuskulatur. Hierfür erfolgte unter anderem die gezielte pharmakologische Inhibition verschiedener Ebenen der nervalen und muskulären Interaktion. Durch dieses Vorgehen konnte zum einen die Abhängigkeit phasischer Kontraktionen von der Funktion spannungsabhängiger Calciumkanäle der Zellmembran, wie es bereits für verschiedene Gefäßtypen gezeigt wurde [19], bestätigt werden.

Weiterhin wiesen die Ergebnisse darauf hin, dass die Reize zur Initiierung phasischer und tonischer Kontraktionen von nervalen Strukturen ausgehen, da sich die Kontraktionen sowohl sensitiv auf die Inhibierung von Aktionspotentialen im Bereich der vegetativen Nerven als auch in gewissem Maße durch die Blockade von α_1 – Rezeptor vermittelten Signalkaskaden zeigten.

Unabhängig von den Überlegungen zur autonomen Aktivität perivaskulärer Nervenfasern, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Aktionspotentiale über Na_v – Kanäle in der Mesenterialarterie der Ratte einen bisher unbeschriebenen, wesentlichen Beitrag zum Auftreten phasischer Aktivität leisten. Die Rolle dieser Kanäle kann dabei im Bereich des Oszillators, wie in den oben aufgeführten theoretischen Überlegungen, zu suchen sein, aber auch eine Funktion in der interzellulären Synchronisation erfüllen. Die Möglichkeit der Synchronisation durch nervale Strukturen wurde bereits von Aalkjaer und Nilsson [12] vor allem wegen der Fähigkeit der schnellen Impulsübertragung über weite Strecken diskutiert.

Die detaillierte Charakterisierung phasischer und tonischer Aktivität verdeutlichte nochmals die Bedeutung des Netzwerkes glatter Muskelzellen für die Entstehung dieser Kontraktionsformen. Durch die Beobachtungen konnten weiterhin experimentelle Daten

geliefert werden, die das von Koenigsberger et al. [108] vorgestellte Modell der Transformation der kontraktile Aktivität glatter Muskelzellen in Abhängigkeit der intrazellulären Calciumkonzentration unterstützen.

Die weitere Erforschung der autonomen vaskulären Regulation wird auch im Hinblick auf die hohe kardiovaskuläre Mortalität von hohem gesellschaftlichen Interesse sein. Im Bereich der Mikrozirkulation können sich die Vorgänge der Vasomotion erheblich auf die Perfusion der versorgten Organabschnitte auswirken. Für Zeiten kritischer Organperfusion, ausgelöst durch mikroangiopathische Veränderungen beispielsweise im Rahmen eines Diabetes mellitus in dessen Rahmen es zusätzlich zu einer Neurodegeneration der perivaskulären Nerven kommt, könnte das weitere Verständnis von Vasomotion in Zukunft einen Beitrag für neue Therapieansätze liefern.

5 Literaturverzeichnis

1. RKI und DESTATIS (2016) GESUNDHEITSBERICHTERSTATTUNG DES BUNDES, Sterbefälle, Sterbeziffern je 100000 Einwohner
2. Bayliss WM (1902) On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *The Journal of Physiology* 28(3): 220–231. doi: 10.1113/jphysiol.1902.sp000911
3. Folkow B (1952) A study of the factors influencing the tone of denervated blood vessels perfused at various pressures. *Acta physiologica Scandinavica* 27(2-3): 99–117. doi: 10.1111/j.1748-1716.1953.tb00928.x
4. Davis MJ, Hill MA (1999) Signaling Mechanisms Underlying the Vascular Myogenic Response. *Physiological Reviews* 79(2): 387–423
5. Nilsson H, Aalkjaer C (2003) Vasomotion: mechanisms and physiological importance. *Mol Interv* 3(2): 79–89, 51. doi: 10.1124/mi.3.2.79
6. Kapela A, Parikh J, Tsoukias NM (2012) Multiple Factors Influence Calcium Synchronization in Arterial Vasomotion. *Biophysical Journal* 102(2): 211–220. doi: 10.1016/j.bpj.2011.12.032
7. van Helden DF, Hosaka K, Imtiaz MS (2006) Rhythmicity in the microcirculation. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 34: 59–66
8. Benoit JN, Zawieja DC, Goodman AH et al. (1989) Characterization of intact mesenteric lymphatic pump and its responsiveness to acute edemagenic stress. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 257(6): H2059–H2069
9. Sutter MC (1990) The mesenteric-portal vein in research. *Pharmacological Reviews* 42(4): 287–325
10. Kawasaki K, Seki K, Hosoda S (1981) Spontaneous rhythmic contractions in isolated human coronary arteries. *Experientia* 37(12): 1291–1292. doi: 10.1007/BF01948367
11. Nicoll PA, Webb RL, Lutz BR (1955) Vascular Patterns and Active Vasomotion as Determiners of Flow Through Minute Vessels. *Angiology* 6(4): 291–310. doi: 10.1177/000331975500600403
12. Aalkjaer C, Nilsson H (2005) Vasomotion: cellular background for the oscillator and for the synchronization of smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology* 144(5): 605–616. doi: 10.1038/sj.bjp.0706084
13. Harhun MI, Pucovský V, Povstyan OV et al. (2005) Interstitial cells in the vasculature. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*(Vol 9, No 2): 232–243
14. Matchkov VV (2010) Mechanisms of cellular synchronization in the vascular wall. Dissertation, University of Aarhus
15. Lamboley M, Schuster A, Bény J-L et al. (2003) Recruitment of smooth muscle cells and arterial vasomotion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285(2): H562–9. doi: 10.1152/ajpheart.00526.2002.
16. Seppey D, Sauser R, Koenigsberger M et al. (2010) Intercellular calcium waves are associated with the propagation of vasomotion along arterial strips. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 298(2): H488–H496. doi: 10.1152/ajpheart.00281.2009
17. Daut J, Klieber H-G, Cyrus S et al. (1994) KATP channels and basal coronary vascular tone. *Cardiovascular Research* 28(6): 811–817. doi: 10.1093/cvr/28.6.811
18. Koenigsberger M, Sauser R, Lamboley M et al. (2004) Ca²⁺ dynamics in a population of smooth muscle cells: modeling the recruitment and synchronization. *Biophysical Journal* 87(1): 92–104. doi: 10.1529/biophysj.103.037853

19. Haddock RE, Hill CE (2005) Rhythmicity in arterial smooth muscle. *The Journal of Physiology* 566(3): 645–656. doi: 10.1113/jphysiol.2005.086405
20. Pradhan RK, Chakravarthy VS (2011) Informational dynamics of vasomotion in microvascular networks: a review. *Acta Physiol (Oxf)* 201(2): 193–218. doi: 10.1111/j.1748-1716.2010.02198.x
21. Schmidt JA, Borgstrom P, Intaglietta M (1991) Neurogenic modulation of periodic hemodynamics in rabbit skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*(75): 1216–1221
22. Hill RA, Tong L, Yuan P et al. (2015) Regional Blood Flow in the Normal and Ischemic Brain Is Controlled by Arteriolar Smooth Muscle Cell Contractility and Not by Capillary Pericytes. *Neuron* 87(1): 95–110. doi: 10.1016/j.neuron.2015.06.001
23. Nausch LW, Bonev AD, Heppner TJ et al. (2012) Sympathetic nerve stimulation induces local endothelial Ca²⁺ signals to oppose vasoconstriction of mouse mesenteric arteries. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 302(3): H594-H602. doi: 10.1152/ajpheart.00773.2011
24. Dickens EJ, Hirst GDS, Tomita T (1999) Identification of rhythmically active cells in guinea-pig stomach. *The Journal of Physiology* 514(2): 515–531. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.515ae.x
25. Pucovsky V, Moss RF, Bolton TB (2003) Non-contractile cells with thin processes resembling interstitial cells of Cajal found in the wall of guinea-pig mesenteric arteries. *The Journal of Physiology* 552(1): 119–133. doi: 10.1113/jphysiol.2003.046243
26. Formey A, Buscemi L, Boittin F-X et al. (2011) Identification and functional response of interstitial Cajal-like cells from rat mesenteric artery. *Cell Tissue Res* 343(3): 509–519. doi: 10.1007/s00441-010-1114-1
27. Bolton TB, Gordienko DV, Povstyan OV et al. (2004) Smooth muscle cells and interstitial cells of blood vessels. *Cell Calcium* 35(6): 643–657. doi: 10.1016/j.ceca.2004.01.018
28. Gustafsson F, Holstein-Rathlou N-H (1999) Conducted vasomotor responses in arterioles: characteristics, mechanisms and physiological significance. *Acta Physiol Scand* 167: 11–21
29. Straub AC, Zeigler AC, Isakson BE (2014) The myoendothelial junction: connections that deliver the message. *Physiology (Bethesda)* 29(4): 242–249. doi: 10.1152/physiol.00042.2013
30. Dora KA, Xia J, Duling BR (2003) Endothelial cell signaling during conducted vasomotor responses. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285(1): H119-26. doi: 10.1152/ajpheart.00643.2002
31. Haddock RE, Grayson TH, Brackenbury TD et al. (2006) Endothelial coordination of cerebral vasomotion via myoendothelial gap junctions containing connexins 37 and 40. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291(5): H2047-56. doi: 10.1152/ajpheart.00484.2006
32. Peng H, Matchkov V, Ivarsen A et al. (2001) Hypothesis for the Initiation of Vasomotion. *Circulation Research* 88(8): 810–815. doi: 10.1161/hh0801.089603
33. Mauban JRH, Wier WG (2004) Essential role of EDHF in the initiation and maintenance of adrenergic vasomotion in rat mesenteric arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287(2): H608-16. doi: 10.1152/ajpheart.01084.2003
34. Seppey D, Sauser R, Koenigsberger M et al. (2008) Does the Endothelium Abolish or Promote Arterial Vasomotion in Rat Mesenteric Arteries? Explanations for the Seemingly Contradictory Effects. *J Vasc Res* 45(5): 416–426. doi: 10.1159/000124283
35. Bennett MR, Farnell L, Gibson WG et al. (2004) A quantitative description of the diffusion of noradrenaline in the media of blood vessels following its release from

- sympathetic varicosities. *Journal of Theoretical Biology* 226(3): 359–372. doi: 10.1016/j.jtbi.2003.09.014
36. Nichols CM, Povstyan OV, Albert AP et al. (2014) Vascular smooth muscle cells from small human omental arteries express P2X1 and P2X4 receptor subunits. *Purinergic Signalling* 10(4): 565–572. doi: 10.1007/s11302-014-9415-6
 37. Docherty JR (2010) Subtypes of functional α 1-adrenoceptor. *Cell. Mol. Life Sci.* 67(3): 405–417. doi: 10.1007/s00018-009-0174-4
 38. Högestätt ED (1984) Characterization of two different calcium entry pathways in small mesenteric arteries from rat. *Acta physiologica Scandinavica* 122(4): 483–495. doi: 10.1139/y00-041
 39. Skarby T, Hogestatt ED, Andersson KE (1985) Influence of extracellular calcium and nifedipine on alpha 1- and alpha 2-adrenoceptor-mediated contractile responses in isolated rat and cat cerebral and mesenteric arteries. *Acta physiologica Scandinavica* 123(4): 445–456. doi: 10.1111/j.1748-1716.1985.tb07611.x
 40. Brain KL, Jackson VM, Trout SJ et al. (2002) Intermittent ATP release from nerve terminals elicits focal smooth muscle Ca²⁺ transients in mouse vas deferens. *The Journal of Physiology* 541(3): 849–862. doi: 10.1113/jphysiol.2002.019612
 41. Yamaguchi J (1993) Spike generating smooth muscle cells in mesenteric artery of rats. *Pflügers Arch*: 187–189
 42. Brock JA, Dunn WR, Boyd NS et al. (2000) Spontaneous release of large packets of noradrenaline from sympathetic nerve terminals in rat mesenteric arteries in vitro. *British Journal of Pharmacology* 131(8): 1507–1511. doi: 10.1038/sj.bjp.0703733
 43. Mizuno Y, Isotani E, Huang J et al. (2008) Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle in vivo. *AJP: Cell Physiology* 295(2): C358–C364. doi: 10.1152/ajpcell.90645.2007
 44. Fameli N, van Breemen C, Kuo K-H (2007) A quantitative model for linking Na⁺/Ca²⁺ exchanger to SERCA during refilling of the sarcoplasmic reticulum to sustain [Ca²⁺] oscillations in vascular smooth muscle. *Cell Calcium* 42(6): 565–575. doi: 10.1016/j.ceca.2007.02.001
 45. FLOYD R, WRAY S (2007) Calcium transporters and signalling in smooth muscles. *Cell Calcium* 42(4-5): 467–476
 46. House SJ, Potier M, Bisailon J et al. (2008) The non-excitabile smooth muscle: Calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 456(5): 769–785. doi: 10.1007/s00424-008-0491-8
 47. Amberg GC, Navedo MF (2013) Calcium Dynamics in Vascular Smooth Muscle. *Microcirculation* 20(4): 281–289. doi: 10.1111/micc.12046
 48. Wier WG, Zang W-j, Lamont C et al. (2009) Sympathetic neurogenic Ca²⁺ signalling in rat arteries: ATP, noradrenaline and neuropeptide Y. *Experimental Physiology* 94(1): 31–37. doi: 10.1113/expphysiol.2008.043638
 49. Berridge MJ (2006) Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium* 40(5-6): 405–412. doi: 10.1016/j.ceca.2006.09.002
 50. Krishnamoorthy G, Sonkusare SK, Heppner TJ et al. (2014) Opposing roles of smooth muscle BK channels and ryanodine receptors in the regulation of nerve-evoked constriction of mesenteric resistance arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 306(7): H981-8
 51. Gonzales AL, Amberg GC, Earley S (2010) Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum is required for sustained TRPM4 activity in cerebral artery smooth muscle cells. *AJP: Cell Physiology* 299(2): C279–C288. doi: 10.1152/ajpcell.00550.2009

52. Pucovský V, Bolton TB (2006) Localisation, function and composition of primary Ca²⁺ spark discharge region in isolated smooth muscle cells from guinea-pig mesenteric arteries. *Cell Calcium* 39(2): 113–129. doi: 10.1016/j.ceca.2005.10.002
53. Quijano JC, Raynaud F, Nguyen D et al. (2016) Intercellular ultrafast Ca²⁺ wave in vascular smooth muscle cells: numerical and experimental study. *Sci Rep* 6: 31271. doi: 10.1038/srep31271
54. Khananshvili D (2013) The SLC8 gene family of sodium–calcium exchangers (NCX) – Structure, function, and regulation in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* 34(2-3): 220–235. doi: 10.1016/j.mam.2012.07.003
55. Török TL (2007) Electrogenic Na⁺/Ca²⁺-exchange of nerve and muscle cells. *Progress in Neurobiology* 82(6): 287–347. doi: 10.1016/j.pneurobio.2007.06.003
56. Ho W-SV, Davis AJ, Chadha PS et al. (2013) Effective contractile response to voltage-gated Na⁺ channels revealed by a channel activator. *Am J Physiol Cell Physiol* 304(8): C739-47. doi: 10.1152/ajpcell.00164.2012
57. Akolkar G, Pande J, Samson SE et al. (2012) Thapsigargin decreases the Na⁺- Ca²⁺ exchanger mediated Ca²⁺ entry in pig coronary artery smooth muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1818(3): 730–737. doi: 10.1016/j.bbamem.2011.11.037
58. Shmigol AV, Eisner DA, Wray S (1999) The role of the sarcoplasmic reticulum as a Ca²⁺ sink in rat uterine smooth muscle cells. *The Journal of Physiology* 520(1): 153–163. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.00153.x
59. Rahman M, Inman M, Kiss L et al. (2012) Reverse-mode NCX current in mouse airway smooth muscle: Na⁺ and voltage dependence, contributions to Ca²⁺ influx and contraction, and altered expression in a model of allergen-induced hyperresponsiveness. *Acta Physiol* 205(2): 279–291. doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02401.x
60. Dreja K, Nordström I, Hellstrand P (2001) Rat arterial smooth muscle devoid of ryanodine receptor function: effects on cellular Ca²⁺ handling. *British Journal of Pharmacology* 132(8): 1957–1966. doi: 10.1038/sj.bjp.0703986
61. Schuster S, Marhl M, Höfer T (2002) Modelling of simple and complex calcium oscillations. *European Journal of Biochemistry* 269(5): 1333–1355. doi: 10.1046/j.0014-2956.2001.02720.x
62. Clarke CJ, Forman S, Pritchett J et al. (2008) Phospholipase C-delta1 modulates sustained contraction of rat mesenteric small arteries in response to noradrenaline, but not endothelin-1. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295(2): H826-34. doi: 10.1152/ajpheart.01396.2007.
63. Rhee SG (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 281–312. doi: 10.1146/annurev.biochem.70.1.281
64. Matchkov VV, Aalkjaer C, Nilsson H (2004) A cyclic GMP-dependent calcium-activated chloride current in smooth-muscle cells from rat mesenteric resistance arteries. *J. Gen. Physiol.* 123(2): 121–134. doi: 10.1085/jgp.200308972
65. Jacobsen J, Aalkjaer C, Nilsson H et al. (2007) A model of smooth muscle cell synchronization in the arterial wall. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 293(1): H229-H237. doi: 10.1152/ajpheart.00727.2006
66. Chaytor AT, Evans WH, Griffith TM et al. (1997) Peptides Homologous to Extracellular Loop Motifs of Connexin 43 Reversibly Abolish Rhythmic Contractile Activity in Rabbit Arteries. *The Journal of Physiology* 503(1): 99–110. doi: 10.1111/j.1469-7793.1997.099bi.x

67. Wit C de, Roos F, Bolz S-S et al. (2003) Lack of vascular connexin 40 is associated with hypertension and irregular arteriolar vasomotion. *Physiol. Genomics* 13(2): 169–177. doi: 10.1152/physiolgenomics.00169.2002
68. Gustafsson H (1993) Vasomotion and underlying mechanisms in small arteries. An in vitro study of rat blood vessels. *Acta physiologica Scandinavica* 2(614): 1–44
69. Rahman A, Matchkov V, Nilsson H et al. (2005) Effects of cGMP on coordination of vascular smooth muscle cells of rat mesenteric small arteries. *J Vasc Res* 42(4): 301–311. doi: 10.1159/000086002
70. McNeish AJ, Altayo FJ, Garland CJ (2010) Evidence both L-type and non-L-type voltage-dependent calcium channels contribute to cerebral artery vasospasm following loss of NO in the rat. *Vascul. Pharmacol.* 53(3-4): 151–159. doi: 10.1016/j.vph.2010.06.002
71. Harhun MI (2015) Mitochondrial Ca(2)(+) handling is crucial for generation of rhythmical Ca(2)(+) waves in vascular interstitial cells from rabbit portal vein. *Cell Calcium* 58(3): 325–329. doi: 10.1016/j.ceca.2015.06.001
72. Bülbring E, Shuba MF (eds) (1976) *Physiology of smooth muscle: Theory of P and T systems for calcium activation in smooth muscle.* Raven Press, New York
73. Mulvany MJ, Halpern W (1977) Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation Research* 41(1): 19–26. doi: 10.1161/01.RES.41.1.19
74. Verlohren S (2005) *Der Einfluss des periadventitiellen Fettgewebes auf die Kontraktilität von Arterien der Ratte.* Dissertation, Universitätsmedizin Berlin
75. Nelson MT, Quayle JM (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 268(4): C799-C822
76. Southan C, Sharman JL, Benson HE et al. (2016) The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY in 2016: towards curated quantitative interactions between 1300 protein targets and 6000 ligands. *Nucleic Acids Res* 44(D1): D1054-D1068. doi: 10.1093/nar/gkv1037
77. Alexander S, Fabbro D, Kelly E et al. (2015) The Concise Guide to Pharmacology 2015/16: Enzymes. *British Journal of Pharmacology* 172: 6024–6109
78. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP et al. (2015) Voltage-gated calcium channels: Cav1.2. <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/ObjectDisplayForward?objectId=529>. Accessed 01 Sep 2016
79. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG (2016) Voltage-gated sodium channels, introduction. <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyIntroductionForward?familyId=82>. Accessed 15 Dec 2016
80. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG (2015) Voltage-gated sodium channels: Nav1.7. <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/ObjectDisplayForward?objectId=584>. Accessed 01 Sep 2016
81. Berra-Romani R, Blaustein M, Matteson D (2005) TTX-sensitive voltage-gated Na⁺ channels are expressed in mesenteric artery smooth muscle cells. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 289(1): H137-H145. doi: 10.1152/ajpheart.01156.2004
82. Lamont C, Vainorius E, Wier WG (2003) Purinergic and adrenergic Ca²⁺ transients during neurogenic contractions of rat mesenteric small arteries. *The Journal of Physiology* 549(3): 801–808. doi: 10.1113/jphysiol.2003.043380

83. VanBavel E, Wesselman, J. P. M., Spaan, J. A. E. (1998) Myogenic Activation and Calcium Sensitivity of Cannulated Rat Mesenteric Small Arteries. *Circulation Research* 82(2): 210–220. doi: 10.1161/01.RES.82.2.210
84. Dunn WR, Daly CJ, McGrath JC et al. (1991) The effects of nifedipine on alpha 2-adrenoceptor-mediated contractions in several isolated blood vessels from the rabbit. *Br J Pharmacol.* 103(2): 1493–1499
85. Hayashida N, Okui K, Fukuda Y (1986) Mechanism of spontaneous rhythmic contraction in isolated rat large artery. *Jpn. J. Physiol.* 36(4): 783–794
86. Mauban J, Lamont C, Balke CW et al. (2000) Adrenergic stimulation of rat resistance arteries affects Ca²⁺ sparks, Ca²⁺ waves, and Ca²⁺ oscillations. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280(5): H2399-H2405
87. Wu L, Wang Z, Wang R (2000) Tetraethylammonium-evoked oscillatory contractions of rat tail artery: a K-K model. *Can J Physiol Pharmacol* 78(9): 696–707
88. Young AR, Saveland H, Pickard JD et al. (1987) Early Effects of Tetraethylammonium Chloride on the Contractile Properties of Isolated Rabbit Basilar Arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 7(2): 237–247
89. Osol G, Halpern W (1998) Spontaneous vasomotion in pressurized cerebral arteries from genetically hypertensive rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 254(1): H28-H33
90. Philipp M, Brede M, Hein L (2002) Physiological significance of alpha(2)-adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283(2): R287-95. doi: 10.1152/ajpregu.00123.2002
91. Lavidis NA, Bennett MR (1992) Probabilistic secretion of quanta from visualized sympathetic nerve varicosities in mouse vas deferens. *The Journal of Physiology*(454): 9–26
92. Dunn WR, WELLMAN GC, Bevan JA (1994) Enhanced resistance artery sensitivity to agonists under isobaric compared with isometric conditions. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 266(1): H147-H155
93. Qiu HY, Valtier B, Struyker-Boudier HA et al. (1995) Mechanical and contractile properties of in situ localized mesenteric arteries in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 33(3): 159–170. doi: 10.1016/1056-8719(94)00076-G
94. Fort A, Cordailat M, Thollon C et al. (2009) New Insights in the Contribution of Voltage-Gated Nav Channels to Rat Aorta Contraction. *PLoS ONE* 4(10): e7360. doi: 10.1371/journal.pone.0007360
95. Zang W-j, Zacharia J, Lamont C et al. (2006) Sympathetically evoked Ca²⁺ signaling in arterial smooth muscle. *Acta Pharmacol Sin* 27(12): 1515–1525. doi: 10.1111/j.1745-7254.2006.00465.x
96. Hasibeder W (2010) Gastrointestinal microcirculation: still a mystery? *British Journal of Anaesthesia* 105(4): 393–396. doi: 10.1093/bja/aeq236
97. Immink W, Beijer H, Charbon GA (1976) Hemodynamic effects of norepinephrine and isoprenaline in various regions of the canine splanchnic area. *Pflugers Arch. (Pflugers Archiv European Journal of Physiology)* 365(2-3): 107–118. doi: 10.1007/BF01067007
98. Bevan J, Oriowo M, Bevan R (1986) Physiological variation in alpha-adrenoceptor-mediated arterial sensitivity: relation to agonist affinity. *SCIENCE* 234(4773): 196–197
99. Oriowo MA, Bevan JA, Bevan RD (1987) Variation in sensitivity of alpha adrenoceptor-mediated contraction of the vascular smooth muscle of rabbit elastic and muscular

- arteries is related to receptor affinity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 241(1): 239–244
100. Westcott EB, Segal SS (2013) Ageing alters perivascular nerve function of mouse mesenteric arteries in vivo. *The Journal of Physiology* 591(5): 1251–1263
 101. Droogmans G (1977) Electro- and pharmacomechanical coupling in the smooth muscle cells of the rabbit ear artery. *J. Gen. Physiol.* 70(2): 129–148
 102. Hirst GD, Silverberg GD, van Helden, D F (1986) The action potential and underlying ionic currents in proximal rat middle cerebral arterioles. *The Journal of Physiology* 371(1): 289–304
 103. Kannan MS, DANIEL EE (1978) FORMATION OF GAP JUNCTIONS BY TREATMENT IN VITRO WITH POTASSIUM CONDUCTANCE BLOCKERS. *J. CELL BIOLOGY*
 104. Watts SW, Tsai M-L, Loch-Carusio R et al. (1994) Gap Junctional Communication and Vascular Smooth Muscle Reactivity: Use of Tetraethylammonium Chloride. *J Vasc Res* 31(5): 307–313
 105. Bertuglia S, Colantuoni A, Intaglietta M (1994) Effects of L-NMMA and indomethacin on arteriolar vasomotion in skeletal muscle microcirculation of conscious and anesthetized hamsters. *Microvasc Res* 48(1): 68–84. doi: 10.1006/mvre.1994.1039
 106. Brown L, Key B, Lovick T (2002) Inhibition of vasomotion in hippocampal cerebral arterioles during increases in neuronal activity. *Autonomic Neuroscience* 95(1-2): 137–140
 107. Fujii K, Heistad DD, Faraci FM (1990) Ionic mechanisms in spontaneous vasomotion of the rat basilar artery in vivo. *The Journal of Physiology* 430(1): 389–398
 108. Koenigsberger M, Sauser R, Bény J-L et al. (2006) Effects of Arterial Wall Stress on Vasomotion. *Biophysical Journal* 91(5): 1663–1674. doi: 10.1529/biophysj.106.083311
 109. Msghina M, Gonon F, Stjarne L (1995) A novel electrophysiological approach to monitor pulse by pulse the concentration of released noradrenaline at the presynaptic ? : 2-adrenoceptors of sympathetic nerves in rat tail artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 351(2). doi: 10.1007/BF00169331
 110. Patejdl R, Noack T (2010) The propagation of excitation in portal vein smooth muscle – evidence for coupled “Hot Spots”. *TE* 27(10): 202–208. doi: 10.5414/TEP27202

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

ATP	- Adenosintriphosphat
BK – Kanal	- calciumabhängiger Kaliumkanal
Ca _v	- spannungsabhängiger Calciumkanal
cGMP	- zyklisches Guanosinmonophosphat
DAG	- Diacylglycerin
EDTA	- Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	- elektrische Feldstimulation
HEPES	- 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure Puffer
IP ₃	- Inositoltriphosphat
IP ₃ R	- Inositoltriphosphat Rezeptor
L - Typ Ca kanal	- „long lasting“ spannungsabhängiger Calciumkanal
NA / NE	- Noradrenalin / Norephedrin
Na _v	- spannungsabhängiger Natriumkanal
P2X R	- ligandengesteuerter Ionenkanal Rezeptor für Adenosintriphosphat
PKG	- Proteinkinase G
PLC	- Phospholipase C
RyR	- Ryanodinrezeptor
SERCA	- Calcium ATPase des endoplasmatischen bzw. sarkoplasmatischen Retikulums
SR / ER	- sarkoplasmatisches / endoplasmatisches Retikulum
TEA	- Tetraethylammonium
TTX	- Tetrodotoxin
α _{1/2} R	- adrenerger Rezeptor

6.2 Verwendung des Anstieges zur Beschreibung der Kontraktionskinetik

In Voruntersuchungen zeigte sich, dass die modellhafte Darstellung der Kontraktionen durch nervale Reize durch die Überlagerung zweier Exponentialfunktionen nicht darstellbar war. Am Beispiel der EFS Kontraktionen kam es vor allem im aufsteigenden Schenkel zu keiner hinreichenden Übereinstimmung mit der Originalkontraktion. Der originale Kurvenverlauf implizierte vielmehr eine Funktion höheren Grades mit zusätzlichen konstanten Parametern als Grundlage. Die Verwendung von Zeitkonstanten zur Beschreibung von Exponentialfunktionen war unter diesem Aspekt nicht möglich. Um die Ergebnisse dieser experimentellen Arbeit nicht auf weiteren theoretischen Annahmen zu begründen, wurde zur Charakterisierung der Kontraktionskinetik die Bestimmung des Anstieges vorgenommen, errechnet vom Kontraktionsbeginn bis zum Erreichen des Maximalwertes.

6.3 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Hamburg den 28.03.2018

Kevin Paul

6.4 Veröffentlichungen

Vorträge:

K.Paul, Th. Noack: phasic activity and spontaneous activity of smooth muscles in resistance vessels; Treffen der Ostseephysiologen, Greifswald, 2013

K.Paul, R. Patejdl, Th. Noack: Phasic contractile activity in rat mesenteric arteries is due to cyclic release of noradrenaline from nerve varicosities; Treffen der Ostseephysiologen, Lübeck, 2014

Poster:

K.Paul, R. Patejdl, Th. Noack: Phasic contractile activity in rat mesenteric arteries is due to cyclic release of noradrenaline from nerve varicosities; Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Mainz 2014

K.Paul, R. Patejdl, Th. Noack: Hyperstimulation of vascular nerve varicosities can induce tetrodotoxin- but not nifedipine-resistant contractions in rat mesenteric arteries; Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Magdeburg 2015

Paper:

Kevin Paul, Imke Jaborg, Robert Patejdl, and Thomas Noack: Induction of a non-coherent relationship between intracellular calcium and contractile force in arterial smooth muscle by treatment with (-) BAY K 8644; Trace Elements and Electrolytes, Vol 32 No. 4/2015 (184-191)

6.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum 5. Februar 1991
Geburtsort Rostock

Akademische Laufbahn

1997 – 2001	1. bis 4. Klasse	<i>Grundschule Schwaan</i>
2001 – 2006	5. bis 9. Klasse	<i>Friderico – Francisceum Gymnasium Bad Doberan</i>
2006 – 2010	10. Klasse bis Abitur	<i>CJD Christophorusgymnasium, Rostock</i>
2010 – 2016	Staatsexamen Humanmedizin	<i>Universität Rostock</i>

Berufliche Laufbahn

2017 – heute **Facharztausbildung** *Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf*
Klinik u. Poliklinik für Kinder u. Jugendmedizin

6.6 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle recht herzlich bei Prof. Dr. T. Noack bedanken, der die Bearbeitung dieses Themas im Rahmen einer Doktorarbeit ermöglichte. Der zu jederzeit verfügbare Rat in fachlichen und methodischen Fragen, sowie die vielen anregenden Diskussionen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich bedanke mich vielmals für die geweckte Begeisterung für experimentelle Grundlagenforschung, die mich auch in der Zukunft begleiten wird.

Auch gilt mein Dank den weiteren Mitarbeitern des Institutes für Physiologie, insbesondere Dr. Robert Patejdl für inhaltliche und methodische Anregungen sowie Tina Sellmann und Katrin Porath für ihr offenes Ohr bei technischen Fragen.

Weiterhin danke ich meiner Lebensgefährtin und meinen Eltern für all die kleinen und großen Hilfestellungen während meiner Ausbildung und der Bearbeitung dieser Arbeit.

7 Thesen

1. Am Beispielpräparat der Mesenterialarterie der Ratte wurde in dieser Arbeit die Bedeutung des zellulären Netzwerkes zur Entstehung autonomer, zeitlich variabler Kontraktionen im Bereich der Mikrozirkulation untersucht.
2. Durch TEA in einer Konzentration von 10^{-2} mol/l konnten phasische und tonische Kontraktionen erzeugt werden. Als Wirkmechanismen werden sowohl die Störung der Repolarisation als auch die Erhöhung der interzellulären Leitfähigkeit angesehen.
3. Das Auftreten phasischer Aktivität in Abhängigkeit der TEA Konzentration ließ sich nicht durch die Gabe von Indomethacin beeinflussen. Ein Einfluss von endothelial produziertem Prostaglandin auf die TEA – Schwellenkonzentration zur Initiierung phasischer Aktivität ist daher unwahrscheinlich.
4. Die Charakteristik phasischer Aktivität ist ein fortschreitender Prozess an deren Ende der Übergang in tonische Aktivität steht.
5. Auf Grund der Nifedipinsensitivität von phasischer und tonischer Aktivität konnte für beide Kontraktionsformen eine Abhängigkeit vom Einstrom extrazellulären Calciums durch Ca_v – Kanäle gezeigt werden.
6. Kontraktionen phasischer Aktivität und durch EFS Reizung ausgelöste, transmittervermittelte Kontraktionen weisen eine vergleichbare Kinetik auf.
7. Die TTX Sensitivität sowohl phasischer als auch tonischer Aktivität stellte die essentielle Rolle von Na_v – Kanälen zum Erhalt dieser Kontraktionsformen heraus.
8. Die spezifische Wirkung von TTX an Na_v – Kanälen der perivaskulären vegetativen Nerven weist dabei auf eine oszillierende Transmitterfreisetzung der Varikositäten als Ursache phasischer Kontraktionen hin.
9. Das variierende Ansprechen verschiedener Präparate auf Noradrenalin und EFS – Reizung bei konstanten Kontraktionen nach direkter muskulärer Reizung, durch Gabe kaliumreicher Lösung, demonstrierte die individuelle räumliche Auflösung von Varikositäten und postsynaptischer Rezeptoren im Bereich des mesenterialen Stromgebietes.

10. Die durchschnittliche Amplitude phasischer Aktivität weist den größten Zusammenhang mit der direkten Aktivierung glatter Muskelzellen durch kaliumreiche Lösung auf. Die Möglichkeit der Ausbreitung lokal erzeugter Reize über das glattmuskuläre Netzwerk und sekundärer, synchroner Kontraktion der erregten Muskelzellen ist daher wahrscheinlicher als eine synchronisierte Aktivität mehrerer Schrittmacher.