

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Rostock

Direktor : Prof. Dr. R. Köhling

Funktionelle Relevanz der Stromkomponenten einzelner
Myozyten für die elektrische Spike-Aktivität des glatten Muskels
der Portalvene



Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Medizin“

der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Robert Patejdl
aus Rostock

Rostock, 2009

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Noack, Institut für Physiologie, Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff, Klinik für Chirurgie, Universität Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Fritz Markwardt, Institut für Physiologie, Universität Halle

Datum der Verteidigung: 09.12.2009

1 STAND DER WISSENSCHAFT, EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
1.1 PHYSIOLOGIE UND PHARMAKOLOGIE DER PORTALVENE DER RATTE (RPV)	2
1.1.1 <i>Die mechanische Spontanaktivität und ihre pharmakologische Modulation</i>	3
1.1.2 <i>Ursprung und Charakteristika der elektrischen Spontanaktivität</i>	5
1.1.2.1 Intrazelluläre Messungen der Spontanaktivität	6
1.1.2.2 Extrazelluläre Messungen der Spontanaktivität	7
1.1.2.3 Ausbreitung der elektrischen Erregung	7
1.1.3 <i>Mathematische Modellierung elektrischer Erregung der glatten Muskulatur</i>	8
1.1.4 <i>Ionenströme und Ionenkanäle der RPV</i>	10
1.1.4.1 Kalziumströme	10
1.1.4.2 Spannungs- und kalziumabhängige Kaliumauswärtsströme	11
1.1.4.3 Hintergrundströme ohne Zeitabhängigkeit	14
1.2 FRAGESTELLUNG UND METHODISCHER ANSATZ	15
2 METHODEN	16
2.1 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN	16
2.1.1 <i>Extrazelluläre Elektrik</i>	17
2.1.2 <i>Intrazelluläre Mikroelektrode – Stromklemme</i>	17
2.1.3 <i>Patch-Clamp-Technik – Spannungsklemme</i>	19
2.2 EXPERIMENTE	20
2.2.1 <i>Organpräparation und Ablauf der Messungen</i>	20
2.2.2 <i>Lösungen und Substanzen</i>	21
2.2.3 <i>4-Aminopyridin – 4-AP</i>	22
2.2.4 <i>Tetraethylammonium – TEA</i>	22
2.2.5 <i>Charybdotoxin</i>	22
2.2.6 <i>Apamin</i>	23
2.2.7 <i>Messplatz und Instrumente</i>	23
2.2.8 <i>Aufbereitung des Datenmaterials</i>	24
2.2.9 <i>Ergebnisdarstellung und Auswertung</i>	25
3 ERGEBNISSE	26
3.1 MODELLBILDUNG	26
3.1.1 <i>Darstellung intrazellulär registrierter Spontanaktivität</i>	26
3.1.2 <i>Ermittlung des kapazitiven Stromes während schneller Spikes</i>	28
3.1.3 <i>Interpretation des kapazitiven Stroms</i>	32
3.1.4 <i>Rekonstruktion des Gesamtstroms</i>	34
3.1.4.1 Kalziumstrom	35
3.1.4.2 Auswärtsströme	42
3.1.4.3 Der nicht-inaktivierende Hintergrundstrom I_{NI}	47
3.1.4.4 Erklärungskraft der summierten Modellstromkomponenten	49
3.1.5 <i>Simulationen der Kalziumkonzentration</i>	52
3.2 PHARMAKOLOGISCHE BEEINFLUSSUNG DER SPONTANAKTIVITÄT	54
3.2.1 <i>Native Messungen</i>	54
3.2.2 <i>Effekte von TEA</i>	58
3.2.2.1 mechanische Veränderungen	58
3.2.2.2 elektrische Veränderungen	59
3.2.3 <i>Effekte von Charybdotoxin</i>	60
3.2.3.1 mechanische Veränderungen	60
3.2.3.2 elektrische Veränderungen	61
3.2.4 <i>Wirkung von 4-AP</i>	62
3.2.4.1 mechanische Veränderungen	62
3.2.4.2 elektrische Veränderungen	63
3.2.5 <i>Effekte von Apamin</i>	64
3.2.5.1 mechanische Veränderungen	64
3.2.5.2 elektrische Veränderungen	65
4 DISKUSSION	66
4.1 ERGEBNISSE DER MODELLBILDUNG	66
4.1.1 <i>Methodische Gründe für die Entstehung des unerklärten Differenzstroms</i>	66

4.1.1.1	Abweichungen durch das Verfahren der Berechnung von I_M	66
4.1.1.2	Abweichungen der Modellstromkomponenten	70
4.1.2	<i>Stromkomponenten und ihre Bedeutung im Rahmen der MSC</i>	71
4.1.2.1	I_{CaL}	71
4.1.2.2	I_{TO}	74
4.1.2.3	I_{NI}	77
4.1.2.4	Der unerklärte Reststrom I_x	78
4.2	EFFEKTE VON KALIUMKANALBLOCKERN AUF DIE SPONTANAKTIVITÄT	79
4.3	DAS ZUSAMMENWIRKEN DER STROMKOMPONENTEN WÄHREND SCHNELLER SPIKES.....	81
5	ZUSAMMENFASSUNG	82
6	LITERATUR	84
7	ANHANG	95
7.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	95
7.2	ERGÄNZENDE MATERIALIEN ZUM HAUPTTEXT	96
7.2.1	<i>Pharmakologie der RPV</i>	96
7.2.2	<i>Die Strom-Spannungsbeziehung von I_{CaL} und gemessenen Strömen</i>	97
7.2.3	<i>Transformation der Rohdaten zum Spannungsverlauf</i>	98
7.2.4	<i>Parameter der Aktivierung und Inaktivierung von I_{Tof} und I_{ToS}</i>	99
7.2.5	<i>Modellierung von Änderungen der Kalziumkonzentration</i>	100
7.2.6	<i>Effekte von Kaliumkanalblockern auf die mechanische Spontanaktivität der RPV</i>	104
7.3	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	105
7.4	LEBENSLAUF	107
7.5	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG / EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG NACH § 4 ABS. 2.5.....	108
7.6	DANKSAGUNG	109
8	THESEN.....	110

Abbildungen und Tabellen:

Abbildungen:

- 1.1: Parallele Registrierung der spontanen mechanischen und extrazellulär abgeleiteten elektrischen Aktivität der RPV
- 1.2: Schematische Darstellung der engen räumlichen Nachbarschaft zwischen L-Typ-Kalziumkanälen „L- Ca^{2+} “ und kalziumabhängigen Kaliumkanälen „BK $_{(Ca^{2+})}$ “ in der Membran.
- 2.1: Schematischer Aufbau einer Messung mit intrazellulärer Mikroelektrode.
- 2.2: Schematischer Aufbau einer Patch-Clamp-Spannungsklemme.
- 2.3: Schematische Darstellung des zur Messung von mechanischer und extrazellulärer elektrischer Spontanaktivität der RPV verwendeten Apparates.
- 3.1: Sequenz von 3 typischen MSC der RPV, intrazelluläre Ableitung.
- 3.2: Darstellung eines einzelnen MSC der RPV, intrazelluläre Ableitung.
- 3.3: Zeitlich hoch aufgelöster Verlauf eines monophasisch repolarisierenden schnellen Spikes.
- 3.4 Zeitlich hoch aufgelöster Verlauf eines triphasisch repolarisierenden schnellen Spikes.
- 3.5: Verlauf des kapazitiven Stroms während des in Abb. 3.4 gezeigten Spikes
- 3.6: Schematische Darstellung des Modells der Ströme der RPV.

- 3.7: Spannungsabhängigkeit der Steady-State Aktivierung und Inaktivierung von I_{CaL} .
- 3.8: Zusammenfassende grafische Darstellung der Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten von I_{CaL} .
- 3.9: Serie von Stromkurven für den ICaL-Modellstrom.
- 3.10: Verlauf von Aktivierung, Inaktivierung des Kalziumstroms sowie des Produkts während des in Abb. 3.4 gezeigten schnellen Spikes.
- 3.11: Verlauf von I_{CaL} während des in Abb. 3.4 gezeigten schnellen Spikes.
- 3.12: Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten spannungsabhängiger Auswärtsströme der Modellströme.
- 3.13: Errechnete Verläufe der summierten Modellströme I_{TOs} und I_{TOf} nach Applikation einer Serie von Testpulsen.
- 3.14: Aktivierung („c“) und Inaktivierung („d“) des langsamen spannungsabhängigen Modellstroms I_{TOs} sowie des Produktes beider Parameter („c*d“) während des in Abb. 3.4 gezeigten schnellen Spikes.
- 3.15: Aktivierung („e“) und Inaktivierung („f“) des schnellen spannungsabhängigen Modellstroms I_{TOf} sowie des Produktes beider Parameter („e*f“) während des in Abb. 3.4 gezeigten schnellen Spikes.
- 3.16 Verlauf der summierten Modellströme I_{TOs} und I_{TOf} während des in Abb. 3.4 gezeigten triphasischen schnellen Spikes.
- 3.17: Strom-Spannungsbeziehung der Modellkomponente I_{NI} .
- 3.18: Verlauf und Erklärungskraft von I_{NI} für den nach Abzug des notwendigen Einwärtsstroms verbleibenden unerklärten Auswärtsstrom.
- 3.19: Summe von I_{TOs} , I_{TOf} und I_{CaL} , subtrahiert von I_M und der sich ergebende Strom I_x .
- 3.20: Strom-Spannungsbeziehung des unerklärten Auswärtsstromes I_x während des in Abb. 3.4 gezeigten schnellen Spikes.
- 3.21: Simulierter Verlauf der Kalziumkonzentration im submembranösen Raum während eines typischen MSC.
- 3.22: Verlauf der Kalziumkonzentration in einer submembranösen Mikrodomäne während eines schnellen Spikes
- 3.23: Extrazellulär abgeleitete spontane MSC und Kontraktionen der RPV.
- 3.24: Gegenüberstellung extrazellulär und intrazellulär abgeleiteter schneller elektrischer Aktivität während des MSC.
- 3.25: Frequenzspektrum der extrazellulär abgeleiteten elektrischen Aktivität.
- 3.26: Mechanische Effekte von TEA.
- 3.27: Elektrische Effekte von TEA.
- 3.28: Mechanische Effekte von CTX.
- 3.29: Elektrische Effekte von CTX.

- 3.30: Mechanische Effekte von 4-AP.
- 3.31: Elektrische Effekte von 4-AP.
- 4.1: Ausbreitung der Multi-Spike-Komplexe entlang der Längsachse der RPV.
- 4.2: Aktivierung und Inaktivierung von I_{CaL} im MSC-Verlauf.
- 4.3: Aktivierung und Inaktivierung von I_{Tof} im MSC-Verlauf.
- 4.4: Aktivierung und Inaktivierung von I_{ToS} im MSC-Verlauf.
- 4.5: Abhängigkeit der Öffnungswahrscheinlichkeit kalziumabhängiger Kaliumkanäle großer Leitfähigkeit vom Membranpotenzial und der Kalziumkonzentration.
- 7.1 Die Strom-Spannungsbeziehung von I_{CaL} im Vergleich mit publizierten Daten.
- 7.2: MSC-Verlauf nach Rohdaten und nach Anwendung der Spreizungsfunktion.
- 7.3: Steady-State Aktivierung und Inaktivierung von I_{ToS} .
- 7.4: Steady-State Aktivierung und Inaktivierung von I_{Tof} .
- 7.5: Modellberechnung der $[Ca^{2+}]$ im submembranösen Kompartiment während eines MSC in Abhängigkeit vom Volumen des submembranösen Kompartiments.
- 7.6: Modellberechnung der $[Ca^{2+}]$ im submembranösen Kompartiment während eines MSC in Abhängigkeit von der Diffusionsrate.

Tabellen:

- 3.1: Variablen zur Errechnung der Zeitkonstanten der Aktivierung und Inaktivierung von I_{CaL} in Abhängigkeit vom Membranpotenzial
- 3.2: Werte der halbmaximal aktivierenden- bzw. inaktivierenden Spannungen für I_{ToS} und I_{Tof} .
- 3.3: Variablen zur Errechnung der Zeitkonstanten der Aktivierung und Inaktivierung von I_{CaL} .
- 3.4: Mechanische Effekte von TEA.
- 3.5: Mechanische Effekte von CTX.
- 3.6: Mechanische Effekte von 4-AP.
- 7.1: Publizierte Daten zu Effekten verschiedener Pharmaka auf die elektrische und mechanische Spontanaktivität der RPV.
- 7.2: Darstellung der Signifikanzen der Dosisabhängigkeit des Effekts von TEA.
- 7.3: Darstellung der Signifikanzen der Dosisabhängigkeit des Effekts von CTX.
- 7.4: Darstellung der Signifikanzen der Dosisabhängigkeit des Effekts von TEA.

1 Stand der Wissenschaft, Einleitung und Fragestellung

Spontane Kontraktionen treten in einer Vielzahl verschiedener glattmuskulärer Organe auf und sind Grundlage lebenswichtiger Stofftransport- und Austauschprozesse. Das Spektrum der auf Spontanaktivität beruhenden Prozesse reicht vom enteralen Nahrungstransport bis hin zur Kontrolle über die Mikrozirkulation mittels rhythmischer Kontraktionen von Arteriolen, Kapillaren und Lymphgefäßen [1]. Störungen der genannten Prozesse sind praktisch immer gleichbedeutend mit krankhaften Veränderungen des gesamten Organismus (z.B. paralytischer Ileus, portale und arterielle Hypertension, cerebrale oder koronare Vasospasmen) und oftmals auf längere Sicht mit schweren Funktionsstörungen des gesamten Organismus verbunden [2-6].

Die Spontanaktivität der glatten Muskulatur ist daher von hoher klinischer Relevanz, entsprechend ist ein gutes Verständnis der zu Grunde liegenden biologischen Prozesse wünschenswert. Die existierenden Konzepte zu den Grundlagen physiologischer Spontanaktivität weisen jedoch Lücken auf [7].

Eines der am besten untersuchten spontan aktiven glattmuskulären Organe ist die Portalvene der Ratte (RPV). Pharmakologisch und elektrophysiologisch vereint diese Eigenschaften von intestinalem und venösem glattem Muskel. Durch phasische Kontraktionen befördert die glatte Muskulatur der RPV Blut aus dem intestinalen Stromgebiet zur Leber und damit letztlich in die systemische Zirkulation [8].

Ausgelöst werden diese Kontraktionen durch spontan auftretende elektrische Entladungen in Form sogenannter *Multi – Spike – Komplexe* (MSCs). Diese bestehen aus Serien von schnellen Membrandepolarisationen („*fast spikes*“), die in langsamere Depolarisationen („*slow waves*“) eingelagert sind.

Eine Vielzahl von experimentellen Studien befasst sich mit der pharmakologischen Beeinflussung der Spontanaktivität des glatten Muskels. Allerdings existieren bislang keine Studien, die sich mit der Frage befassen, in welcher Weise die bekannten Ionenströme und Ionenkanäle zusammenwirken, um das physiologische Muster der elektrischen Spontanaktivität zu generieren. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, am Beispiel der RPV für ein zentrales Element der Spontanaktivität, den schnellen Spike, diese Lücke zu schließen.

Im Folgenden sollen zunächst wesentliche Eigenschaften der RPV und ihrer Spontanaktivität erläutert werden. Anschließend wird ein Überblick zu den derzeit bekannten Ionenströmen und -kanälen der RPV und ihrer pharmakologischen Beeinflussbarkeit gegeben. Abschließend wird der zur Bearbeitung der Fragestellung gewählte theoretische Ansatz vorgestellt.

1.1 Physiologie und Pharmakologie der Portalvene der Ratte (RPV)

Ein wesentliches Merkmal vieler glattmuskulärer Organe – unter anderem der RPV – ist die Steuerung der Kontraktionen durch spontane elektrische Aktivität. Die Vermittlung zwischen elektrischer Erregung und mechanischer Kontraktion erfolgt durch den Einstrom von Kalziumionen während der Phase elektrischer Aktivität. Dieser Einstrom bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]$ und initiiert somit die molekularen Prozesse, die zur mechanischen Kraftentwicklung führen [9].

Die ausgeprägte Abhängigkeit ihrer Kontraktionen vom Einstrom extrazellulärer Kalziumionen unterscheidet die RPV von Präparaten, in denen die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern den wesentlichen Beitrag zur Erhöhung von $[Ca^{2+}]$ liefert. Experimentell gab es hierfür bereits in frühen pharmakologischen Studien Hinweise [10]. In jüngerer Zeit konnte auch mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen gezeigt werden, dass die Erhöhung von $[Ca^{2+}]$ deutlich besser mit dem Einstrom von extrazellulär als mit einer Kopplung der elektrischen Aktivität an die Ausschüttung von Kalzium aus intrazellulären Speichern korreliert [11].

In Abhängigkeit vom betrachteten Präparat nehmen zusätzlich Veränderungen des extrazellulären Milieus, Botenstoffe und mechanische Reize in unterschiedlichem Ausmaß Einfluss auf die Kontraktion der glatten Muskulatur und sind auf verschiedenen Wegen mit ihren molekularen Mechanismen verknüpft.

Neben der Erhöhung der $[Ca^{2+}]$ sind die wichtigsten bisher identifizierten Stellgrößen die Kalziumsensitivität der Myosin-Leichtkettenkinase (MLCK) sowie die Aktivität der Myosin-Leichtkettenphosphatase (MLCP). Bekannt ist weiterhin die Veränderung der Aktivitäten beider Enzyme zu Gunsten der Relaxation durch cAMP – abhängige Phosphorylierung. Zahlreiche weitere Elemente der Signaltransduktion sind Gegenstand intensiver Forschung. In jüngerer Zeit wurden neben der MLCK mehrere weitere Proteinkinasen identifiziert, die an der Aktivierung von Myosin beteiligt sind.

Übersichtsarbeiten zur Regulation der kontraktilen Proteine im glatten Muskel bieten [12-16].

Im Fall der spontanen Aktivität der RPV dominiert eindeutig die Steuerung der Kontraktion durch elektrische Spontanaktivität und den durch diese vermittelten Einstrom von Kalzium [8]. Daraus folgt, dass die in experimentellen pharmakologischen Studien an diesem Präparat beobachteten Veränderungen der mechanischen Aktivität auf einer Interaktion der eingesetzten Substanzen mit den an der elektrischen Erregungsbildung beteiligten Ionenkanälen zurückzuführen sind und damit Rückschlüsse auf selbige zulassen.

1.1.1 Die mechanische Spontanaktivität und ihre pharmakologische Modulation

Direkt nach Präparation und Entnahme der RPV und Überführung in eine kalziumhaltige physiologische Lösung zeigen sich spontane Kontraktionen, die bei ausreichend großen Präparaten mit bloßem Auge direkt sichtbar sind. Beschreibungen dieser Aktivität an der RPV geben unter anderem Funaki und Bohr [17], Johansson und Ljung [18] sowie Voth et al. [19]. Exemplarisch gibt Abb. 1.1 einen kurzen Ausschnitt aus einer im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeföhrten Registrierung der elektrischen und mechanischen Aktivität.



Abb.1.1: Parallel Registrierung der spontanen mechanischen und extrazellulär abgeleiteten elektrischen Aktivität der RPV. Obere Kurve: Extrazelluläre Elektrik. Untere Kurve: Mechanik. Eichungen der Ordinaten und der Zeitachse wie in der Abbildung angegeben.

Die Amplitude der einzelnen Kontraktionen ist unter anderem von der Größe des jeweiligen Präparates abhängig und liegt meist zwischen 5 und 15 mN. Die Spontanaktivität lässt sich unter geeigneten Bedingungen an einzelnen Präparaten über viele Stunden nahezu unverändert nachweisen. Dabei nimmt die Kontraktionsfrequenz während der ersten Stunde der Messung meist etwas ab, um sich einem Bereich von etwa 3 pro Minute zu nähern. Es entwickelt sich ein typisches Bild mit klar abgetrennten Phasen der Kontraktion und Pausen ohne Aktivität und mit einem sehr geringen basalen Tonus. Nur in wenigen Präparaten bleibt ein schnellerer Rhythmus ohne längere Pausen erhalten.

Die Spontanaktivität der RPV kann durch Veränderungen der experimentellen Bedingungen und durch eine Reihe von endogenen und exogenen Substanzen beeinflusst werden, Details zu entsprechenden Studien zeigt Tab. 1 des Anhangs. Aus der Vielzahl der Substanzen, die Effekte auf die Spontanaktivität haben, lässt sich schließen, dass zahlreiche verschiedene Rezeptoren und Ionenkanäle an der RPV vorhanden und funktionell relevant sind. Die Daten aus der Literatur lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Blocker des L-Typ Kalziumkanals bewirken eine deutliche Reduktion der elektrischen Aktivität und Kraftentwicklung der RPV [20, 21]. Nifedipin bewirkt im Vergleich mit Verapamil eine weiter gehende Inhibition bis hin zum völligen Erlöschen jeglicher Spontanaktivität.
- Der Natriumkanalblocker Tetrodotoxin hat keinen Einfluss auf die Spontanaktivität [22]
- Kaliumkanal öffnende Substanzen (Cromakalim, Minoxidil, Diazoxid, Pinacidil) bewirken deutliche Inhibitionen der Spontanaktivität [23, 24].
- Blocker von spannungs- und kalziumabhängigen Kaliumkanälen (4-AP, TEA, Charybdotoxin, Iberiotoxin, Barium) bewirken deutliche Steigerungen der mechanischen Aktivität [25-27]. Hinsichtlich der Effekte des selektiven SK_(Ca)-Blockers Apamin existieren widersprüchliche Ergebnisse [28].
- Die mechanische Spontanaktivität wird sowohl cholinerg als auch adrenerg gesteigert [17]. Dadurch wird der Transport von viszeralem Blutvolumen zur Leber bzw. in die systemische Zirkulation sowohl in Situationen gesteigerter parasympathischer Aktivierung im Rahmen von

Digestionsprozessen als auch im Rahmen sympathischer Aktivierung in Situationen mit zentralem Volumenmangel gefördert. Die hieran beteiligten Transmitter bewirken über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren Erhöhungen der $[Ca^{2+}]$ und hemmen die repolarisierenden Kaliumströme [29].

1.1.2 Ursprung und Charakteristika der elektrischen Spontanaktivität

Die im vorigen Abschnitt beschriebene mechanische Spontanaktivität der RPV ist das Ergebnis einer elektrischen Spontanaktivität. Bislang ist nicht bekannt, wo die diese ihren Ursprung hat. Lange Zeit ging man im Fall der RPV, aber auch bei zahlreichen anderen spontan aktiven glattmuskulären Organen davon aus, dass die Myozyten selbst ihr Ausgangspunkt seien und bezeichnete die Spontanaktivität entsprechend als „myogen“.

In den 90er Jahren ergaben sich jedoch Hinweise darauf, dass die sogenannten „*interstitial cells*“ oder *Cajal-Zellen* in der intestinalen glatten Muskulatur spezialisierte Schrittmacherzellen darstellen und einen entscheidenden Beitrag für die Generierung der spontanen elektrischen Aktivität liefern. Diese bilden Verbindungen mit benachbarten Myozyten und zeigen ein grundsätzlich anderes Muster elektrischer Aktivität ohne Aktionspotenziale und scharfe Spikes. Einige Autoren gehen davon aus, dass über Gap-Junction Kontakte langsame Schrittmacherpotenziale dieser Zellen durch eine überschwellige Depolarisation die komplexen Aktionspotenziale und MSCs der glatten Muskelzellen auslösen [30].

In jüngerer Zeit wurden entsprechende Befunde auch in Studien am glatten Muskel von Gefäßen berichtet. Unter anderem wurden in der Portalvene des Kaninchens Cajal – Zellen nachgewiesen. Unabhängig davon, ob diese Zellen für die Generierung der spontanen Rhythmik tatsächlich funktionell relevant sind, ist nicht anzunehmen, dass sie die schnellen Spikes selbst beeinflussen, da sie selbst im Gegensatz zu den glatten Muskelzellen Änderungen des Membranpotenzials zeigen [31].

Die elektrische Spontanaktivität der RPV ist durch extrazelluläre und intrazelluläre Messungen untersucht worden. Übereinstimmend zeigt sich sowohl in einzelnen Zellen als auch für mehrere Millimeter umfassende Abschnitte der Präparate, die mittels extrazellulärer Elektroden abgeleitet werden, ein Wechsel zwischen Ruheperioden und Phasen schneller elektrischer Aktivität.

Die Phasen der Aktivität bilden die bereits genannten *Multi-Spike-Komplexe* (MSCs). Durch intrazelluläre Messungen wird erkennbar, dass jeder MSC zu Beginn und am Ende von einer langsamen De- bzw. Repolarisation begrenzt wird. Im Mittelteil werden Serien von schnellen Spikes generiert, deren Repolarisationen nicht das Niveau des Ruhepotenzials erreichen. Die derartig geformten Komplexe werden auch als „langsame Wellen mit aufgesetzten Spikes“ bezeichnet [32]. Nachfolgend werden Daten aus der Literatur zu Registrierungen der elektrischen Aktivität mittels extra- und intrazellulärer Elektroden dargestellt. Auf die Besonderheiten der jeweiligen Ableittechnik wird im Abschnitt „Methoden“ eingegangen.

1.1.2.1 Intrazelluläre Messungen der Spontanaktivität

Für die Zusammenfassung der bekannten Daten und die Ergebnisdarstellung und Diskussion wird die elektrische Aktivität in vier Abschnitte unterteilt:

- Ruheperiode
- Einleitungsphase
- Phase der schnellen Spikes
- Abklingphase

Zentraler Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind die schnellen elektrischen Abläufe, so dass im Folgenden nur auf die Phase der schnellen Spikes näher eingegangen wird, die anderen Abschnitte werden nur sehr kurz beschrieben:

Während der *Ruheperiode* lassen sich in Zellen der RPV nahezu konstante Potenziale ableiten, die dem Ruhepotenzial der Zellen zu entsprechen scheinen. Funaki und Bohr [17] fanden Werte zwischen -30mV und -65mV, Hamilton et al. [20] geben Werte um -60 mV, Southerton et al [24] um -58mV an. Der Zeitraum zwischen Ruheperiode und dem Auftreten des ersten Spikes eines MSC wird im Folgenden als *Einleitungsphase* bezeichnet. Über ihre Dauer und den Spannungsverlauf finden sich in der Literatur keine klaren Angaben.

Den Hauptteil des MSC bildet die *Phase der schnellen Spikes*. Sie beginnt mit dem Aufstrich zum ersten echten Spike und endet mit dem letzten Spike, der voll repolarisiert, also wieder auf sein Ausgangsniveau zurück geführt wird. Eine eingehende Formanalyse der einzelnen Spikes, die, wie bei Southerton et al. [24] erkennbar, teilweise einen komplexen Verlauf haben, existiert bisher nicht. An gleicher

Stelle werden Daten zur Spikefrequenz (5,56/s) sowie zur Dauer einzelner Spikes (33,1ms) angegeben.

Es sei darauf hingewiesen, dass die Spike - Entladungen der RPV große Ähnlichkeit zu den in anderen phasisch kontrahierenden glattmuskulären Präparaten wie der *Taenia Coli* [33], des Magenantrums [34] und der Portalvene des Meerschweinchens [35] haben, was die Eignung der RPV als Modellpräparat für die Untersuchung der schnellen Spikes rechtfertigt. Eine detaillierte Auswertung der Phase der schnellen Spikes in den MSC der hier ausgewerteten Serie erfolgt im Ergebnisteil.

Der Abschnitt zwischen der Phase der schnellen Spikes und dem erneuten Eintritt in die Ruheperiode wird als *Abklingphase* bezeichnet. Auch dieser Abschnitt ist in den veröffentlichten Studien nicht explizit hinsichtlich seiner Dauer und den Veränderungen der elektrischen Aktivität beschrieben worden.

1.1.2.2 Extrazelluläre Messungen der Spontanaktivität

Darstellungen der extrazellulär gemessenen elektrischen Aktivität der RPV finden sich in einer Reihe von Publikationen und werden als leicht zu messende Korrelate der elektrischen Gesamtaktivität genutzt [21, 36, 37]. Eine systematische Analyse zur Dauer der extrazellulär gemessenen MSC und zeitlich hoch aufgelöste Darstellungen finden sich in der Literatur nicht, die graphischen Darstellungen zeigen jedoch, dass sich auch mit dieser Methode Ruheperiode und MSCs klar voneinander abgrenzen lassen.

1.1.2.3 Ausbreitung der elektrischen Erregung

Obwohl erste Messungen der spontanen elektrischen Aktivität der Portalvene bereits vor über 40 Jahren durchgeführt wurden, sind ihr Ursprung und ihre räumliche Ausbreitung noch immer ungeklärt. Diskutiert werden eine Ausbreitung direkt entlang der Längsachse [37], spiralförmig um die Längsachse gewunden [38] sowie eine zentrifugale Ausbreitung von polytopen Schrittmacherarealen [36].

Für die vorliegende Arbeit ist der Modus der räumlichen Ausbreitung vor allem relevant um abschätzen zu können, inwieweit während der schnellen Spannungsänderungen das Potenzial der einzelnen Zellen homogen ist, da nur unter diesen Bedingungen die später ausgeführten Prämissen der Modellbildung volle Gültigkeit besitzen. Eine diesbezügliche ausführliche Interpretation der Daten aus der Literatur erfolgt im Rahmen der Diskussion.

1.1.3 Mathematische Modellierung elektrischer Erregung der glatten Muskulatur

Die heute allgemein anerkannten Konzepte von elektrischer Erregungsbildung und Erregungsfortleitung entstanden durch die Anwendung von Erkenntnissen der Thermodynamik und Elektrizitätslehre auf biologische Prozesse. Eine Zusammenfassung dieser Entwicklung geben Hille und Cole [39, 40].

Durch die Entwicklung von Modellen, die bioelektrische Phänomene auf einfache physikalische Grundlagen zurückführten, konnten die für ein jeweiliges spezifisches Erregungsmuster konstitutiven Elemente – beispielsweise Ionenkanäle – mit relativ einfachen experimentellen Protokollen gut charakterisiert werden, obwohl über diese zur Entstehungszeit der Modelle noch keinerlei Kenntnisse auf ultrastruktureller Ebene vorlagen.

Mit der Charakterisierung von Ionenkanälen und physikalischen Eigenschaften der Zellmembranen wurde es möglich, über die Entwicklung entsprechender mathematischer Modelle Erregungsprozesse zu simulieren und durch Variation einzelner Parameter deren Bedeutung im Gesamtkontext der physiologischen elektrischen Aktivitätsmuster zu bestimmen. Umgekehrt entstand die Möglichkeit, durch das Zusammenfügen der an einem bestimmten System gewonnenen Daten zu erkennen, inwieweit die aus experimentellen Studien abgeleiteten Vorstellungen über die jeweiligen Prozesse zusammengefasst die physiologischen Aktivitätsmuster erklären können. In den fundamentalen Arbeiten von Hodgkin et al. [41-45] wurden zunächst in spezifischen experimentellen Anordnungen einzelne Elemente der Erregung charakterisiert und anschließend aus den gewonnenen Daten Modellparameter erstellt. Im letzten Schritt wurden die mathematischen Modellelemente im Rahmen eines einfachen physikalischen Gesamtmodells der Erregung zusammengesetzt und dieses Modell dahingehend untersucht, ob sich aus ihm die beobachteten Erregungsabläufe ergeben würden, was mit aus heutiger Sicht erstaunlich hoher Präzision gelang.

Den auf Grundlage der genannten Arbeiten von Hodgkin et al. entwickelten Modellen liegt die Auffassung der Zellmembran als Kapazität zugrunde. Diese wird durch Ströme umgeladen, deren treibende Kräfte die elektrochemischen Gleichgewichtspotenziale verschiedener Ionen zwischen Zellinnerem und extrazellulärem Raum bilden. Das Kernstück der Modelle ist die Berechnung der Widerstände, über welche die jeweiligen Ströme fließen. Für die Generierung von Aktionspotenzialen entscheidend ist deren

Spannungs- und Zeitabhängigkeit. Die Berechnung der Widerstandswerte für jeden Spannungsverlauf ist möglich, wenn angenommen wird, dass Aktivierungs- und Inaktivierungsparameter existieren, welche in Abhängigkeit vom Membranpotenzial einen bestimmten Steady-State-Wert annehmen. Die Geschwindigkeit, mit der dies geschieht, ist ebenfalls spannungsabhängig. Die jeweiligen konkreten Werte können für einzelne Ströme durch gezielte Variationen des Membranpotenzials und Auswertung der resultierenden Stromkurven bestimmt werden. Auf Grundlage der dadurch ermittelten Charakteristika können numerisch lösbarer Gleichungssysteme erstellt werden, die als Eingabeparameter nur „Spannung“ und „Zeit“ benötigen und als Ergebnis den zeitlichen Verlauf des jeweiligen veränderlichen Widerstandes ausgeben. Aus diesem kann unter Kenntnis der treibenden Kräfte der einzelnen Ströme zusammen mit dem Spannungsverlauf der Strom berechnet werden.

Gemessen an der mittlerweile unüberschaubaren Zahl an Publikationen über die Modellierung von Erregungsprozessen existieren nur wenige Arbeiten, die sich diesem Thema unter spezieller Berücksichtigung des glatten Muskels widmen. Anders als beispielsweise für die in dieser Hinsicht intensiv untersuchten Präparationen des Tintenfisch – Riesenaxons oder des Myokards gibt es bisher für nur sehr wenige glattmuskuläre Organe überhaupt Analysen zur Rolle einzelner Stromkomponenten [46-48].

Eine frühe Arbeit zum Thema stammt von Ramón et al. [49]. In dieser wurde postuliert, dass die elektrische Aktivität einzelner Zellen des glatten Muskels durch spannungsabhängige Natriumeinwärts- und Kaliumauswärtsströme entstehe. Auf Grundlage histologischer Daten wurde im Rahmen dieser Arbeit weiterhin eine Modellierung der Ausbreitung von Aktionspotenzialen im glatten Muskel durchgeführt. Für beide Komponenten werden allerdings nur wenige Bezüge zu den experimentellen Beobachtungen elektrischer Aktivität im glatten Muskel hergestellt, der Versuch einer Rekonstruktion tatsächlich beobachteter Abläufe wurde nicht unternommen.

Lang und Rattray-Wood [50] stellten ein Modell vor, in dem verschiedene an glatten Muskelzellen ermittelte Ströme (spannungsabhängige Kalium- und Kalziumströme, kalziumabhängiger Kaliumstrom) als Komponenten integriert wurden. Den aus diesen Komponenten im Rahmen bestimmter Parameterkonstellationen bzw. Szenarien errechneten Spannungsverläufen wurden experimentell ermittelte Aktivitätsmuster gegenüber gestellt. Zwischen modellierten und aus Experimenten bekannten Spannungsverläufen in verschiedenen Präparaten ergaben sich deutliche Ähnlichkeiten,

allerdings blieben die Aussagen, dem gewählten Ansatz entsprechend, eher qualitativer Natur.

Weitere Modelle der elektrischen Aktivität der glatten Muskulatur einzelner Organe, die darauf ausgerichtet sind, physiologische Erregungsabläufe auf Ebene des Zusammenspiels der verschiedenen Membranleitfähigkeiten zu erklären, existieren zum Zeitpunkt der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit nicht.

1.1.4 Ionenströme und Ionenkanäle der RPV

An isolierten Zellen der RPV wurden in Patch-Clamp-Untersuchungen Einwärts- und Auswärtsströme mit gut reproduzierbaren Charakteristika ermittelt. Diese beinhalten einen Kalziumstrom vom L-Typ, zwei von Kaliumionen getragene spannungs- und zeitabhängige Auswärtsströme mit unterschiedlichen Kinetiken sowie einen Hintergrundstrom ohne wesentliche Zeitabhängigkeit. Weitere Ströme, die nur in einzelnen Arbeiten und nicht von mehreren Autoren konstant beschrieben wurden, werden im Folgenden nicht berücksichtigt (z.B. Natriumkanäle, [51]). Gleches gilt für Ströme mit langsamem Kinetiken wie den u.a. von Pacaud et al. [52] beschriebenen kalziumabhängigen Chloridstrom, da diese faktisch keine Relevanz im Rahmen der im Mittelpunkt dieser Arbeit stehenden schnellen Spannungsabläufe haben können.

Für die Darstellung der technischen Aspekte der Patch-Clamp-Messungen wird auf den Abschnitt „Methoden“ verwiesen.

Die nun zu beschreibenden Ströme stellen die Grundlage für die einzelnen Komponenten des zu entwickelnden mathematischen Modells dar. Mit diesem Modell soll getestet werden, wie gut sich auf Basis dieser Ströme die während der elektrischen Spontanaktivität auftretenden schnellen Spikes erklären lassen.

1.1.4.1 Kalziumströme

Phasen spontaner Aktivität der RPV sind durch einen Anstieg der Kalziumpermeabilität der Zellmembran gekennzeichnet [53]. Nur in Anwesenheit von Kalziumionen im extrazellulären Milieu kommt es zur Ausbildung des charakteristischen Musters der elektrischen Aktivität mit typischen MSC [54]. Kalziumantagonisten hemmen spontane und durch Agonisten potenzierte elektrische und mechanische Aktivität [55, 56]. Die genauere Charakterisierung der von Kalziumionen getragenen Ströme wurde erst mit Einführung der Patch-Clamp Methode möglich. Loirand et al. [57] blockierten mittels

caesiumhaltiger Patch-Pipettenlösung die Auswärtsströme und isolierten so einen reinen Einwärtsstrom, der sich nicht durch Kalium- und Natriumkanalblocker veränderbar zeigte. Die Charakterisierung hinsichtlich der Kinetik, der Steady-State Aktivierung und Inaktivierung sowie hinsichtlich der Abhängigkeit von der intrazellulären Kalziumkonzentration erbrachte in der genannten Studie die Differenzierung in zwei verschiedene Komponenten, einen langsam und einen schnell inaktivierenden Kalziumstrom.

In späteren Arbeiten wurde dagegen das Vorliegen nur eines Typs von Kalziumstömen beschrieben, die dem typischen, an anderen Präparaten ausführlich charakterisierten Strom durch L-Typ Kalziumkanäle entsprach [58-61]. Es ergaben sich hierbei keine wesentlichen Unterschiede zu den Charakteristika der L-Typ Kalziumströme in anderen vaskulären oder intestinalen Präparationen [62].

1.1.4.2 Spannungs- und kalziumabhängige Kaliumauswärtsströme

Vor der Charakterisierung der Auswärtsströme an isolierten Zellen der RPV waren bereits zahlreiche Arbeiten über Auswärtsströme an Zellen anderer glattmuskulärer Organe, unter anderem an Zellen der Portalvene des Kaninchens, veröffentlicht worden. An dieser beschrieben Hume et al. [63] die Existenz eines nicht-inaktivierenden verzögerten Gleichrichterstroms, eines nicht-inaktivierenden Hintergrundstroms, eines transienten Auswärtsstroms und spontaner transiente Auswärtsströme (spontaneous transient outward currents, STOCS). Am selben Organ charakterisierten Beech et al. [64] ebenfalls zwei spannungsabhängige Auswärtsstromkomponenten: einen 4-AP sensiblen, langsam inaktivierenden Auswärtsstrom und einen Charybdotoxin- und TEA-sensiblen, „high-noise“ Auswärtsstrom ohne relevante Inaktivierung. Rauschvarianzanalysen ergaben für die letztgenannte Komponente eine Einzelkanalleitfähigkeit, die nahe der von BKCa-Kanälen aus anderen Präparaten liegt.

Spannungsabhängige Kaliumströme

An der RPV selbst existieren ausführliche Patch-Clamp-Studien unter anderem von Noack et al. [65], Edwards et al. [66, 67] und Cogolludo et al [68]. In den genannten Arbeiten werden ein sehr schnell inaktivierender (fast transient outward current, "I_{TOF}") und ein langsam inaktivierender Auswärtsstrom (slow transient outward current, "I_{TOs}") unterschieden. I_{TOF} aktiviert und inaktiviert vollständig binnen weniger als 50ms, die

Aktivierung von I_{TOs} hingegen ist erst nach etwa 100 ms abgeschlossen, die Inaktivierung verläuft sehr langsam über mehrere Sekunden. Die in der Literatur angegebenen Boltzmann-Kurven der Aktivierung und Inaktivierung zeigen für beide Komponenten bereits eine relevante Inaktivierung beim experimentell ermittelten Ruhemembranpotenzial von ca. -60mV und eine unvollständige Aktivierung beim positivsten Potenzial während der schnellen Spikes.

Übereinstimmend wird über eine unterschiedliche Ausprägung der schnellen und der langsamen Komponente zwischen einzelnen Zellen berichtet, in vielen Zellen wird die schnelle Komponente vollständig von der langsamen überdeckt [65].

Neben den genannten elektrophysiologischen Studien existieren auch Untersuchungen zur Expression verschiedener Kaliumkanalproteine, allerdings nicht an der Portalvene der Ratte, sondern lediglich für den glatten Muskel der Portalvene des Kaninchens. Thorneloe et al. [69] konnten hier die Existenz von mRNA der porenbildenden (α -) Domänen der spannungsabhängigen Kaliumkanäle Kv1.2, Kv1.4 und Kv1.5, hingegen nicht Kv1.1, Kv1.3 und Kv1.6 nachweisen. In der gleichen Studie durchgeführte Western-Blots und spezielle Immunpräzipitationsstudien konnten die Ergebnisse der mRNA-Analytik im Wesentlichen bestätigen und ergaben darüber hinaus Hinweise auf die Existenz heteromultimerer Ionenkanäle in Form von Kv1.2 und Kv1.5 in Verbindung mit regulatorischen Kv1.2 β -Untereinheiten im untersuchten Gewebe. Kerr et al. [70] kombinierten auf dieser Grundlage molekularbiologische und elektrophysiologische Methoden und konnten den genannten heteromultimären Kaliumkanal als wichtigsten Träger des 4-AP sensitiven verzögerten Gleichrichterstroms an Zellen der Portalvene des Kaninchens identifizieren.

Kalziumabhängige Kaliumströme

Der Nachweis von spontanen transienten Auswärtsströmen (spontaneous transient outward currents, STOCs), die im Voltage-Clamp-Modus unter depolarisierenden Haltepotenzialen bei kontinuierlicher Ableitung glatter Muskelzellen in kalziumhaltigen Medien nachweisbar sind, gilt als indirekter Beweis der Existenz kalziumabhängiger Kaliumkanäle. Bezuglich der Funktion der STOCs und der kalziumabhängigen Kanäle selbst wurden verschiedene Hypothesen formuliert, einen Überblick geben Bolton et al. ([71]).

Nachgewiesen wurden STOCs an der RPV unter anderem durch Kirkup et al. [59]. Eine direkte Messung kalziumabhängiger Kaliumströme im Patch-Clamp ist nur sehr

eingeschränkt möglich, da hierfür ein kalziumhaltiges Medium notwendig wäre und die entsprechend auftretenden Einwärtsströme die Auswärtsströme teilweise maskieren. Entsprechend existieren hierzu auch keine experimentellen Studien.

An der Portalvene des Kaninchens beschrieben Inoue et al. [72] an isolierten Membranpatches zwei einzelne Komponenten von kalziumabhängigen Kaliumströmen, die sich hinsichtlich ihrer Einzelkanalleitfähigkeit und Sensitivität gegenüber TEA unterscheiden.

Die Existenz von kalziumabhängigen Kaliumkanälen gilt also an sich als gesichert, Aussagen zu Kalzium- und Spannungsabhängigkeit und Kinetik sind jedoch nicht möglich. Aus anderen Präparationen gibt es Hinweise darauf, dass kalziumabhängige Kaliumkanäle und Kalziumkanäle sehr eng benachbart in der Membran lokalisiert sind, so dass sie im Rahmen sogenannter Mikrodomänen deutlich höheren Kalziumkonzentrationen und schnelleren Änderungen derselben ausgesetzt sind, als sie beispielsweise im zentralen Zytosol auftreten [73, 74]. Eine schematische Darstellung dieses Konzepts gibt Abb. 1.2.

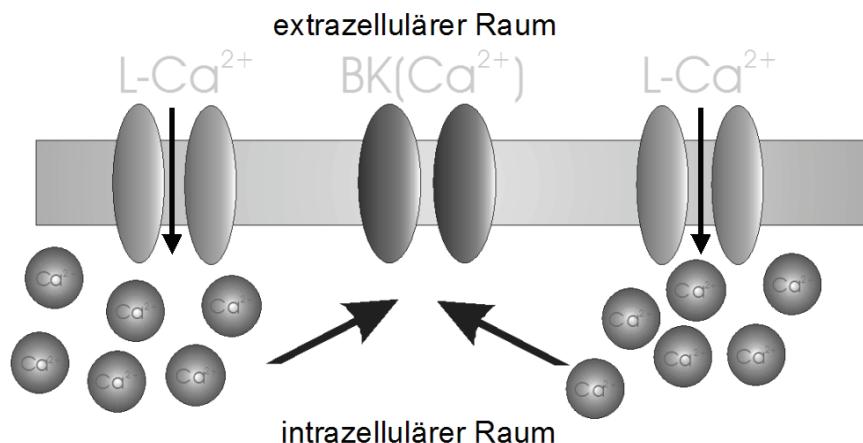


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der engen räumlichen Nachbarschaft zwischen L-Typ-Kalziumkanälen „L- Ca^{2+} “ und kalziumabhängigen Kaliumkanälen „BK(Ca^{2+})“ in der Membran. Durch die enge Nachbarschaft sind die kalziumabhängigen Kaliumkanäle höheren Kalziumkonzentrationen ausgesetzt, als sie im zentralen Zytosol herrschen.

Zusammenfassend kann für die RPV die Existenz von drei zeitabhängigen Kaliumstromkomponenten als gesichert angesehen werden: Einer kalziumabhängigen, am ehesten von BK(Ca)-Kanälen getragenen und zwei spannungsabhängigen Komponenten. Die beiden letzteren unterscheiden sich vor allem hinsichtlich ihrer Kinetik in einen sehr schnell (binnen weniger als 50ms) und einen langsam (über mehrere Sekunden) inaktivierenden Strom.

1.1.4.3 Hintergrundströme ohne Zeitabhängigkeit

In Patch-Clamp-Messungen an isolierten Zellen der RPV lassen sich neben den beschriebenen spannungs- und zeitabhängigen Strömen auch Komponenten nachweisen, die lediglich spannungsabhängig sind [62, 68].

Diese Ströme zeigen keine zeitabhängige Aktivierung oder Inaktivierung und werden auch als nicht-inaktivierende Hintergrundströme „ I_{NI} “ bezeichnet. Mit jeder Veränderung des Membranpotenzials nimmt I_{NI} einen bestimmten Wert an und behält ihn so lange bei, wie die Ableitbedingungen und der metabolische Status der Zelle stabil bleiben.

Zur Messung von I_{NI} werden Haltepotenziale gewählt, unter denen alle anderen bekannten Stromkomponenten inaktiviert sind, in der Regel etwa -10mV. Wird I_{NI} in Kalzium-freier Lösung bestimmt, liegt das Umkehrpotenzial bei etwa -40mV, mit Kalzium im Medium bei etwa -60mV. Cogolludo et al. [68] untersuchten den Effekt von Iberiotoxin auf die spannungsabhängigen Auswärtsströme.

Im Bereich zwischen -60 und +20 mV zeigt sich eine beinahe lineare Strom-Spannungsbeziehung mit einem Anstieg von 0,5 bis 1 pA/mV, erst bei positiveren Potenzialen ergibt sich ein auswärts-gleichrichtender Charakter. Charakteristisch ist, dass I_{NI} in kalziumhaltiger Lösung höhere Amplituden und ein ausgeprägteres Rauschen zeigt als in Anwesenheit von Kalzium. Cogolludo et al. berichten in der bereits genannten Arbeit ferner über eine Reduktion von I_{NI} in Anwesenheit von Iberiotoxin.

Diese Ergebnisse legen zusammenfassend den Schluss nahe, dass I_{NI} von einer heterogenen Population von Kanälen getragen wird. Neben einwärts gleichrichtenden Kaliumkanälen vom K(ATP)-Typ, von ether-à-gogo-Gen (ERG) kodierten sowie kalziumabhängigen Kaliumkanälen gehören hierzu wahrscheinlich auch kalziumabhängige Chlorid - und eventuell unspezifische Kationenkanäle [75, 76], da nur so die Abweichung des Umkehrpotenzials vom Kalium-Gleichgewichtspotenzial erklärliech ist.

Auf molekularer Ebene wurde durch Cao et al. [77] die Expression verschiedener Kaliumkanaltypen (rvKir6.1, rvKir6.2, rvSUR1 und rvSUR2) in der RPV nachgewiesen. Die in-vitro Coexpression der genannten Proteine erbrachte Kanäle, die durch Glibenclamid gehemmt und durch Pinacidil aktiviert wurden.

1.2 Fragestellung und methodischer Ansatz

Im Fokus der vorliegenden Untersuchung steht die Frage, welche Bedeutung die bislang bekannten Ionenströme für die schnellen Spike-Komponenten der elektrischen Spontanaktivität der RPV haben. Durch die mathematische Berechnung aller Stromkomponenten und deren Zusammenführung in einem Gesamtmodell soll geprüft werden, inwieweit die an der RPV beobachteten schnellen Spikes mittels der bisher bekannten Membranströme zu rekonstruieren sind.

Außer den von uns publizierten Ergebnissen [78] existieren bislang in der Literatur keine Studien über die Rekonstruierbarkeit gemessener Aktionspotenziale durch an Einzelzellen charakterisierte Stromkomponenten für spontanaktive glattmuskuläre Organe.

Im Gegensatz dazu stehen für neuronale Erregungsvorgänge sowie die elektrische Aktivität der quergestreiften Skelett- und Herzmuskelatur mittlerweile zahlreiche gut evaluierte Modelle zur Verfügung [40, 79]. Die Entwicklung dieser Modelle gelang auf Grundlage der erfolgreichen Charakterisierung der konstitutiven Elemente für die elektrische Aktivität in diesen Organen. Durch die Zusammenführung der verschiedenen experimentell identifizierten Elemente in entsprechenden Modellen der Erregung für die jeweiligen Präparate konnten in den genannten Bereichen experimentelle Befunde bezüglich ihrer physiologischen Relevanz deutlich besser eingeordnet werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen dazu beitragen, die für die schnellen Anteile der elektrischen Spontanaktivität der RPV verantwortlichen Elemente zu identifizieren und die Rolle der an isolierten Myozyten gemessenen Stromkomponenten im Rahmen der physiologischen Spontanaktivität besser bewerten zu können. Letztendliches Anliegen der Untersuchung ist es, durch Klärung dieser Fragen das Verständnis des physiologisch und klinisch hoch relevanten Phänomens der Spontanaktivität des glatten Muskels zu erweitern.

Darstellung und Diskussion der Ergebnisse nehmen auf verschiedene experimentelle Methoden Bezug. Diese werden im folgenden Abschnitt dargestellt.

2 Methoden

Zielstellung der durchgeführten Untersuchungen war es, die im Rahmen der elektrischen Spontanaktivität auftretenden schnellen Spikes auf ihre Rekonstruierbarkeit durch an Einzelzellen der RPV charakterisierten Stromkomponenten zu prüfen.

Hierfür wurden Daten aus intrazellulären Mikroelektrodenmessungen und Patch-Clamp-Experimenten genutzt. Daher werden beide Methoden mit Betonung der für die bearbeitete Fragestellung relevanten Aspekte vorgestellt. Mit den entsprechenden Erläuterungen befasst sich **Abschnitt 2.1** dieses Kapitels. Aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit wird die Entwicklung des mathematischen Modells zur Analyse der Ionenströme während schneller Spikes erst am konkreten Beispiel im Ergebnisteil beschrieben.

An dieser Stelle seien lediglich die zur Durchführung der Berechnungen genutzte Software genannt: „Grafula II“ (Vishnevsky, Aleksey; Russland) sowie „MatLab 7.4“ (TheMathWorks; USA) und „Microsoft Exel 2003“ (Microsoft; USA). Alle Berechnungen wurden auf einem handelsüblichen Personal Computer (PC) durchgeführt.

Abschnitt „2.2“ dieses Kapitels beschreibt den zur Durchführung der experimentellen Untersuchungen angewendeten Versuchsaufbau sowie die eingesetzten Lösungen und Substanzen.

2.1 Elektrophysiologische Untersuchungsmethoden

Stark vereinfacht lassen sich zwei grundsätzliche experimentelle Prinzipien zur Charakterisierung der erregungsphysiologischen Eigenschaften eines Gewebes differenzieren. Zum Einen können die in einem Gewebe oder in einzelnen Zellen auftretenden Spannungsverläufe, zum Anderen die ihnen zu Grunde liegenden Ströme ermittelt werden.

Die damit verbundenen Versuchsanordnungen beinhalten daher im Falle der Spannungsmessung die Platzierung von intra- oder extrazellulären Elektroden an einem hochohmigen Verstärkereingang. Die zwischen den Elektroden fließenden Ströme werden dabei so gering wie möglich nahe Null gehalten („Stomklemme“, „Current Clamp“).

Im Falle der Strommessung werden einzelne Zellen oder Teile eines Zellverbands möglichst so gegen den Extrazellulärraum geschaltet, dass beliebige Spannungsverläufe durch Einprägung genau angepasster Ströme erzeugt werden („Spannungsklemme“, „Voltage Clamp“). Derartige Spannungsverläufe sind häufig ideale Rechteckimpulse. Nach Anwendung abgestufter Folgen von Spannungsimpulsen („Paradigmen“) können aus den hierdurch erzeugten Strömen die Membranleitfähigkeiten charakterisiert und mathematisch modelliert werden.

Im Folgenden werden einzelne Methoden beschrieben, die für die experimentelle Elektrophysiologie des glatten Muskels relevant waren bzw. es noch immer sind.

2.1.1 Extrazelluläre Elektrik

Die experimentell einfachste Methode zur Beobachtung der elektrischen Aktivität des glatten Muskels ist die Ableitung der extrazellulär messbaren Potenziale („Feldpotenziale“). Hierzu sind verschiedene experimentelle Anordnungen möglich, entscheidend ist die Platzierung mindestens einer Elektrode in unmittelbarer Nähe des Präparates und einer weiteren Elektrode entweder ebenfalls nah am Präparat, jedoch in einiger Entfernung von der ersten (bipolare Ableitung) oder aber als Masseelektrode mit deutlichem Abstand vom Präparat in der extrazellulären Perfusionslösung (unipolare Ableitung).

Neben der einfachen experimentellen Umsetzbarkeit bietet die Methode weitreichende Möglichkeiten, da insbesondere beim Einsatz mehrerer Elektroden durch Variationen in der Verschaltung die Ausbreitung der Aktivität über größere Areale verfolgt werden kann und gleichzeitig eine Beobachtung der Synchronisation im Gewebe möglich ist. Auch pharmakologische Studien mit gleichzeitiger Kontraktionsmessung und langen Beobachtungszeiten sind gut durchführbar [33]. Nachteilig sind vor allem die fehlende Beurteilbarkeit von Veränderungen im absoluten Membranpotenzial der Zellen und die Ermittlung der absoluten Amplituden einzelner Entladungen. Eine Übersicht zu Grundlagen, Technik und Einsatzmöglichkeiten bietet Bortoff [80].

2.1.2 Intrazelluläre Mikroelektrode – Stromklemme

Die intrazelluläre Platzierung von sogenannten „scharfen Mikroelektroden“ ermöglicht die kontinuierliche Messung von Membranpotenzialen an Organpräparaten. In

Abhängigkeit vom Grad der elektrischen Kopplung zwischen den einzelnen Zellen des Organs entspricht der abgeleitete Potenzialverlauf dem räumlich summierten Signal der abgeleiteten Zelle selbst sowie einer variablen Anzahl angrenzender Zellen. Die Ableitung des Signals erfolgt mittels dünn ausgezogener Glaskapillaren, die mit einer dem intrazellulären Milieu angepassten Elektrolytlösung gefüllt sind. Im nicht ausgezogenen Teil enthält die Kapillare einen Silberdraht, der mit dem Verstärkereingang verbunden ist. Die zweite Elektrode ist mit dem Extrazellulärraum verbunden.

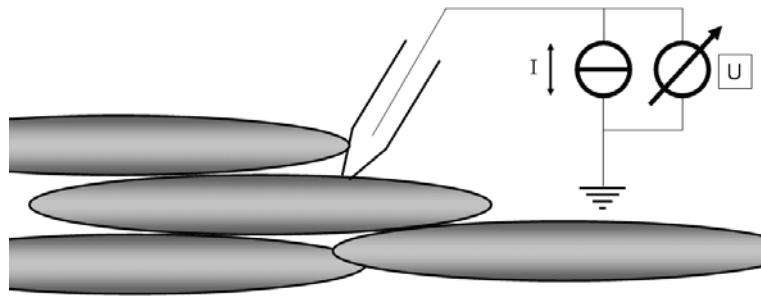


Abb. 2.1: Schematischer Aufbau einer Messung mit intrazellulärer Mikroelektrode: Eine Stromquelle ist über eine Glaselektrode hochohmig mit dem Zellinneren verbunden. Den zweiten Pol bildet die extrazelluläre Lösung. Der Strom wird üblicherweise rechteckförmig appliziert.

Die Durchführung stabiler intrazellulärer Messungen ist im Vergleich zu extrazellulären Methoden technisch grundsätzlich anspruchsvoller. Bezogen auf die Anwendung am glatten Muskel ist sie mit der zusätzlichen Schwierigkeit der Etablierung stabiler Ableitungen während der simultanen Messung von Kontraktionen und Elektrik belegt. In der Weiterentwicklung konnten jedoch durch spezielle Modifikationen wie das Einbringen der Elektroden in einen mechanisch immobilisierten Bereich erhebliche Verbesserungen erzielt werden (Prinzip der „partiellen Fixierung“, siehe [33, 81]). Eine Kalibrierung des Systems zur Ermittlung von absoluten Potenzialwerten ist wegen der hohen Widerstände der intrazellulären Messelektrode und der kaum möglichen Abschätzung von Leckströmen problematisch, weswegen in der Literatur vielfach auf entsprechende Angaben verzichtet wird. Ebenfalls zu beachten sind Einschränkungen der Erfassung schneller Signale durch die Frequenzarbeitsbereiche der eingesetzten Verstärker und Schreibsysteme.

Eine Darstellung der Messmethodik der in die vorliegende Arbeit einbezogenen Mikroelektrodenmessungen findet sich bei Southerton et al. [24], weitere allgemeine Übersichten zur Methode bei Kuriyama et al. [82].

2.1.3 Patch-Clamp-Technik – Spannungsklemme

Spannungsklemmprotokolle erfordern einen niederohmigen Zugang zum Zellinneren. Vor Entwicklung der Patch-Clamp-Technik wurde die ursprünglich von Stämpfli [83] an Nervenpräparaten entwickelte und später von Burnstock und Straub [84] sowie Berger [85] modifizierte Saccharose-Trennwand-Technik für Messungen an glattmuskulären Organpräparaten genutzt. Die Methode basiert auf einer speziellen Anordnung von drei Kammern, von denen eine mit kaliumreicher physiologischer Lösung gefüllt ist und durch die entsprechende lokale Depolarisation mit Verringerung des Membranwiderstandes einzelner Zellen an einem Ende des Präparates niederohmig mit dem Zellinneren verbunden ist. Eine zweite Kammer enthält eine kaliumarme, dem extrazellulären Milieu nachempfundene Lösung und wird zur extrazellulären Ableitung genutzt. Durch eine zwischen beiden Kammern eingebrachte saccharosehaltige Lösung wird erreicht, dass kein parazellulärer Stromfluss stattfindet. Einen Überblick geben Bolton et al. [86]. Mit dem beschriebenen Verfahren kann das Membranpotenzial in komplex angeordneten Zellverbänden jedoch nur unvollständig kontrolliert werden, wodurch die Strommessungen artefaktbehaftet sind [87-89].

Die Anwendung von Strom- und Spannungsklemmprotokollen an Membranen isolierter Zellen oder präparierten Membranfragmenten mittels Patch-Clamp-Messungen überwindet dieses Problem. Eine schematische Abbildung der durch eine Patch-Clamp-Anordnung realisierten Spannungsklemme gibt Abb. 2.2:

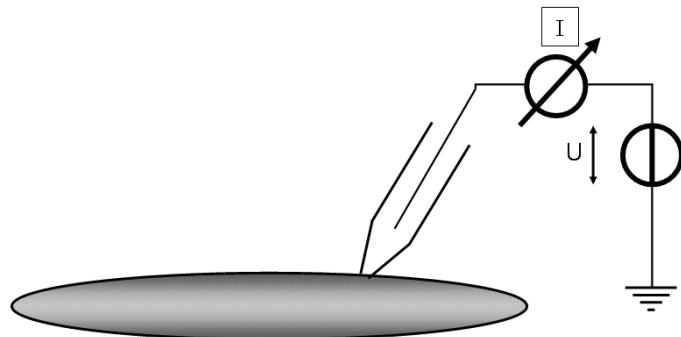


Abb. 2.2: Schematischer Aufbau einer Patch-Clamp-Spannungsklemme: Eine Spannungsquelle ist über eine Glaselektrode mit dem Zellinneren verbunden. Den zweiten Pol bildet die extrazelluläre Lösung. Die bei der gegebenen Spannung fließenden Ströme werden von einem Amperemeter registriert.

Nach ihrer Erstbeschreibung durch Neher und Sakmann [90] und mehreren Erweiterungen [91] fanden Patch-Clamp-Messungen schnell eine weite Verbreitung. Bei der einzigen im Folgenden relevanten technischen Ausführungsvariante, dem „*Whole-Cell-Mode*“ wird nach enzymatischer Isolation der Zellen eine Kapillarelektrode unter mikroskopischer Sichtkontrolle durch lokale Perforation der Zellmembran in elektrischen Kontakt mit dem Zellinneren gebracht.

Der wesentliche Vorteil gegenüber allen übrigen Verfahren liegt in der Möglichkeit, das Membranpotenzial sowie das intrazelluläre Milieu der untersuchten Zelle vollständig zu kontrollieren und nur Ströme dieser einen Zelle messen zu können.

Wichtigster Nachteil ist die schwer abschätzbare mögliche Veränderung der Zellen und der untersuchten Größen durch die Präparation. Die enzymatische Isolation könnte einerseits selbst zur Veränderung von Oberflächenmolekülen führen. Andererseits sind die einzelnen Zellen des glatten Muskels untereinander sowie mit Cajal-Zellen durch ihre Gap-Junction-Kopplungen in einem elektrischen Synzytium organisiert, so dass an Einzelzellen gewonnene Daten nicht uneingeschränkt auf das gesamte Organ übertragen werden können.

2.2 Experimente

Zur Klärung der Bedeutung verschiedener Kaliumkanäle für die spontane Aktivität der RPV wurden kontinuierliche Registrierungen von mechanischer Aktivität und extrazellulärer Elektrik vorgenommen. Während dieser Untersuchungen wurden Testsubstanzen in festgelegten Konzentrationsschritten zur Perfusionslösung hinzugefügt und die entsprechenden Effekte registriert.

2.2.1 Organpräparation und Ablauf der Messungen

Männliche Wistar-Ratten wurden durch Nackenschlag oder Dekapitation nach Äthernarkose getötet. Nach Eröffnung des Abdomens wurden ausgehend von der Leberpforte die Portalvene und ein Teil der Mesenterialvene an beiden Enden sorgfältig unter Vermeidung von starker Zugbelastung präpariert, auf einer Länge von 8 bis 12 mm dargestellt und an beiden Enden mit Garn angeschlungen. Seitenäste wurden einzeln dargestellt und abgetrennt. Nach vorsichtiger Ablösung makroskopisch

sichtbarer Fettpartikel erfolgte die Entnahme des Präparats und die sofortige Überführung in eine gekühlte Präparierlösung.

Anschließend erfolgte unter dem Auflichtmikroskop nach Fixierung des Präparates an beiden Enden mittels feiner Nadeln unter Sicht die Feinpräparation zur Entfernung des restlichen Fett- Leber- und Bindegewebes sowie die Abtrennung von Gefäßabgängen nah am Hauptgefäßstamm. Im nächsten Schritt wurde eine Längsinzision des Gefäßes durchgeführt. Blutreste und Koagel wurden gründlich ausgespült, direkt im Anschluss wurde das Präparat in die mit 35° C warmer Krebs-Lösung perfundierte Messkapillare eingebracht und unter Sichtkontrolle im Bereich der Ableitelektroden positioniert. Anschließend wurde der starre Garnfaden des einen Endes fest fixiert, das andere mit einem Kraft-Spannungswandler verbunden. Im letzten Schritt wurde das Präparat einer leichten Vordehnung unterzogen.

Mit der Registrierung von mechanischer und elektrischer Aktivität wurde unmittelbar nach Einbringen des Präparates begonnen. Eine Zugabe von Testsubstanzen erfolgte frühestens nach einer Adaptationsphase von 30 Minuten.

2.2.2 Lösungen und Substanzen

Die während der Präparation genutzte Lösung bestand aus 143 mmol/l NaCl, 5,9 mmol/l KCl sowie 3,6 mmol/l CaCl₂. Für die eigentliche Versuchszeit wurde das Präparat mit einer physiologischen Salzlösung (modifizierte Krebs – Lösung) der Zusammensetzung 112 mmol/l NaCl, 25 mmol/l NaHCO₃, 1,2 mmol/l KH₂PO₄, 4,7 mmol/l KCl, 1,2 mmol/l MgCl₂, 2,5 CaCl₂ mmol/l, 11,5 mmol/l Glucose perfundiert. Diese diente auch als Trägerlösung für die untersuchten Substanzen.

Die jeweils eingesetzten Lösungen wurden – mit Ausnahme der Präparierlösung – täglich frisch aus Stammlösungen hergestellt, erst unmittelbar vor Beginn der jeweiligen Messung wurde Kalziumchlorid hinzugefügt.

Während der Experimente erfolgte eine kontinuierliche Begasung der Perfusionslösung mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) zur Stabilisierung des Bikarbonatpuffers für die Gewährleistung eines während des gesamten Messzeitraums konstanten pH-Wertes von 7,4.

Folgende Substanzen mit bekannten Wirkungen auf Kaliumkanäle im glatten Muskel wurden zur experimentellen Charakterisierung ihrer Wirkung auf die Spontanaktivität der RPV untersucht:

2.2.3 4-Aminopyridin – 4-AP

4-AP ist in Konzentrationsbereichen von 0,3 bis 5 mmol/l ein spezifischer Blocker an spannungsabhängigen Kaliumkanälen [92-94]. Am glatten Muskel wurde die Reduktion transienter Auswärtsströme durch Beech et al. [64] beschrieben. Eine eingehende Untersuchung der Effekte auf Kanäle der Portalvene des Kaninchens zeigte, dass die Steigerung spontanen Aktivität des Präparates durch 4-AP vor allem auf die Blockade von Kv1.2 und Kv1.5 – Kanälen zurückgeführt werden kann [70].

Für die durchgeführten Experimente wurde 4-AP (RBI, Deutschland) in Konzentrationen von 0,3 bis 3 mmol/l eingesetzt.

2.2.4 Tetraethylammonium – TEA

Tetraethylammonium ist seit langem als Blocker verschiedener Ionenkanäle bekannt. Bei einer Konzentration von 1 mM hemmt es relativ spezifisch BK_(Ca)-Kanäle, in höheren Konzentrationen auch andere Kaliumkanäle [95].

Für die durchgeführten Experimente wurde TEA (RBI, Deutschland) in Konzentrationen von 1 bis 10 mmol/l eingesetzt.

2.2.5 Charybdotoxin

Das Polypeptid Charybdotoxin (CTX) wurde ursprünglich aus dem Gift von *Leiurus quinquestriatus hebraeus* isoliert und gilt als spezifischer Blocker von IK_(Ca) und BK_(Ca) – Kanälen [96, 97]. Eine orientierende Übersicht zur Pharmakologie von CTX geben Garcia et al. [98, 99].

Für die durchgeführten Experimente wurde CTX (Mobitec, Deutschland) in Konzentrationen von 5 bis 250 nmol/l eingesetzt.

2.2.6 Apamin

Apamin blockiert spezifisch die vor allem am Gefäßendothel exprimierten SK_(Ca)-Kanäle. Eine orientierende Übersicht gibt Habermann [100].

Für die durchgeführten Experimente wurde Apamin (Sigma, Deutschland) in einer Konzentration von 100 nmol/l eingesetzt.

2.2.7 Messplatz und Instrumente

Die Umwandlung der Kontraktionen in elektrische Messsignale erfolgte mittels eines konventionellen Kraft-Spannungswandlers (World Precision Instruments, Sarasota, USA). Für die Verarbeitung des transduzierten mechanischen Signals wurde ein Messverstärker (KWS 3073, HBM, Hottinger Baldwin MeBtechnik GmbH, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt, der wiederum an den Analog-Digital-Wandler (ADIPowerlab 2/25, ADI, Castle Hill, Australien) angeschlossen war.

Mit dem zweiten Eingang dieses Wandlers erfolgte die Registrierung der extrazellulären elektrischen Aktivität. Das entsprechende Messsignal der ringförmig im Abstand von 1 mm um das Kapillarlumen angeordneten Platinelektroden wurde über einen weiteren, unabhängigen Messverstärker mit integriertem Filter (Tektronix 2601 Mainframe, Tektronix, Beaverton, USA) sowie ein nachgeschaltetes 50Hz-Notchfiltersystem der Registrierung zugeführt.

Die Speicherung des Signals selbst erfolgte entweder direkt oder nach Zwischenschaltung eines Digitalspeichers mit angeschlossenem Videorecorder auf einem handelsüblichen PC. Verarbeitung und Auswertung der Registrierungen wurden mit der Software Chart5 (ADIPowerlab, ADI, Castle Hill, Australien) vorgenommen.

Mit der verwendeten Versuchsanordnung bestand die Möglichkeit einer weitgehend störungsfreien Umschaltung des Zuflusses zwischen zwei Gefäßen, von denen in das eine die reine, in das andere die mit der Testsubstanz versetzte Perfusionslösung eingebracht wurde. Zur Herstellung einer konstanten Temperatur von 35,5°C in der Messkapillare wurde durch einen äußeren, getrennten Kreislauf entsprechend erwärmte Flüssigkeit entlang der Zuleitungen und der Speichergefäße der Perfusionslösung aus einem Thermostaten gepumpt.

In die Wand der Messkapillare waren zehn Platindrähte im Abstand von 1mm als Elektroden fest eingefügt. Durch gezielte Ableitung der einzelnen Elektroden konnten kleinere oder größere Bereiche des Präparates elektrisch erfasst werden. Während einzelner Experimente wurde in der Regel eine konstante Elektrodenkonfiguration beibehalten; nur in einzelnen Experimenten wurden gezielt Ableitungen mit verschiedenen Elektrodenkonfigurationen durchgeführt.

Abb. 2.3 illustriert den Aufbau des verwendeten Apparates, aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf eine Darstellung des äußeren Kreislaufes zur Temperierung verzichtet.

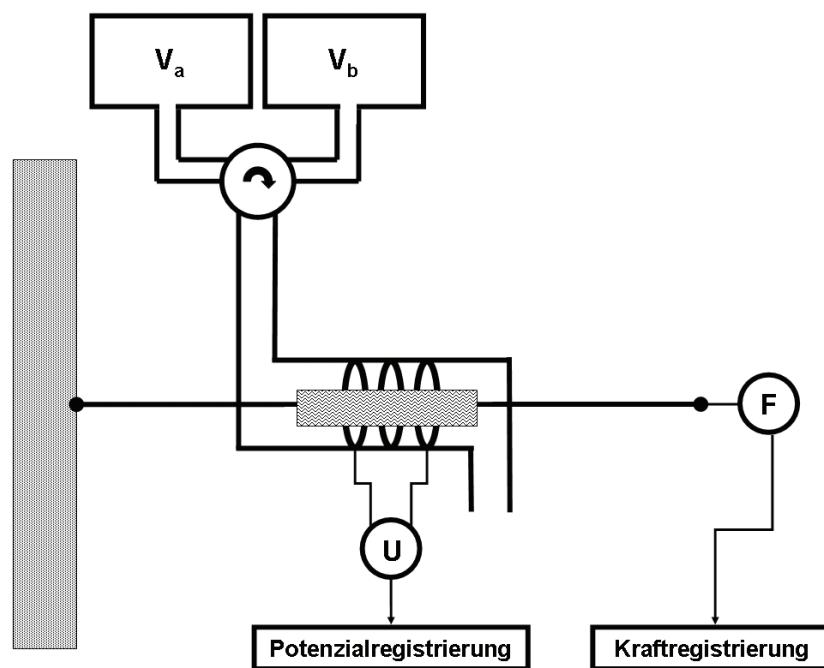


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des zur Messung von mechanischer und extrazellulärer elektrischer Spontanaktivität der RPV verwendeten Apparates. Die Perfusionslösung konnte wahlweise aus den Reservoirn V_a und V_b bezogen werden. Das Präparat wurde mit einem Ende fest am Apparat, mit dem anderen an einem Kraftwandler (F) fixiert (Die Fixpunkte sind hier als schwarze Kreise dargestellt). Innerhalb der Messkapillare erfolgte die elektrische Ableitung. Ein Spannungsmessgerät (U) war hierzu mit Platinelektroden verbunden, die fest in der Messkammer montiert waren. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind hier nur 3 der 10 tatsächlich vorhandenen Elektroden abgebildet.

2.2.8 Aufbereitung des Datenmaterials

Zur Verwendung für weitere Berechnungen wurde die Umwandlung der Daten von intrazellulären Mikroelektrodenmessungen (zumeist Schnellschreiberausdrucke) in digitale Datensätze mit einer Punktdichte von 4/ms vorgenommen. Hierzu wurden die

entsprechenden Messstreifen mit einem handelsüblichen, an einen PC angeschlossenen Scanner in Grafikdateien umgewandelt. Diese Dateien wurden anschließend mit dem Digitalisierungsprogramm Grafula II (A. Vishnevsky, 2000) geladen. Für komplexe Aktionspotenziale erfolgte die manuelle Erfassung von Einzelpunkten. Aus diesen Datensätzen konnten interpolierte Datensätze hoher zeitlicher Auflösung erzeugt werden, die eine große Übereinstimmung mit den Messdaten aufwiesen. Zur Durchführung der Interpolation wurde die Software MatLab 7.4 (TheMathWorks, 2007) verwendet.

2.2.9 Ergebnisdarstellung und Auswertung

Die Ergebnisse der Modellbildungen werden direkt als Outputdaten des Modells mit ihren entsprechenden Einheiten dargestellt. Die experimentellen Ergebnisse werden als arithmetische Mittelwerte der Einzelmessungen zu/abzüglich des **Standardfehlers des Mittelwertes** (S.E.M.) mit Angabe der Gesamtzahl der ausgewerteten Ereignisse in der Form „Wert +/- S.E.M. (Ereigniszahl)“ angegeben. Die Berechnung statistischer Signifikanzen erfolgte mit SPSS 15.0 (SPSS Inc. 2006) unter Nutzung eines t-Tests für unverbundene Stichproben.

3 Ergebnisse

3.1 Modellbildung

Zur Klärung des Beitrags einzelner Ionenstromkomponenten zum Aktionspotenzial der RPV wurde ein mathematisches Modell erstellt. Die hierzu benutzten Verfahren werden unmittelbar im Zuge der Ergebnisdarstellung erläutert.

3.1.1 Darstellung intrazellulär registrierter Spontanaktivität

Als Grundlage für die folgenden Berechnungen zu Stromflüssen während der schnellen Spikes dienten Daten aus intrazellulären Mikroelektrodenmessungen, der Form, wie sie von Patejdl et al. [78] dargestellt wurden. Auf die methodischen Probleme bei der Bestimmung von absoluten Werten für das Membranpotenzial wurde bereits im Methodenteil hingewiesen.

Abb. 3.1 zeigt eine Folge von MSC, die im Rahmen dieser Messungen registriert wurden. Klar erkennbar ist die regelmäßige Abfolge von MSCs und Ruheperioden ohne erkennbare Potenzialveränderungen. Die einzelne Ruheperiode hat eine Dauer von ca. 18s. Bereits bei der geringen zeitlichen Auflösung von Abb. 3.1 wird im Verlauf der MSCs eine langsame Depolarisation des basalen Potenzials erkennbar.

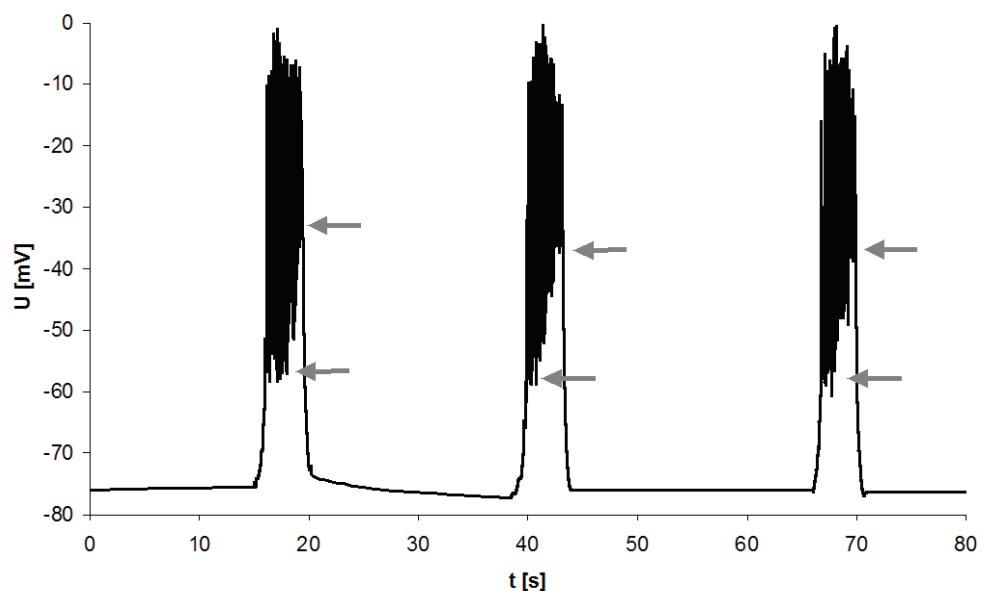


Abb. 3.1: Sequenz von 3 typischen MSC der RPV, intrazelluläre Ableitung. Während der einzelnen MSC kommt es zu einer Depolarisation des basalen Potenzials, Anfangs- und Endniveau sind hier jeweils mit Pfeilen gekennzeichnet.

Für die Berechnungen wurde zur Korrektur technisch bedingter Abweichungen des gemessenen Wertes vom wahren Wert des Ruhemembranpotenzials auf die Rohdaten eine Spreizungsfunktion angewendet. Nähere Ausführungen zu dieser finden sich im Anhang.

Bringt man den mittleren der in Abb. 3.1 gezeigten MSC mit höherer zeitlicher Auflösung wie in Abb. 3.2 zur Darstellung, werden sehr regelmäßig geformte schnelle Spikes erkennbar. Die Analyse der diesen schnellen Spikes unterliegenden Ionenströme ist das Kernstück der vorliegenden Arbeit.

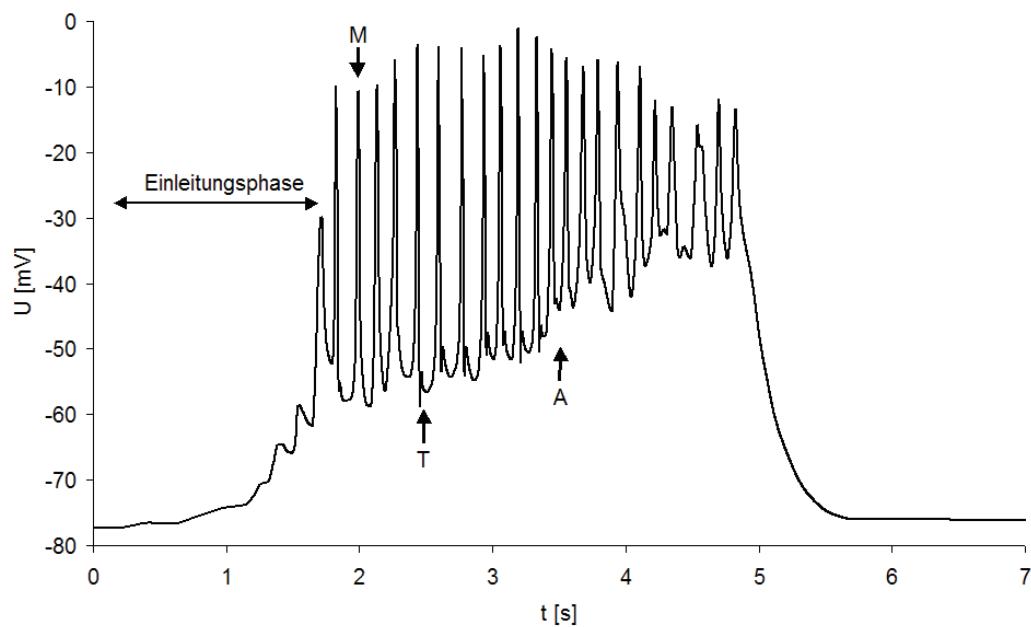


Abb. 3.2: Darstellung eines einzelnen MSC der RPV, intrazelluläre Ableitung. Der mit „M“ bezeichnete Pfeil markiert den in Abb. 3.3 gezeigten monophasisch repolarisierenden, der mit „T“ bezeichnete den in Abb. 3.4 gezeigten triphasisch repolarisierenden Spike, der mit „A“ bezeichnete den Beginn der Abklingphase. Die Einleitungsphase mit der anfänglichen kontinuierlichen und später stufenförmigen unterschwelligen Depolarisation ist zu Beginn des MSC deutlich sichtbar.

Auf die Abläufe zu Beginn und am Ende des MSC wird daher nur verkürzt Bezug genommen. Festzuhalten ist, dass die Einleitung der komplexen Aktionspotenziale ausgehend vom Ruhemembranpotenzial offenbar über eine zunächst sehr langsame, fast linear verlaufende Depolarisation erfolgt. In deren Verlauf werden später wellenförmige Abläufe erkennbar, die aus abgrenzbaren Depolarisationen wachsender Amplitude mit unvollständiger Repolarisation bestehen. Die Amplitude dieser Wellen ist um so größer,

je kürzer der Abstand zum ersten „echten“ schnellen Spike des MSC ist. Die Dauer der Einleitungsphase beträgt etwa eine Sekunde.

Dem ersten voll ausgebildeten schnellen Spike folgt in der ersten Hälfte des MSC eine Serie sehr regelmäßig geformter weiterer Spikes, welche zunächst weitgehend vollständig repolarisieren. Dies ändert sich in der zweiten Hälfte des MSC. Während des nachfolgenden, als Abklingphase bezeichneten Abschnitts mit einer Dauer von 1,8s (+/- 0,2s, n=22) werden die Repolarisationen einzelner schneller Spikes zunehmend geringer. Es kommt zur bereits bei der Beschreibung von Abb. 3.1 angesprochenen Depolarisation des Plateau potenzials und zur Verringerung der Amplituden der einzelnen Spikes. Nach dem Peak des letzten Spikes kommt es zu einer langsamen Repolarisation auf das Niveau vor dem MSC. Während der Repolarisation sind – im Gegensatz zur Einleitungsphase – keine wellenförmigen Potenzialschwankungen erkennbar.

3.1.2 Ermittlung des kapazitiven Stromes während schneller Spikes

Zwischen dem Ende der Einleitungsphase und dem Beginn der Abklingphase liegt eine Phase regelmäßiger, schneller Spikes.

Jeder dieser Spikes beginnt mit einer Depolarisation, deren Steilheit zunächst zunimmt, um erst kurz vor Erreichen des maximalen Wertes wieder geringer zu werden. Nach Erreichen der maximalen Depolarisation kommt es zu einer Repolarisation. Die Repolarisation der schnellen Spikes ist komplexer und zwischen verschiedenen Spikes variabler als die Depolarisation. Im Wesentlichen lassen sich Spikes mit monophasischer von solchen mit triphasischer Depolarisation unterscheiden.

Die monophasische Repolarisation verläuft annähernd spiegelbildlich zur Depolarisation mit zunächst zunehmender und vor Erreichen der maximalen Repolarisation wieder abnehmender Steilheit. Einen repräsentativen Spike dieser Art zeigt Abb. 3.3.

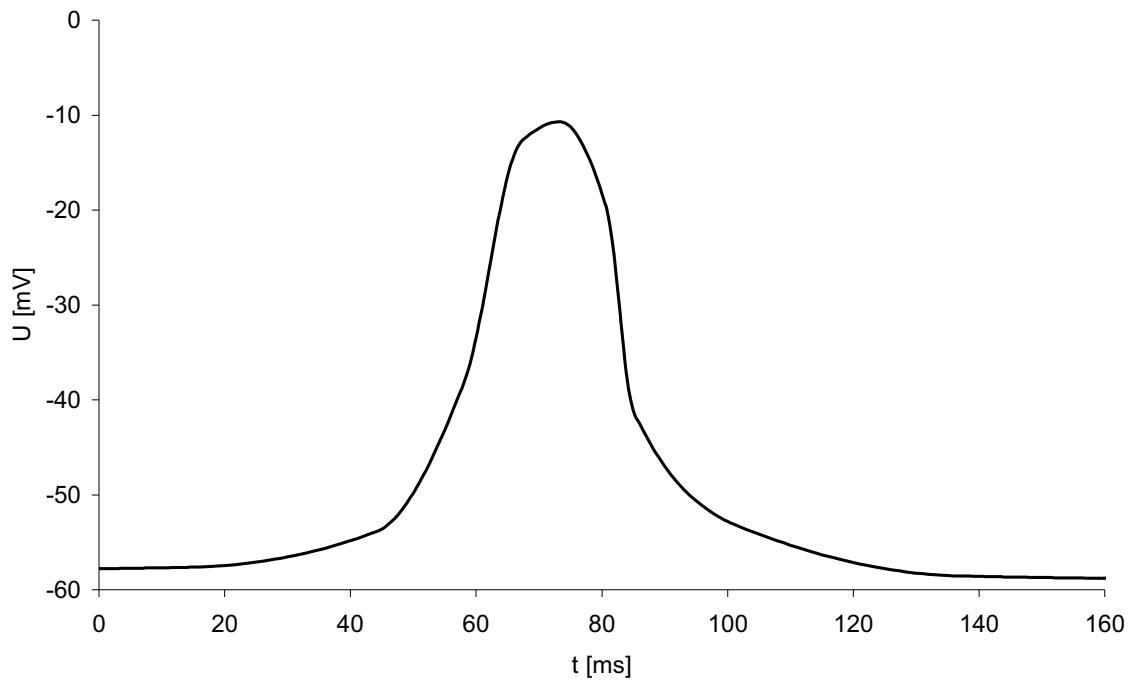


Abb. 3.3: Zeitlich hoch aufgelöster Verlauf des in Abb. 3.2 mit „M“ markierten monophasisch repolarisierenden schnellen Spikes.

Alternativ tritt eine triphasische Repolarisation auf (Abb. 3.4): Im Anschluss an initiale Depolarisation und den Peak des Spikes kommt es zu einer kurzen, nur wenige Millisekunden anhaltenden, ersten Phase der Repolarisation. Diese wird von einer erneuten Depolarisation unterbrochen, welche jedoch nicht die Höhe der vorangehenden erreicht. Nach Erreichen dieses zweiten, kleineren Peaks setzt die zweite Phase der Repolarisation mit hoher Steilheit ein und geht ohne vorherige Abflachung zunächst in eine kurzzeitige Nachhyperpolarisation und – im späteren Verlauf – Nachdepolarisation über.

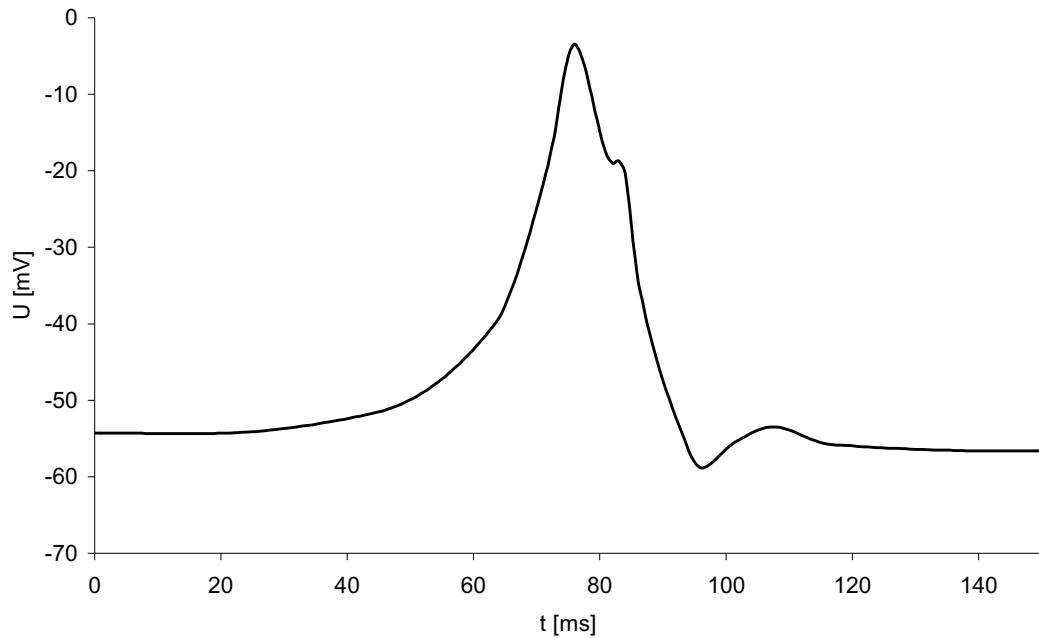


Abb. 3.4 Zeitlich hoch aufgelöster Verlauf des in Abb. 3.2 mit „T“ markierten triphasisch repolarisierenden schnellen Spikes.

Die gezeigten Spannungsverläufe entstehen durch den Fluss von Strömen, die eine Umladung der Membran bewirken. Nach den in der Elektrophysiologie gültigen Konventionen bedeutet dies, dass während der Depolarisation die über die Membran fließenden Ströme in ihrer Summe einwärts gerichtet sein müssen. Während der Repolarisation ist die Summe der Membranströme entsprechend zwingend auswärts gerichtet.

Durch die Kapazität der Zellmembran wird bestimmt, wie viele Ladungen über die Membran fließen müssen, um eine definierte Veränderung des Membranpotenzials zu bewirken. Der kapazitive Strom ist also proportional zur Membrankapazität.

Betrachtet man die zeitliche Dynamik der Potenzialänderung, so wird klar, dass während einer schnellen Umladung der Membrankapazität mehr Ladungsträger pro Zeiteinheit bewegt werden als bei einer langsamen. Anders ausgedrückt ist der kapazitive Strom proportional zur Geschwindigkeit der Änderung des Membranpotenzials.

Die genannten Beziehungen werden durch folgende Gleichung zusammengefasst:

$$I_c = C_m * dU/dt \quad (1)$$

Hierbei steht I_c für den kapazitiven Strom, C_m für die Membrankapazität und dU/dt für das Differential des Spannungsverlaufes nach der Zeit.

Die zeitliche Änderung des Membranpotenzials lässt sich unmittelbar aus den oben gezeigten Datensätzen numerisch ermitteln.

Die Membrankapazität einer einzelnen Zelle kann mit einfachen Mitteln berechnet werden, indem die Oberfläche der Membran einer einzelnen Zelle mit der bekannten, weitgehend vom untersuchten Zelltyp unabhängigen spezifischen Kapazität biologischer Membranen von $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ multipliziert wird.

Hierzu wird die Form der Zelle vereinfachend als zylindrisch angenommen. Unter dieser Bedingung ergibt sich bei Einsetzung von Werten, wie sie in morphologischen Studien für die Geometrie der Zellen gewonnen wurden ([101]), für die Mantelfläche des Zylinders:

$$A_M = \pi \times d \times l = \pi \times 7\mu\text{m} \times 100\mu\text{m} = 2,2 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \quad (2)$$

Hierbei steht d für den Durchmesser der Zelle, l für die Längsausdehnung. Bei Annahme der für Zellmembranen typischen spezifischen Kapazität von $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ ergibt sich hieraus für die Kapazität der gesamten Membran einer einzelnen Zelle:

$$C_M = A_M \times C_s = 2,2 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \times 0,01 \text{ F/m}^2 = 2,2 \times 10^{-11} \text{ F} = 22 \text{ pF} \quad (3)$$

Der so ermittelte Betrag von 22 pF entspricht dem in Patch-Clamp-Experimenten ermittelten Wert für isolierte Zellen der Portalvene [102] und wird im Folgenden für die Kapazität der Modellzelle eingesetzt. Nach Gleichung (1) kann nun unmittelbar der Verlauf des kapazitiven Stroms ermittelt werden. Das Ergebnis für den aus Abb. 3.4 bekannten Spike zeigt Abb. 3.5:

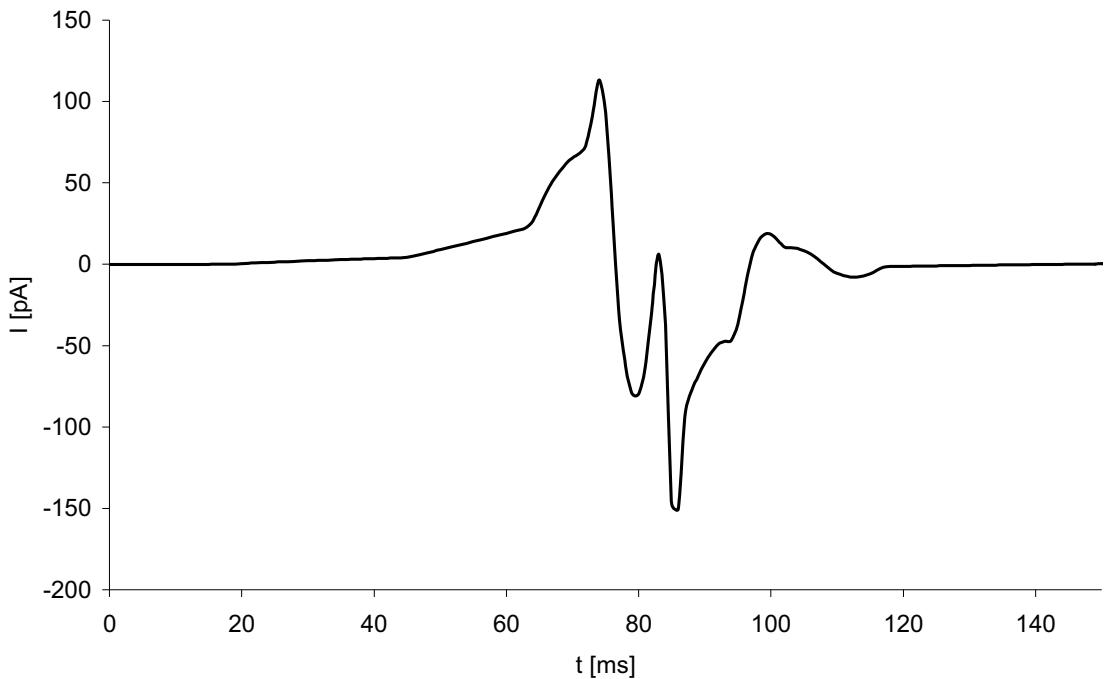


Abb. 3.5: Verlauf des kapazitiven Stroms während des in Abb. 3.4 gezeigten Spikes

Erkennbar ist ein kapazitiver Auswärtsstrom während der Membrandepolarisation und ein zweigipfliger Einwärtsstrom während der Repolarisation. Der Verlauf des während der Repolarisation fließenden kapazitiven Einwärtsstroms zeigt eine Einkerbung, welche der Einkerbung im Potenzialverlauf während der Repolarisation entspricht.

Für den in Abb. 3.3 gezeigten monophasischen Spike ergibt sich ein ähnliches Bild des kapazitiven Stroms mit der Einschränkung, dass der während der Repolarisationsphase fließende Strom nur einen Gipfel zeigt. Eine entsprechende grafische Darstellung findet sich im Anhang.

3.1.3 Interpretation des kapazitiven Stroms

Es soll nun eine kurze Interpretation des gezeigten Verlaufes des kapazitiven Stroms I_c vorgenommen und anschließend geprüft werden, inwieweit dieser mit bekannten Stromkomponenten rekonstruierbar ist.

Für die folgende Interpretation der zu betrachtenden bioelektrischen Vorgänge wird die Zellmembran mit ihrem elektrischen Widerstand, ihrer Kapazität und den über sie bestehenden elektrochemischen Potenzialen als geschlossener Stromkreis betrachtet. In jedem geschlossenen Stromkreis ergibt die Summe aller Ströme nach den Kirchoffschen Gesetzen zu jedem Zeitpunkt den Wert 0.

I_c entspricht, wie im letzten Abschnitt beschrieben, einem Strom, der durch Umladungen der Membran passiv in dieser erzeugt wird. Diejenigen Ströme, welche für diese Umladung ursächlich sind, können bei Annahme eines räumlich homogenen Potenzials der Membran der betrachteten Zelle in zwei Komponenten unterteilt werden. Es handelt sich dabei einerseits um Ströme, die direkt über die Membran der betrachteten Zelle fließen und von den elektrochemischen Potenzialgradienten, die über dieser Membran bestehen, getrieben werden. Andererseits handelt es sich um Ströme, die von Potenzialdifferenzen mit benachbarten Zellen getrieben werden und von dort aus in die betrachtete Zelle ein- oder ausstrahlen. Die erstgenannten, „zelleigenen“ Ströme werden als „Membranströme“, I_M , die aus anderen Zellen einstrahlenden als „Längsströme“, I_L bezeichnet. Entsprechend lautet die Formulierung des o.g. Kirchhoffschen Gesetzes für den betrachteten Fall:

$$I_L + I_M + I_C = 0 \quad (4a)$$

Besteht lokal im die Zelle umgebenden Raum ein homogenes Potenzial, so fließen mangels treibender Kräfte keine Längsströme. Damit vereinfacht sich Gl. 4 und der Membranstrom lässt sich direkt aus dem zeitlichen Verlauf des Membranpotenzials ableiten:

$$I_M = -I_C \quad (4b)$$

Derartige Bedingungen können beispielsweise durch enzymatische Isolation von Zellen hergestellt werden. Ebenfalls treten sie *in vivo* in Geweben auf, deren Zellen entweder elektrisch nicht miteinander gekoppelt sind oder in denen die Erregungsausbreitung derart kontinuierlich stattfindet, dass die Summe der zu jedem Zeitpunkt lokal in das betrachtete Areal hinein und aus dem Areal heraus fließenden Ströme sich aufhebt. Die letztgenannte Bedingung wird im Folgenden während des mittleren Abschnitts der MSC der RPV zunächst als erfüllt angenommen. Die Summe der zu jedem Zeitpunkt fließenden Membranströme ist daher unmittelbar durch Vorzeichenumkehr aus I_c erhältlich.

Erst durch diese Annahme wird eine Rekonstruktion der Ströme während der schnellen Spikes möglich, da Längsströme im Gewebe bislang der experimentellen Beobachtung nicht direkt zugänglich sind. Auf die sich aus der Annahme des Fehlens von Längsströmen ergebenden Probleme und möglichen Abweichungen von der tatsächlichen Situation wird im Rahmen der Diskussion eingegangen.

3.1.4 Rekonstruktion des Gesamtstroms

Zur Rekonstruktion des Gesamtstroms wurde ein mathematisches Modell aufgestellt, dessen Aufbau Abb. 3.6 in Form eines Blockschaltbildes illustriert.

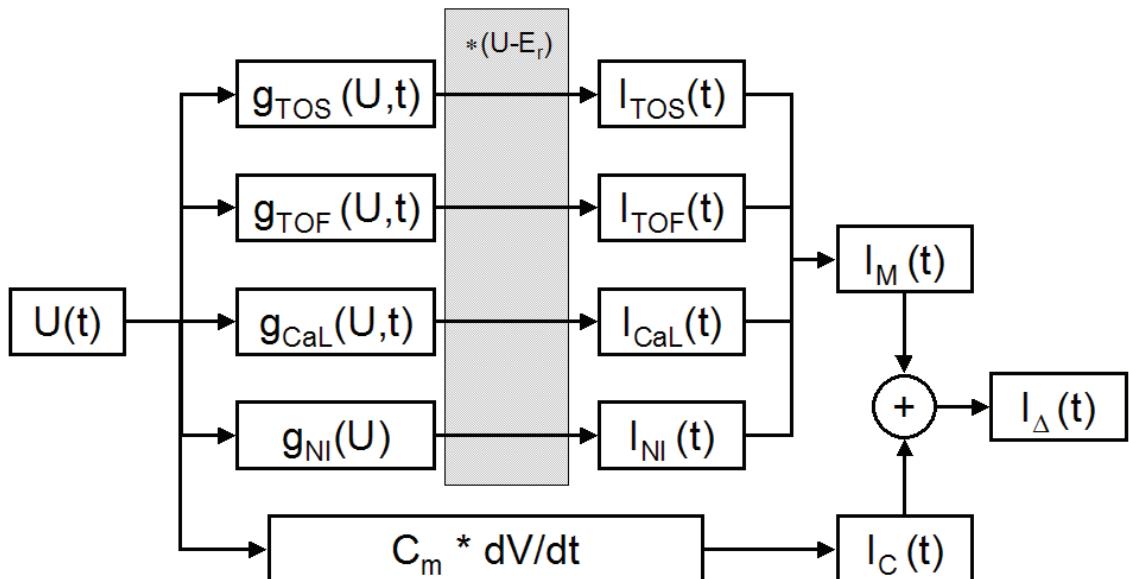


Abb. 3.6: Schematische Darstellung des Modells der Ströme der RPV: Aus dem bekannten Spannungsverlauf „ $U(t)$ “ wird einerseits nach Gl. 1 der kapazitive Strom „ I_C “ errechnet, gleichzeitig erfolgt die Berechnung der Leitfähigkeiten für den nicht-inaktivierenden Hintergrundstrom „ $g_{NI}(U)$ “, den Kalziumstrom „ $g_{CaL}(U,t)$ “ sowie den schnellen „ $g_{TOF}(U,t)$ “ und den langsamen „ $g_{TOS}(U,t)$ “ transienten Auswärtsstrom. Die Ströme selbst werden direkt durch Multiplikation der Leitfähigkeiten mit der treibenden Kraft „ $U - E_r$ “ errechnet (U ist das aktuelle Membranpotenzial, E_r das Umkehrpotenzial des jeweiligen Stroms). Die Summe der einzelnen Stromkomponenten bildet den totalen Membranstrom I_M . Die Summe aus I_C und I_M entspricht dem Differenzstrom I_Δ zwischen Modellströmen und den Strömen, welche einzelnen schnellen Spikes unterliegen. Dieser Differenzstrom kann aus den in Patch-Clamp-Experimenten bekannten Strömen nicht rekonstruiert werden.

Es stehen ein Kalziumstrom, ein schneller und ein langsam inaktivierender Kaliumstrom sowie ein Hintergrundstrom ohne zeitliche Kinetik als feste Elemente zur

Verfügung. Die Vorgabe eines bestimmten Spannungsverlaufes als Inputparameter ergibt entsprechende Ströme als Output. Die Aktivierungs- und Inaktivierungsparameter sowie die Leitfähigkeiten der einzelnen Ströme orientieren sich an bekannten, in Zellen der Portalvene in Patch-Clamp-Experimenten erhobenen Werten aus der Literatur. Die Summe der so erhaltenen Ströme entspricht I_M .

Zur Rekonstruktion des Gesamtstromverlaufes der während der schnellen Spikes der RPV erzeugten Ströme wurden folgende Modellstromkomponenten genutzt:

3.1.4.1 Kalziumstrom

Die Modellierung der L-Kalziumkanalkomponente I_{CaL} des Modells erfolgte auf der Grundlage der von Hodgkin und Huxley [45] entwickelten Gleichungssysteme. I_{CaL} ergibt sich im Modell aus dem Produkt der aktuellen Leitfähigkeit „ g_{CaL} “ der entsprechenden Kanalpopulation mit der treibenden Spannung:

$$I_{CaL} = g_{CaL} \times (U - E_{CaL}) \quad (5)$$

Hierbei steht U für das aktuelle Membranpotenzial, E_{CaL} für das Umkehrpotenzial des an Zellen der RPV ermittelten Kalziumstroms. Bei Annahme eines Milieus mit physiologischen Elektrolytkonzentrationen ergibt sich nach der Nernst-Gleichung für Kalziumionen ein Umkehrpotenzial vom +130mV. Wegen der nicht-absoluten Selektivität der L-Typ Kanäle und der dadurch bedingten Vermischung mit anderen, u.a. von Kaliumionen getragenem Strom, ergibt sich für den Gesamtstrom durch L-Ca-Kanäle eher ein Umkehrpotenzial +60mV. Die biophysikalischen Grundlagen dieses Phänomens fasst Hille [40] zusammen.

Der aktuelle Wert der Leitfähigkeitskomponente g_{CaL} wird in Abhängigkeit von Zeit und Spannungsverlauf für jeden beliebigen Zeitpunkt aus dem Produkt von Aktivierung (a), Inaktivierung (b) und maximaler Leitfähigkeit (g_{CaLmax}) berechnet:

$$g_{CaL} = a \times b \times g_{CaLmax} \quad (6)$$

Der Wert für g_{CaLmax} wird im Modell als konstant betrachtet. In Anlehnung an Daten verschiedener Autoren [61, 103] von Messungen an einzelnen Zellen sind etwa 2000 -

4000pS anzunehmen. Die im Rahmen der Modellberechnungen angenommenen Werte sind den entsprechenden Textabschnitten und Bildunterschriften zu entnehmen.

Die aktuellen Werte der Parameter $a_{t(n)}$ und $b_{t(n)}$ errechnen sich zum Zeitpunkt $t(n)$ als Summe aus den zum vorangegangenen Zeitpunkt $t(n-1)$ errechneten Werten für $a_{t(n-1)}$ und $b_{t(n-1)}$ und der Änderung Δ_a und Δ_b :

$$a_{t(n)} = a_{t(n-1)} + \Delta a_{t(n)} \quad (7)$$

$$b_{t(n)} = b_{t(n-1)} + \Delta b_{t(n)} \quad (8)$$

Gibt es keine zeitliche Änderung der Spannung und sind die aktuellen Werte für Aktivierung und Inaktivierung identisch mit den für die jeweilige Spannung geltenden Steady-State-Werten, so ist Δ_a bzw. $\Delta_b = 0$. Die jeweiligen Δ -Werte für ein Berechnungsintervall können wiederum aus den für die zum jeweiligen Zeitpunkt bestehende Membranspannung geltenden Steady-State-Funktionen für Inaktivierung und Aktivierung und einer ebenfalls spannungsabhängigen Zeitkonstante τ_a errechnet werden. Für die Aktivierung errechnet sich die entsprechende Änderung Δ_a :

$$\Delta a_{t(n)} = \Delta_t \times (a_{ss} - a_{t(n-1)}) / \tau_a \quad (9)$$

Entsprechend ist die Berechnung von a und b für jeden Zeitpunkt möglich, wenn die an diesem Zeitpunkt geltenden Steady-State-Werte für Aktivierung und Inaktivierung sowie die entsprechenden Zeitkonstanten bekannt sind und die numerische Berechnung von einem Zeitpunkt begonnen werden kann, an dem beide Parameter ihren Steady-State-Wert angenommen haben. Die Steady-State-Werte für Aktivierung und Inaktivierung sind spannungsabhängig und werden durch Boltzmann-Funktionen folgender Form abgebildet:

$$a_{ss} = \frac{1}{1 + e^{(U - U_h)/k}} \quad (10)$$

Die Variable U_h steht für den Wert der Spannung, an dem a_{ss} bzw. b_{ss} den Wert 0,5 annehmen. Die Werte von U_h betragen -16,5mV für die Aktivierung bzw. -34,3mV für die Inaktivierung. Bestimmend für die Steilheit der Boltzmann-Funktion ist die Variable „k“, diese beträgt für die Aktivierung -8mV und für die Inaktivierung +5,4mV.

Die entsprechenden Boltzmann-Funktionen werden in Abb. 3.7 grafisch dargestellt. In der Abbildung wird ein Bereich zwischen -50mV und -10mV erkennbar, in dem beide Funktionen Werte deutlich größer als 0 annehmen. Im entsprechenden Spannungsintervall kommt es daher zu einem dauerhaften Fluss I_{CaL} , einem sogenannten „window current“.

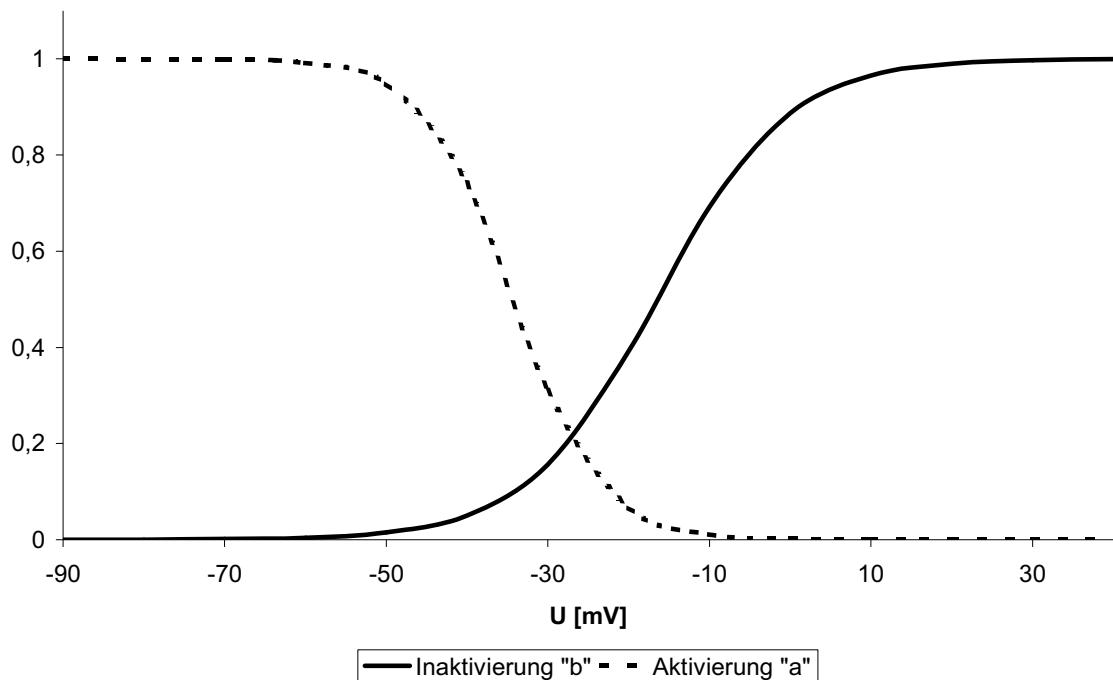


Abb. 3.7: Spannungsabhängigkeit der Steady-State Aktivierung und Inaktivierung von I_{CaL} , errechnet durch Einsetzung der im Text genannten Werten in Boltzmann-Gleichungen.

Hinsichtlich der Berechnung der Zeitkonstanten ergibt sich für I_{CaL} im Vergleich zu den anderen Stromkomponenten des Modells eine Besonderheit, da zur Modellierung der Inaktivierung eine schnelle und eine langsame Zeitkonstante angewendet wurden, um den typischen Stromverlauf abzubilden. Zur Abbildung der Zeitkonstanten wurden Gleichungen der Form

$$\tau = 2^{-\frac{T-20^\circ C}{10^\circ C}} * 10ms^{m*U+n} \quad (11)$$

gewählt. „ τ “ entspricht dabei der Zeitkonstanten in Millisekunden, „ T “ der Umgebungstemperatur in Grad Celsius. Die Werte und Einheiten der Parameter m und n sind in Tabelle 3.1 angegeben, das Membranpotenzial U fließt in mV in die Gleichung ein. Der erste, temperaturabhängige Term der Gleichung wird notwendig, da alle verwendeten Zeitkonstanten neben ihrer spezifischen Spannungsabhängigkeit eine Temperaturabhängigkeit besitzen. Dies ist für die vorliegende Arbeit relevant, da die Patch-Clamp-Experimente, denen die Zeitkonstanten der Stromkomponenten entstammen, bei Raumtemperatur durchgeführt wurden, während die Messungen der Spontanaktivität bei 36°C erfolgten. Bei der Formulierung des Terms zur Abbildung der Temperaturabhängigkeit wurde die aus der Enzymkinetik bekannte, gängige Temperaturabhängigkeit nach der Van't-Hoffschen Regel zu Grunde gelegt. Entsprechend ergibt sich eine Halbierung der Zeitkonstante bei Erhöhung der Temperatur um 10°C. Eine grafische Darstellung der Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten bei Raumtemperatur gibt Abb. 3.8. An dieser Stelle sei darauf verwiesen, dass zur Erhaltung der besseren Vergleichbarkeit mit Daten aus der Literatur sowohl die graphischen Darstellungen der einzelnen Zeitkonstanten als auch die hier dargestellten Voltage-Clamp-Protokolle der Modellströme sich stets auf eine Umgebungstemperatur von 20°C beziehen.

Für die Berechnungen der Ströme während schneller Spikes wurden hingegen 36°C angenommen. Entsprechend haben alle Zeitkonstanten während dieser Berechnungen nur 33% des unter Patch-Clamp-Bedingungen ermittelten Wertes.

	m [1/mV]	n
τ_a	-0,0022	0,55
τ_{bf}	0,0043	1,5
τ_{bs}	-0,01	2,5

Tabelle 3.1: Variablen zur Errechnung der Zeitkonstanten der Aktivierung und Inaktivierung von I_{CaL} in Abhängigkeit vom Membranpotenzial nach Gleichung 11.

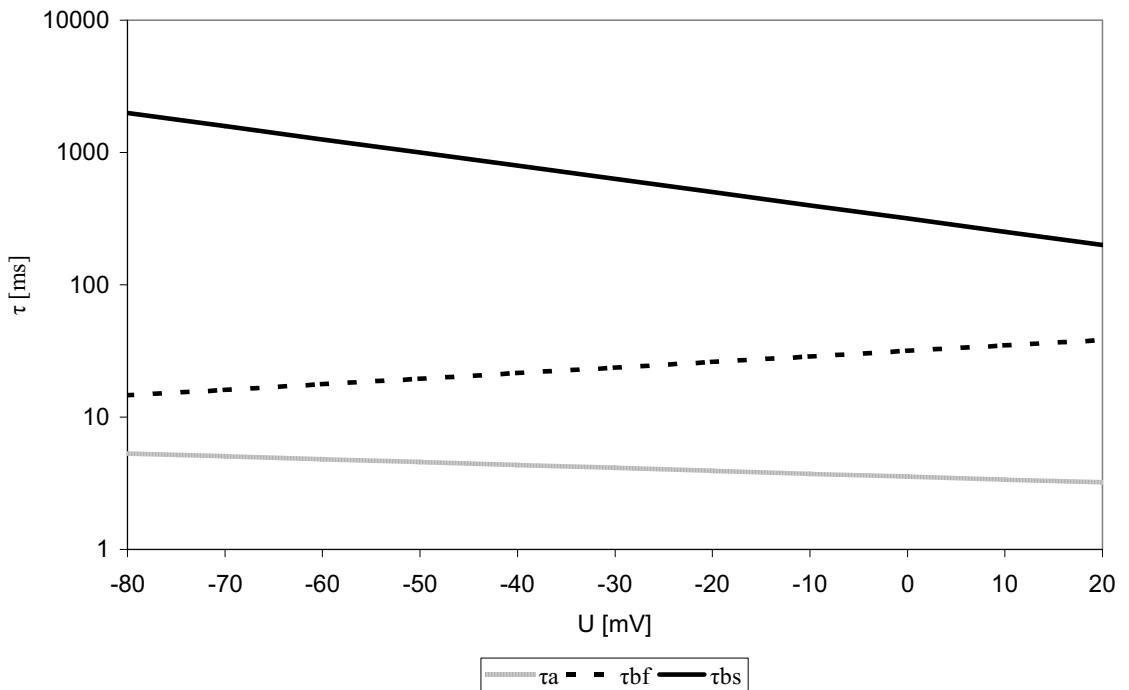


Abb. 3.8: Zusammenfassende grafische Darstellung der Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten von I_{CaL} bei Raumtemperatur (20°C). Nach Gl. 11 können aus diesen Werten die Zeitkonstanten bei Temperaturen von 36°C, wie sie während der Aufzeichnung spontaner schneller Spikes bestanden, durch Multiplikation mit dem Faktor 0,33 ermittelt werden.

Der hier beschriebene Modellstrom ergibt bei Anwendung eines entsprechenden Testprotokolls und Annahme einer typischen g_{CaLmax} von 2000 pA bei Temperaturen von 20°C die in Abb. 3.9 dargestellten Stromverläufe:

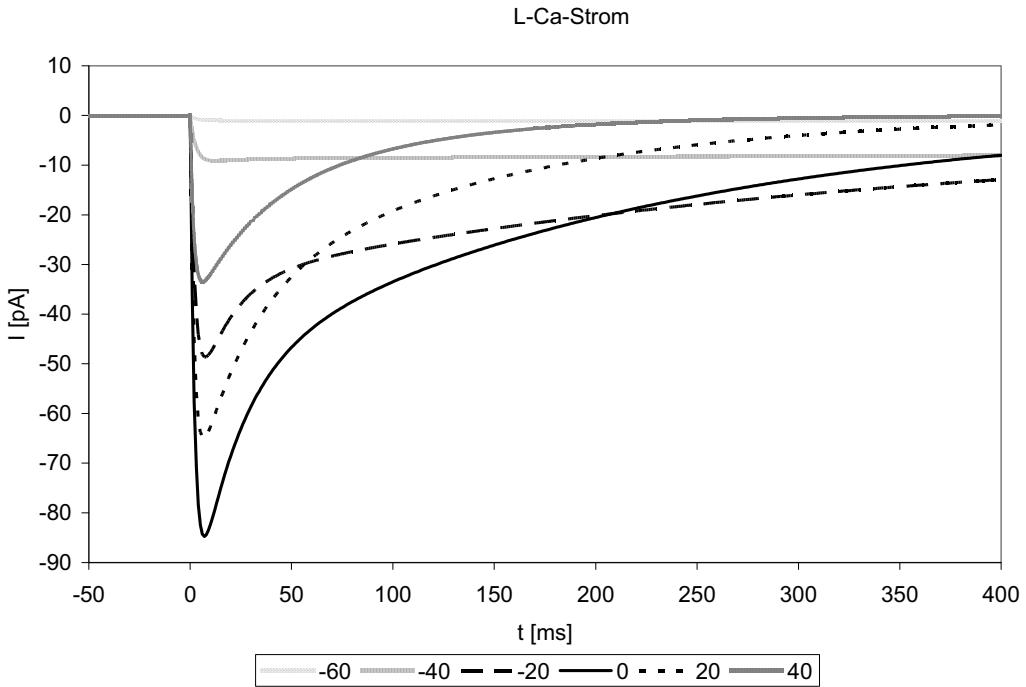


Abb. 3.9: Serie von Stromkurven für den ICaL-Modellstrom, errechnet bei einem Haltepotenzial von -80mV und den in der Legende gezeigten Testpotenzialen (jeweils in mV) bei Raumtemperatur (20°C).

Zum Vergleich mit entsprechenden experimentell gemessenen Kalziumströmen sei insbesondere auf die Arbeiten von Liu et al, [103], Okabe et al. [61] sowie Noack et al. [104] verwiesen. Der Anhang enthält eine Darstellung der Strom-Spannungsbeziehung der maximalen Amplituden bei verschiedenen Testpotenzialen im Vergleich zwischen den Daten aus der genannten Literatur und dem eigenen Modell (Abb. 7.1).

Im nächsten Schritt wurde auf die soeben dargestellte Modellstromkomponente der Spannungs-Zeit-Datensatz des charakteristischen schnellen Spikes aus Abb. 3.4 angewendet und in Abb. 3.10 grafisch dargestellt. Hierbei zeigt sich zunächst die erwartete, mit wenigen Sekunden Zeitversatz zur Depolarisation einsetzende, Aktivierung. Die Inaktivierung beginnt ebenfalls bereits frühzeitig im Verlauf, verläuft jedoch wie erwartet deutlich langsamer. Das Produkt von Aktivierung und Inaktivierung wird mit Beginn der Depolarisation des Spikes größer. Seine maximale Amplitude erreicht es etwa zum Zeitpunkt der maximalen Depolarisation. Mit dem Abschluss der Repolarisation fällt das Produkt praktisch unverzögert wieder auf das Ausgangsniveau.

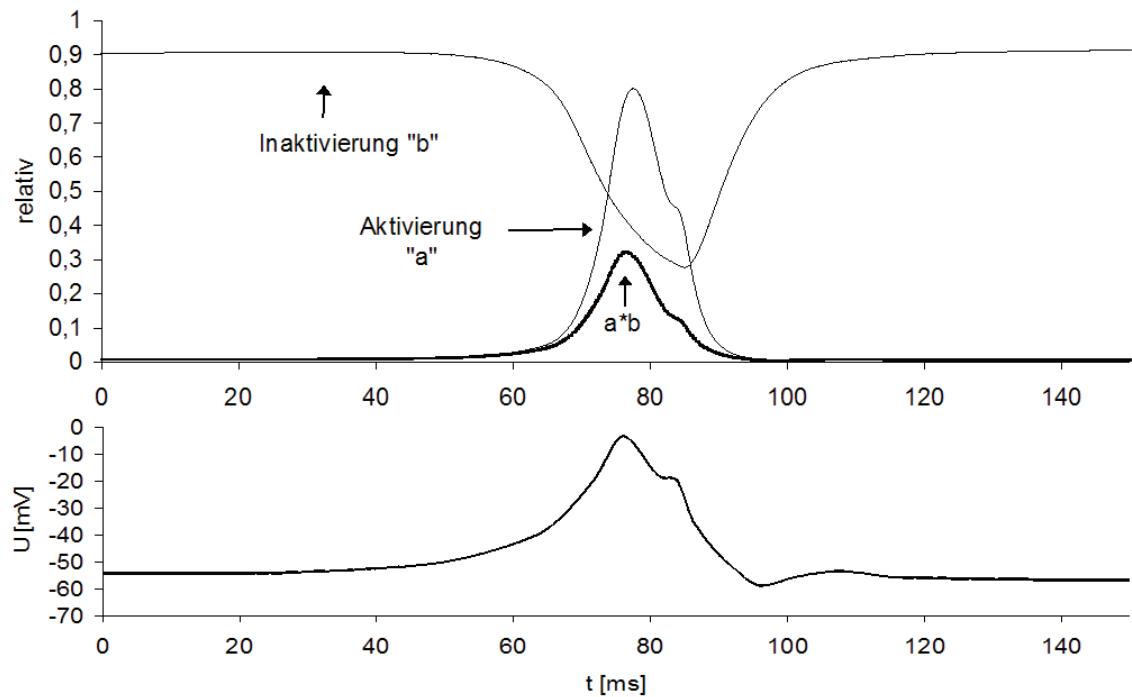


Abb. 3.10: Verlauf von Aktivierung, Inaktivierung des Kalziumstroms sowie des Produkts beider Parameter während des bereits in Abb. 3.4 gezeigten schnellen Spikes (kräftige Linie). Der Spannungsverlauf ist gegen die linke, alle anderen Parameter gegen die rechte Ordinate aufgetragen. Die angewendeten Zeitkonstanten wurden für eine Temperatur von 36°C berechnet.

Sind die Änderungen der Parameter a und b bekannt, so ergibt sich aus diesen nach Einsetzung eines Wertes für g_{CaLmax} nach Gl. 6 unmittelbar der Wert von g_{CaL} und nach Einsetzung des aktuellen Membranpotenzials in Gl. 5 der aktuelle Wert des Kalziumstroms I_{CaL} .

Da diese Stromkomponente den gesamten an Zellen der RPV beobachteten Einwärtsstrom repräsentiert, sollten die während der Depolarisation der schnellen Spikes fließenden Ströme durch sie erklärt werden können. In Abb. 3.11 ist entsprechend I_{CaL} gleichzeitig mit dem nach Gl. 4b ermittelten totalen Strom aufgetragen. Um die Amplitude von I_{CaL} an die von I_M anzupassen, wurde für g_{CaLmax} ein Wert von 5000 pS angenommen. Wie aus der Abbildung ersichtlich, kann mit der aus Daten von Patch-Clamp-Strömen generierten Modellstromkomponente der den Potenzialänderungen während schneller Spikes unterliegende Einwärtsstrom insgesamt hinreichend gut rekonstruiert werden. Lediglich zu Beginn der Depolarisation ist I_{CaL} zu klein. Nachdem das Membranpotenzial die für I_{CaL} bekannte Aktivierungsschwelle von ca. -40 mV überwunden hat, bildet sich jedoch schnell eine ausreichende Amplitude aus.

Auf die beschriebene anfängliche Diskrepanz zwischen I_{CaL} und I_M wird im Rahmen der Diskussion näher eingegangen.

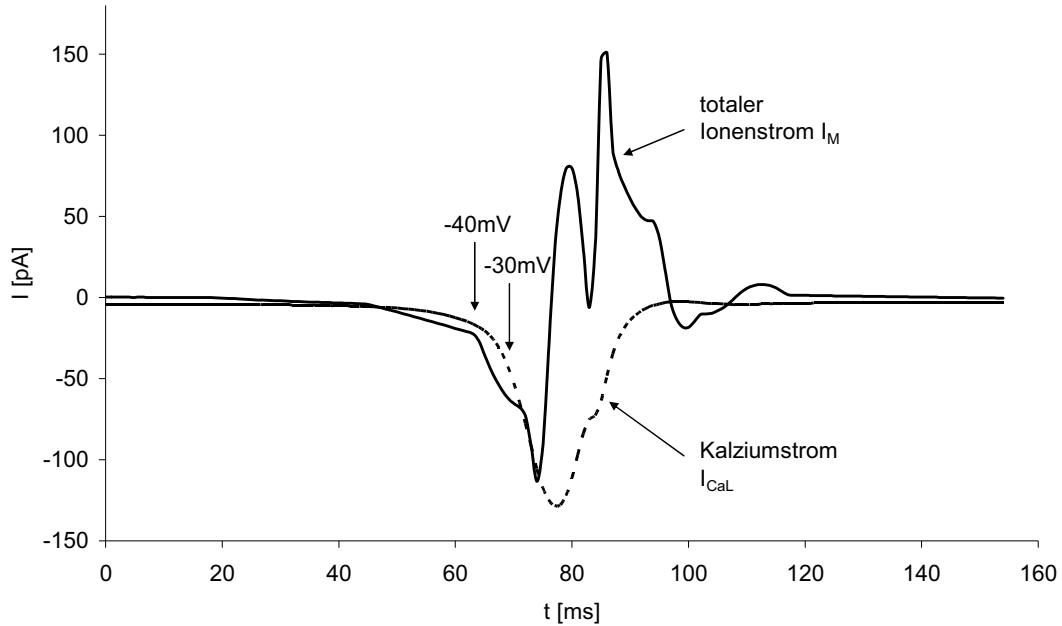


Abb. 3.11: Verlauf von I_{CaL} während des in Abb. 3.4 gezeigten schnellen Spikes (durchgezogene Linie) in Relation zum Verlauf des gesamten Membranstroms I_M bei Annahme einer g_{CaLmax} von 5000 pS. Die angewendeten Zeitkonstanten wurden für eine Temperatur von 36°C berechnet. Die Pfeile zu Beginn des Einwärtsstroms geben das zum jeweiligen Zeitpunkt herrschende Membranpotenzial an. Bereits wenige Millisekunden nach Überschreiten der Aktivierungsschwelle von I_{CaL} ist der errechnete Modellstrom ausreichend groß, um den totalen Membranstrom zu erklären.

3.1.4.2 Auswärtsströme

Der rein spannungsabhängige Kaliumstrom in der RPV besteht aus zwei Komponenten, die sich am deutlichsten hinsichtlich ihrer Inaktivierungsgeschwindigkeit unterscheiden. Die langsame Komponente wird im Folgenden als I_{TOs} , die schnelle als I_{TOf} bezeichnet. Beide lassen sich in Analogie zu I_{CaL} durch monoexponentielle Aktivierungsparameter mit sehr guter Genauigkeit modellieren. Im Gegensatz zu I_{CaL} ist zur Darstellung der Inaktivierung bei beiden Komponenten jeweils eine einzelne Zeitkonstante ausreichend. Die einzelnen Schritte der Modellierung von I_{TOf} und I_{TOs} erfolgen nach dem für I_{CaL} angegebenen Algorithmus. Entsprechend gilt für die Werte von I_{TOf} und I_{TOs} in Analogie zu Gl. 5 zu jedem Zeitpunkt:

$$I_{TOs} = g_{TOs} \times (U - E_{TOs}) \quad (12)$$

$$I_{TOf} = g_{TOf} \times (U - E_{TOf}) \quad (13)$$

In Analogie zu Gl. 6 gilt für die Leitfähigkeiten der beiden Auswärtsströme:

$$g_{TOs} = c \times d \times g_{TOs \max} \quad (14)$$

$$g_{TOf} = e \times f \times g_{TOf \max} \quad (15)$$

Die Parameter der maximalen Leitfähigkeiten wurden als konstant angenommen. Die entsprechenden Werte sind 8000pS für $g_{TOs\max}$ und 7000pS für $g_{TOf\max}$. Zur Vereinfachung wird an dieser Stelle auf die Darstellung der weiteren Schritte zur Berechnung der Parameter der Aktivierung (c für I_{TOs} , e für I_{TOf}) und Inaktivierung (d für I_{TOs} , f für I_{TOf}) verzichtet. Die Berechnung wurde nach dem gleichen Verfahren wie für I_{CaL} durchgeführt, wie es in den Gl. 7 bis 9 dargestellt ist. Die Funktionen zur Beschreibung der Steady-State Aktivierung und Inaktivierung von I_{TOs} und I_{TOf} haben die gleiche Form wie Gl. 10. Die Werte der Parameter sind in Tab. 3.2 angegeben, eine grafische Darstellung findet sich im Anhang.

	U_h [mV]	k [mV]
c_{ss}	20	-10
d_{ss}	-63	9
e_{ss}	-15	-12
f_{ss}	-71	6,5

Tabelle 3.2: Werte der halbmaximal aktivierenden- bzw. inaktivierenden Spannungen für ITOs und ITOf. Die Einsetzung in eine entsprechende Boltzmannfunktion Gleichung 10 ergibt den Verlauf der Steady-State Aktivierungsparameter von ITOs „ c_{ss} “ bzw. ITOf „ e_{ss} “ sowie der Inaktivierungsparameter von ITOs „ d_{ss} “ bzw. ITOf „ f_{ss} “.

Die Funktionen zur Beschreibung der Zeitkonstanten der Änderung der Aktivierungs- und Inaktivierungsparameter von I_{TOs} und I_{TOf} haben die gleiche Form wie Gl. 11. Die entsprechenden Werte sind in Tab. 3.3 dargestellt.

	m [1/mV]	n
τ_c	-0,014	1,8
τ_d	0,0008	3,4
τ_e	-0,007	0,7
τ_f	-0,0043	1,17

Tabelle 3.3: Variablen zur Errechnung der Zeitkonstanten der Aktivierung und Inaktivierung von I_{CaL} in Abhängigkeit vom Membranpotenzial nach Gleichung 11.

Abb. 3.12 stellt die Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten der spannungsabhängigen Auswärtsströme für eine Umgebungstemperatur von 20°C graphisch dar.

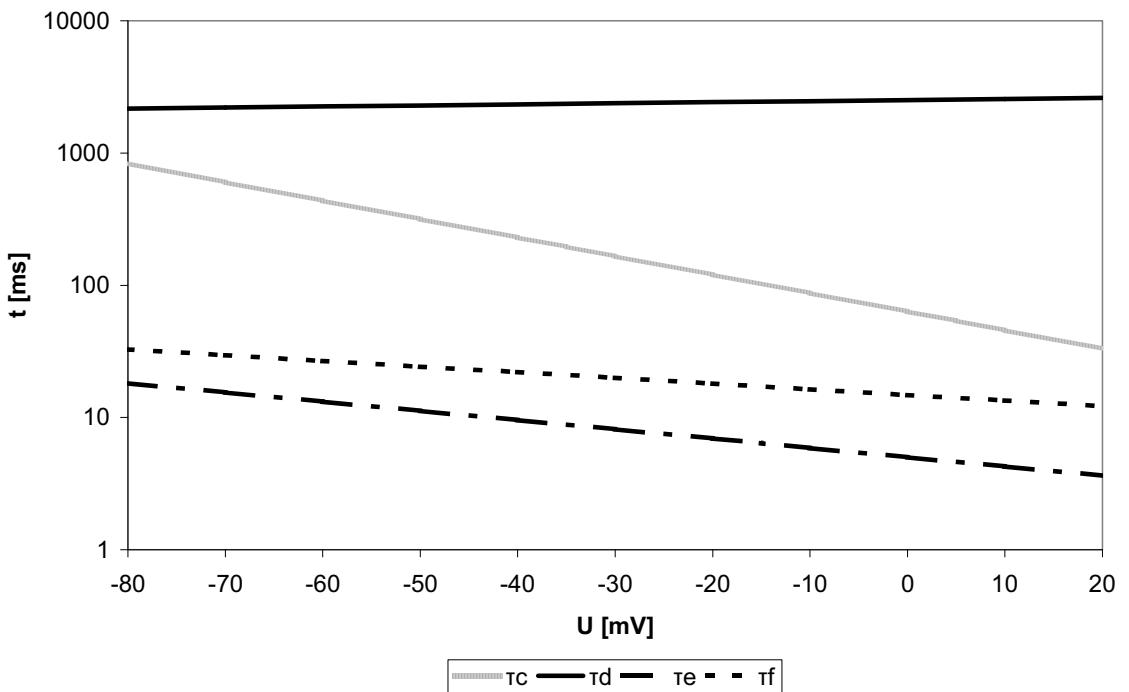


Abb. 3.12: Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten spannungsabhängiger Auswärtsströme der Modellströme. Für die Zeitkonstanten der Aktivierung stehen die Parameter τ_c (I_{TOs}) und τ_e (I_{TOs}), für die der Inaktivierung τ_d und τ_f . Nach Gl. 11 können aus diesen Werten die Zeitkonstanten bei Temperaturen von 36°C, wie sie während der Aufzeichnung spontaner schneller Spikes bestanden, durch Multiplikation mit dem Faktor 0,33 ermittelt werden.

Abb. 3.13 zeigt eine Serie von Stromkurven, die sich durch Anwendung eines typischen Protokolls auf die spannungs- und zeitabhängigen Auswärtsströme der RPV ergeben. Gezeigt wird der Summenstrom aus I_{TOf} und I_{TOs} , eine getrennte Darstellung beider Ströme findet sich im Anhang.

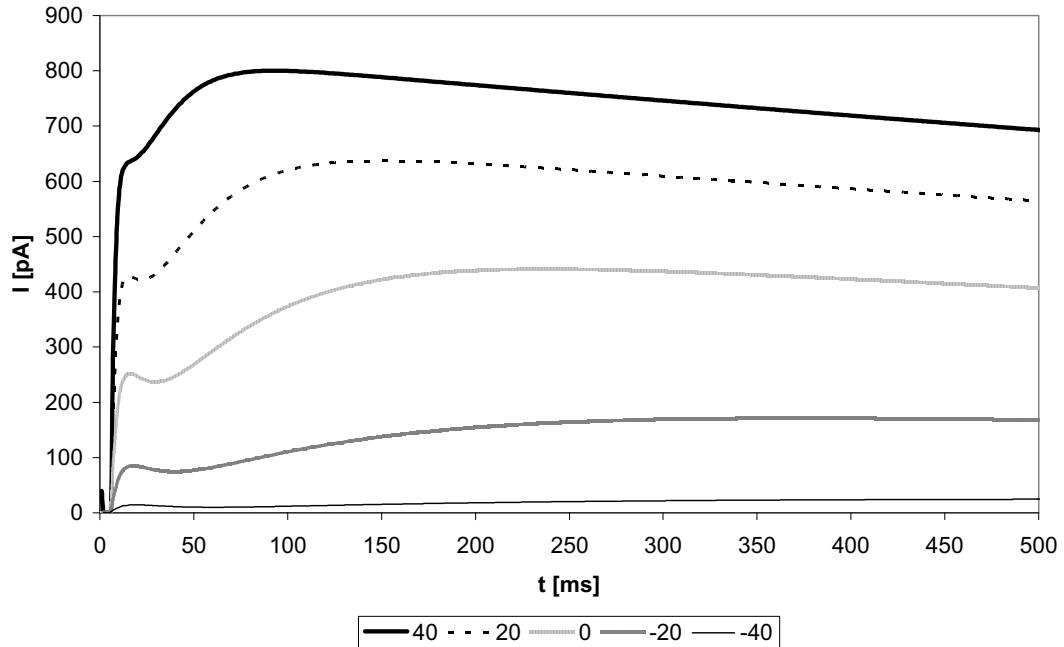


Abb. 3.13: Errechnete Verläufe der summierten Modellströme I_{TOs} und I_{TOf} nach Applikation eines Testpulses mit dem in der Legende angegebenen Testpotenzial (in der Abbildungslegende angegeben in mV), ausgehend von einem Haltepotenzial von -80mV bei Raumtemperatur (20°C).

Der Vergleich der Stromverläufe in Abb. 3.13 mit experimentell ermittelten und in der Literatur veröffentlichten Stromverläufen [62] ergibt eine gute Übereinstimmung, so dass von einer hinreichend guten Abbildung der spannungsabhängigen Auswärtsströme durch die Modellströme ausgegangen werden kann. Im nächsten Schritt wird daher untersucht, inwiefern sich die während des bereits mehrfach dargestellten schnellen Spikes aus Abb. 3.4 fließenden Auswärtsströme mit den Modellströmen rekonstruieren lassen. Aktivierung und Inaktivierung der Auswärtsströme werden in Abb. 3.14 und 3.15 dargestellt. Es zeigt sich in beiden Fällen eine schnelle Aktivierung, allerdings wird auch ersichtlich, dass bereits zu Beginn des Spikes im Fall von I_{TOf} die Inaktivierung ausgeprägt ist, während sie sich für I_{TOs} im mittleren Bereich bewegt, jedoch langsam zunimmt. I_{TOf} ist während des betrachteten schnellen Spikes praktisch vollständig inaktiviert.

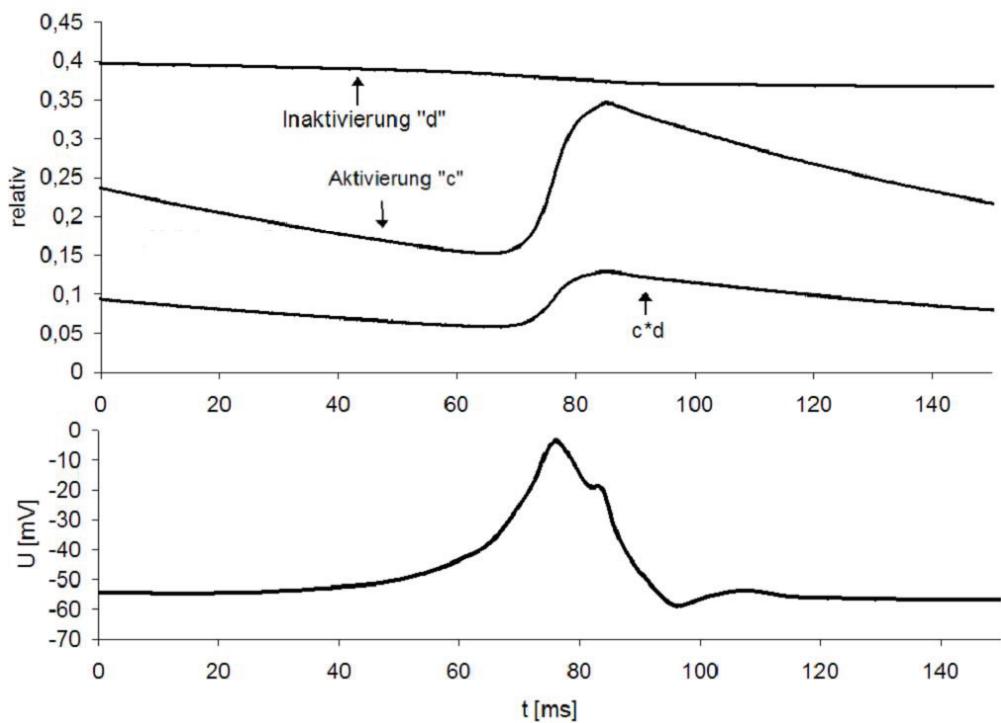


Abb. 3.14: Oberer Teil: Aktivierung und Inaktivierung des langsam spannungsabhängigen Modellstroms I_{TOS} sowie des Produktes beider Parameter. Unterer Teil: Spannungsverlauf. Die angewendeten Zeitkonstanten wurden für eine Temperatur von 36°C berechnet.

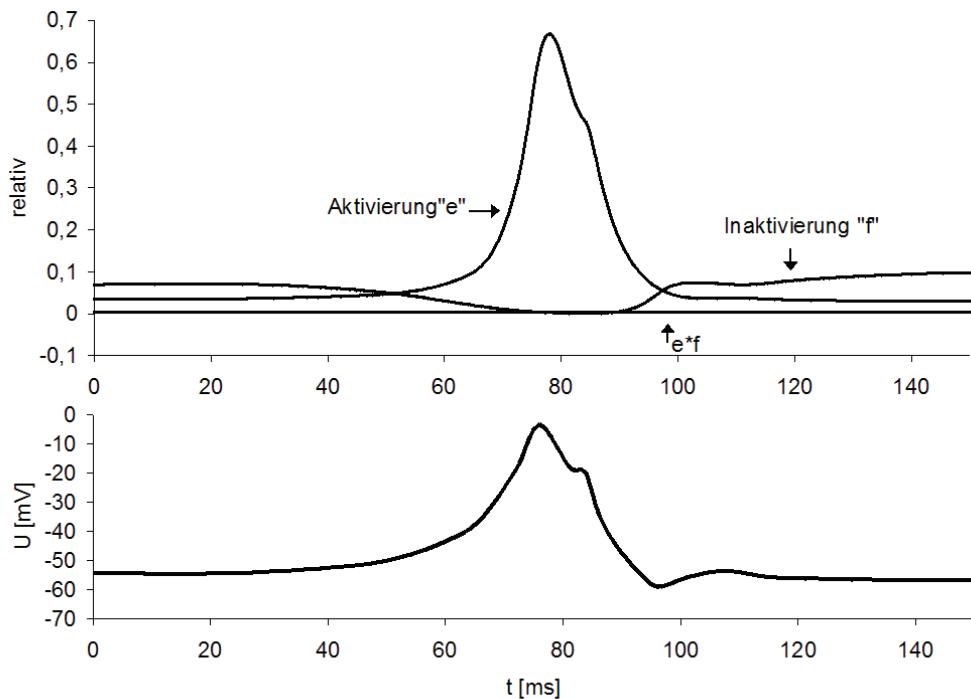


Abb. 3.15: Aktivierung („e“) und Inaktivierung („f“) des schnellen spannungsabhängigen Modellstroms I_{TOF} sowie des Produktes beider Parameter („e*f“) Unterer Teil: Spannungsverlauf. Die angewendeten Zeitkonstanten wurden für eine Temperatur von 36°C berechnet.

Das Ergebnis der Berechnung der Stromamplitude aus den Verläufen der Aktivierungs- und Inaktivierungsparameter zeigt Abb. 3.16. Dort wurde die Summe von I_{TOs} und I_{TOf} gegen den zu erklärenden Auswärtsstrom aufgetragen. Letzterer wurde durch Subtraktion von I_{CaL} vom totalen Ionenstrom ($=I_M$ nach Gl. 4b) errechnet.

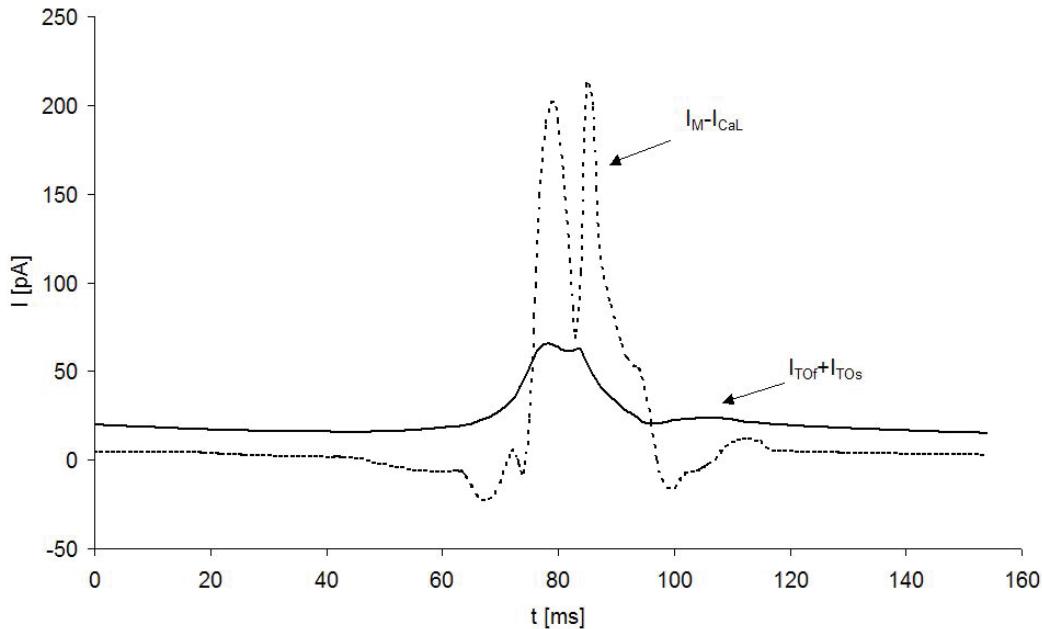


Abb. 3.16 Verlauf der summierten Modellströme I_{TOs} und I_{TOf} während des in Abb. 3.4 gezeigten triphasischen schnellen Spikes, gleichzeitig dargestellt mit dem - wie im Text beschrieben - errechneten notwendigen totalen Auswärtsstrom. Die angewendeten Zeitkonstanten wurden für eine Temperatur von 36°C berechnet.

3.1.4.3 Der nicht-inaktivierende Hintergrundstrom I_{NI}

Der nicht-inaktivierende Hintergrundstrom kann wegen seiner fehlenden Zeitabhängigkeit als direkte Funktion des Membranpotenzials dargestellt werden. Im physiologisch relevanten Bereich zeigt I_{NI} eine Strom-Spannungsbeziehung, die der eines einfachen ohmschen Widerstands entspricht [62, 68]. Entsprechend wird I_{NI} mittels einer linearen Funktion abgebildet, deren einzige Variable die Spannung ist. Die gewählte Gleichung lautet:

$$I_{NI} = U * 0,4G\Omega^{-1} + 33 \text{ pA} \quad (16)$$

Das Membranpotenzial U geht in diesem Fall mit der Einheit Millivolt in die Gleichung ein. Die sich aus Gl. 5 ergebende Strom-Spannungsbeziehung hat einen Anstieg von $4\text{pA}/10\text{mV}$, das Umkehrpotenzial beträgt $-82,5\text{mV}$. Beide Werte weichen von den in der Literatur angegebenen Werten für I_{NI} ab: Der Anstieg ist kleiner, das Umkehrpotenzial negativer als in den genannten experimentellen Arbeiten ermittelt. Der Grund liegt in der hier vorgenommenen Subtraktion eines weiteren Stroms von den publizierten experimentellen Daten. Dabei handelt es sich um den sogenannten Leckstrom, welcher unweigerlich im Rahmen von Patch-Clamp-Messungen durch die Alteration der Zellmembran nach Ruptur durch die Patchpipette auftritt. Dieser Leckstrom ist *in vivo* nicht vorhanden. Daher wurde zur Erstellung des Modellstroms I_{NI} eine Subtraktion des sich bei Annahme eines typischen Shuntwiderstandes von $3*10^{12}\Omega$ ergebenden Leckstroms vorgenommen. Abb. 3.17 illustriert den beschriebenen Korrekturvorgang.

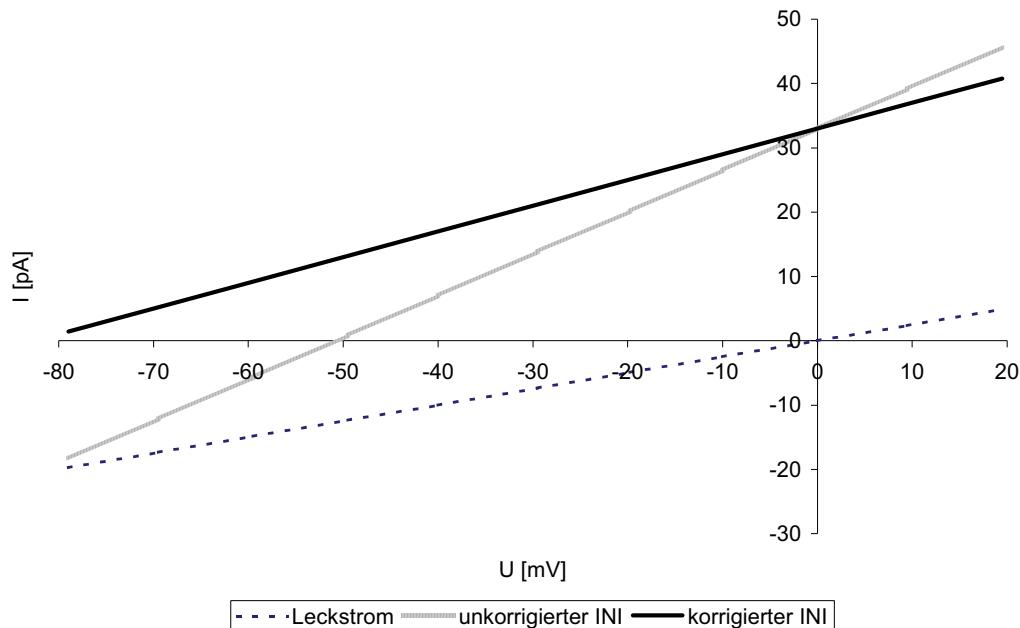


Abb. 3.17: Strom-Spannungsbeziehung der Modellkomponente I_{NI} . Die Zuordnung der Linien ist in der Legende angegeben. Von der aus experimentellen Studien abgeleiteten Strom-Spannungsbeziehung des „unkorrigierten I_{NI} “ wurde ein Leckstrom subtrahiert. Es resultiert beim „korrigierten I_{NI} “ eine Linksverschiebung des Umkehrpotenzials sowie ein flacherer Anstieg.

Aus dem Vorliegen einer linearen Strom-Spannungsbeziehung ergibt sich zwangsläufig eine direkte Widerspiegelung des Potenzialverlaufes durch I_{NI} . Abb. 3.18 zeigt den Verlauf von I_{NI} während des in Abb. 3.4 gezeigten schnellen Spikes. Aus dem Verlauf ergibt sich, dass I_{NI} nur unwesentlich zum Auswärtsstrom während der Repolarisation

schneller Spikes beiträgt. Allerdings kann wegen des nahe dem Ruhepotenzial liegenden Umkehrpotenzials von I_{NI} eine stabilisierende Wirkung auf das Ruhemembranpotenzial angenommen werden.

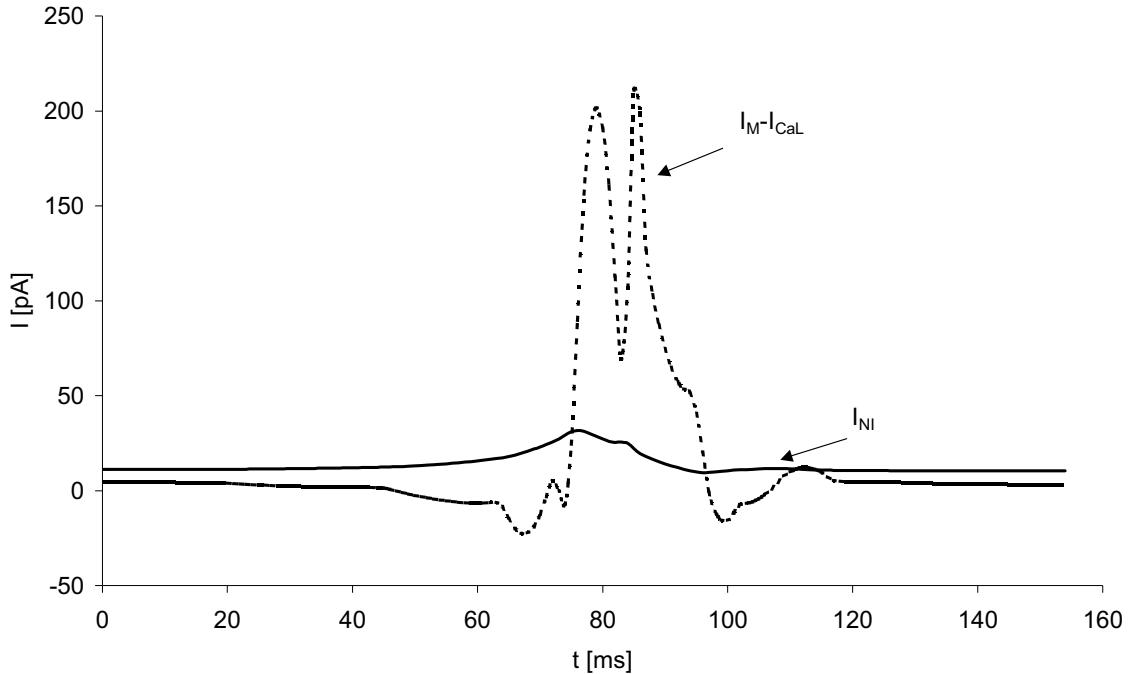


Abb. 3.18: Verlauf und Erklärungskraft von I_{NI} (durchgezogene Linie) für den nach Abzug des notwendigen Einwärtsstroms verbleibenden unerklärten Auswärtsstrom (unterbrochene Linie).

3.1.4.4 Erklärungskraft der summierten Modellstromkomponenten

Ziel der dargestellten Berechnungen von Modellstromkomponenten war es zu untersuchen, ob sich aus den verschiedenen Modellstromkomponenten der dem Potenzialverlauf unterliegende Gesamtstrom (I_M) rekonstruieren lässt.

Die durchgeföhrten Berechnungen zeigten für I_{CaL} eine gute Erklärungskraft bezüglich der schnellen Depolarisation, für die entsprechende Anpassung war lediglich eine Modifikation der maximalen Leitfähigkeit notwendig. Im Gegensatz dazu konnten die modellierten Auswärtsstromkomponenten den errechneten notwendigen Auswärtsstrom während der Repolarisation für die schnellen Spikes nicht vollständig erklären. Zur Darstellung des Endergebnisses der Rekonstruktion wurden alle spannungs- und zeitabhängigen Modellstromkomponenten von I_M subtrahiert (Abb. 3.19). Das Ergebnis zeigt, dass ein Strom mit einer maximalen Amplitude von etwa 150 pA nicht durch die Modellauswärtsströme erklärt wird. Dieser zeigt eine sehr schnelle Aktivierung und

Inaktivierung, darüber hinaus ist eine Einkerbung zu erkennen, welche der auch im Potentialverlauf des triphasischen Spikes sichtbaren Einkerbung entspricht.

Im Zeitraum vor und nach dem schnellen Spike wird darüber hinaus ein sehr viel kleinerer, ebenfalls nicht erklärter Strom errechnet. Dieser ist einwärts gerichtet, entspricht also einem Defizit an vom Modell generierten Einwärtsströmen bzw. einem Überschuss an Auswärtsströmen. Eine Elimination dieses Stromes wäre durch Anpassungen der Modellstromkomponenten ohne weiteres möglich, im Interesse einer strengen Orientierung an den experimentell charakterisierten Ein- und Auswärtsströmen wurde wegen des geringen Differenzbetrages jedoch hierauf verzichtet.

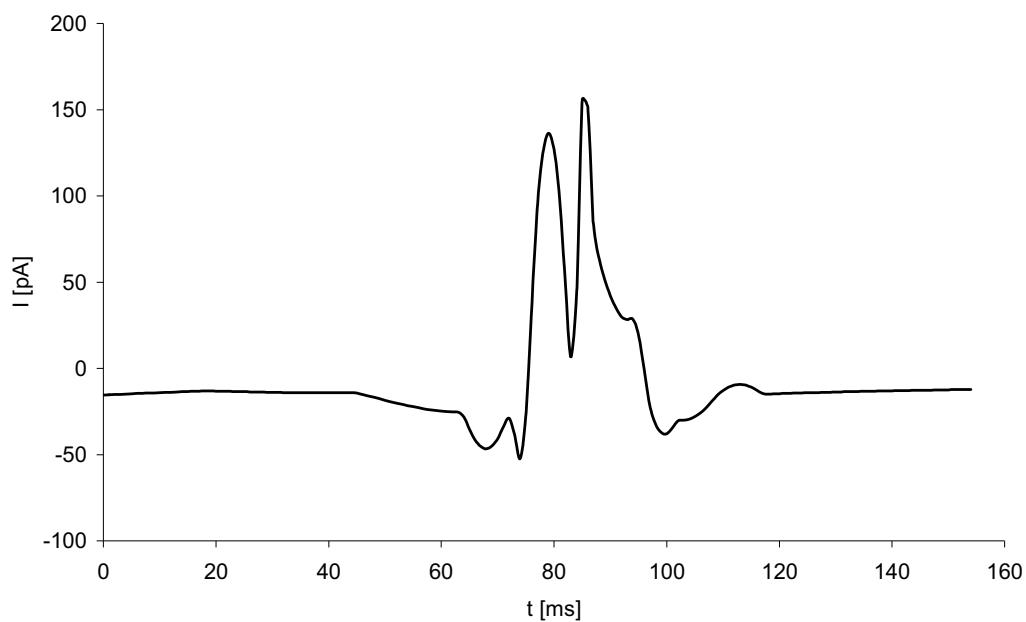


Abb. 3.19: Summe von I_{Tos} , I_{Tof} und I_{CaL} , subtrahiert von I_M . Der sich ergebende Strom I_x entspricht einem nicht von den in Patch-Clamp-Experimenten charakterisierten Strömen erklärten Strom. Der hier dargestellte Strom wird von den bekannten Komponenten der RPV nicht ausreichend erklärt und im Folgenden als I_x bezeichnet.

Zur näheren Charakterisierung des in Abb. 3.19 gezeigten unbekannten Stromes I_x wurde die Amplitude des Stroms gegen das Membranpotenzial aufgetragen. Es ergab sich eine Strom-Spannungsbeziehung mit hysteretischem Charakter. Aus der in Abb. 3.20 gezeigten Darstellung wird ersichtlich, dass im direkten zeitlichen Umfeld der maximalen Depolarisation eine deutliche und sehr schnelle Erhöhung der Leitfähigkeit von I_x stattfindet.

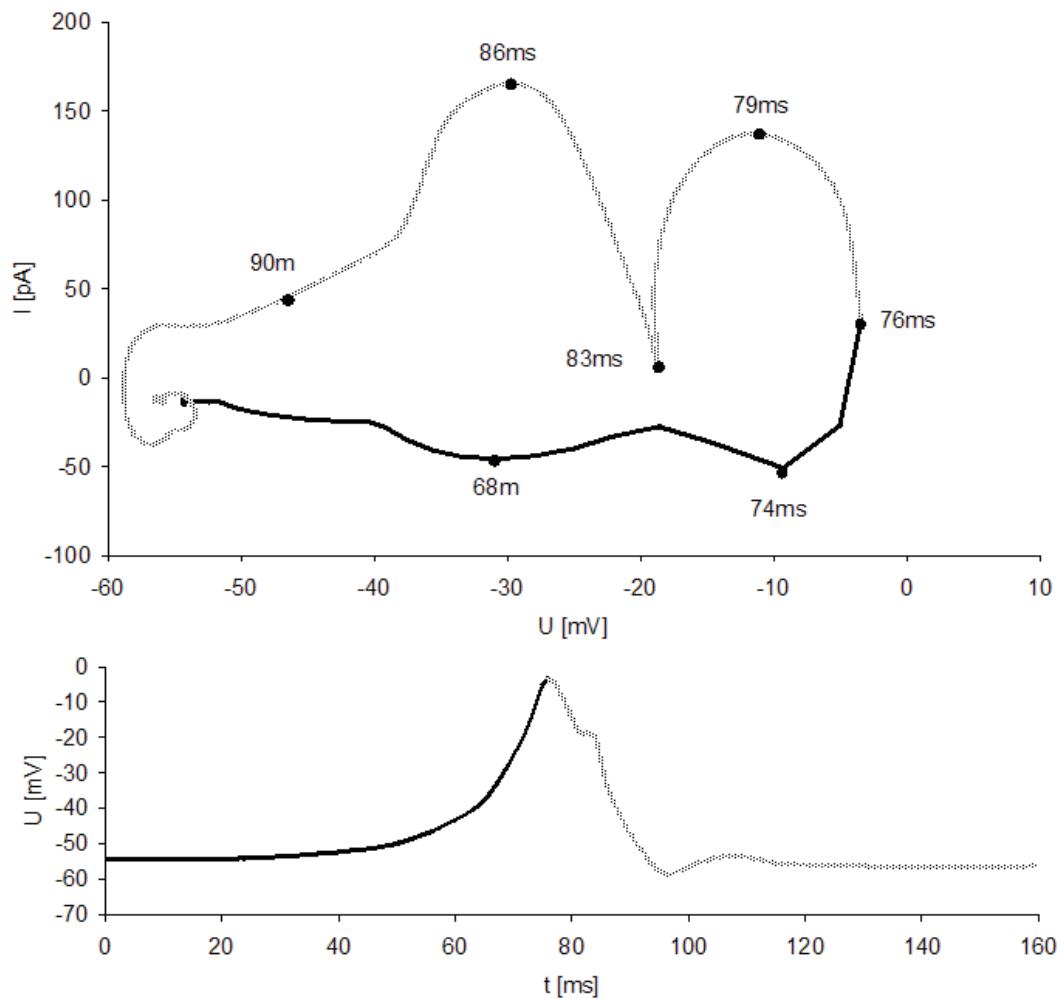


Abb. 3.20: Strom-Spannungsbeziehung des unerklärten Auswärtsstromes I_x während des in Abb. 3.4 gezeigten schnellen Spikes (obere Abbildung). Die untere Abbildung zeigt den Potenzialverlauf mit unterschiedlicher Markierung der Depolarisations- und der Repolarisationsphase. Zur besseren Orientierung über den Verlauf der Strom-Spannungsbeziehung wurden entsprechende Schattierungen für die der Repolarisation bzw. Depolarisation zuzuordnenden Teile gewählt, ferner kennzeichnen die Zeitangaben (in Millisekunden) neben den Markierungen den Zeitpunkt im Verlauf des betrachteten schnellen Spikes, an dem der jeweilige Wert der Strom-Spannungsbeziehung ermittelt wurde.

Die in Abb. 3.20 gezeigte Strom-Spannungsbeziehung ist in ihrem gesamten Verlauf *nicht-eindeutig*, jedem Spannungswert entsprechen mindestens zwei deutlich voneinander verschiedene Stromwerte. Ein derartiger Verlauf der Strom-Spannungsbeziehung ist nur durch eine Änderung der zu Grunde liegenden Leitfähigkeit zu erklären und lässt somit auf die Existenz eines schnellen Aktivierungsprozesses schließen. Die bisherige nicht-Nachweisbarkeit einer I_x -ähnlichen Stromkomponente in Patch-Clamp-Studien lässt sich nur dadurch hinreichend

erklären, dass ein spannungsabhängiger Prozess nicht die einzige notwendige Bedingung der Aktivierung von I_x ist. Grundlage der schnellen Änderung von I_x muss also ein weiterer, nicht-spannungsabhängiger Aktivierungsprozess sein.

Aus theoretischen Erwägungen heraus ist hier zunächst ein kalziumabhängiger Aktivierungsprozess zu diskutieren, der zur Öffnung spannungs- und kalziumabhängiger Kaliumkanäle führt. Die Existenz derartiger Kaliumkanäle in Zellen der RPV gilt als gesichert, ihre qualitative und quantitative Bedeutung im Rahmen der schnellen Spikes der RPV ist jedoch nicht genau charakterisiert [59]. Der Grund hierfür ist, dass die publizierten Patch-Clamp-Studien zu Auswärtsströmen stets in kalziumfreien Medien durchgeführt wurden, um Kontaminationen dieser Ströme mit dem einwärts gerichteten Kalziumstrom auszuschließen.

Im Folgenden soll daher untersucht werden, inwieweit schnelle Änderungen des Kalziums im Rahmen schneller Spikes der RPV zu erwarten sind und als mögliche Ursache der Aktivierung von Auswärtsströmen dienen könnten.

3.1.5 Simulationen der Kalziumkonzentration

Während des Verlaufes eines MSC lassen sich auf Grundlage von Daten des beschriebenen Modells Berechnungen zur Konzentration des freien Kalziums und seiner Verteilung in der Zelle durchführen. Wichtige Parameter solcher Berechnungen stellen der Kalziumeinstrom, das Zellvolumen und seine Aufteilung in Subkompartimente, die Pufferkapazität des Zytosplasmas und die Diffusionsgeschwindigkeit des Kalziums dar. Ein einfaches, in Anlehnung an Standen et al. [105] und Lang et al. [50] entwickeltes Modell zur Simulation der intrazellulären $[Ca^{2+}]$ wurde für diese Arbeit angewendet. Es basiert auf der Annahme eines zentralen Kompartiments und submembranösen Mikrodomänen. Diese Mikrodomänen entstehen dort, wo die durch Kalziumkanäle einströmenden Kalziumionen aus der Pore des Kanals ins Zytosplasma gelangen. Einzelheiten zu Aufbau und Funktion des Modells finden sich im Anhang. Die Ergebnisse der Berechnungen werden in Abb. 3.21 für einen kompletten MSC und in Abb. 3.22 für den bereits in Abb. 3.4 gezeigten Spike dargestellt.

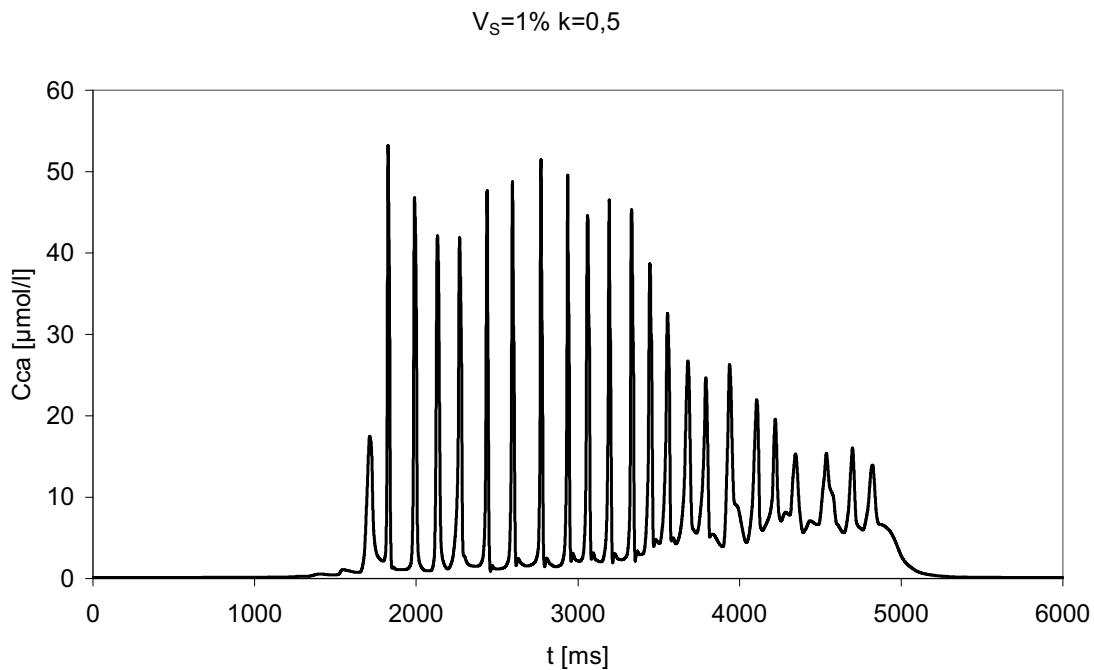


Abb. 3.21: Simulierter Verlauf der Kalziumkonzentration im submembranösen Raum während eines typischen MSC. Die zur Berechnung gewählten Parameter für die Größe des submembranösen Kompartiments V_s und die Geschwindigkeit des Diffusionsausgleiches k sind in der Abbildungsüberschrift angegeben und im Anhang erläutert.

Während der schnellen Spikes kommt es in allen gewählten Parameterkombinationen zu deutlichen Änderungen der Kalziumkonzentration im subzellulären Kompartiment ($[Ca^{2+}]_s$). Der Abstand zwischen der Aktivierung von I_{CaL} und dem Beginn des Konzentrationsanstieges ist um so kürzer, je kleiner der relative Anteil „ r_{vs} “ des submembranösen Kompartimentes am gesamten Zellvolumen und je geringer der durch den Faktor „ k_s “ repräsentierte Konzentrationsausgleich ist. Bei Betrachtung einzelner schneller triphasischer Spikes geht, wie Abb. 3.21 zeigt, der Anstieg von $[Ca^{2+}]_s$ dem Einsetzen von I_x mit sehr kurzem Abstand voraus.

Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass ein Anstieg von $[Ca^{2+}]_s$ in den mikromolaren Konzentrationsbereich plausibel ist. Damit bewegt sich $[Ca^{2+}]_s$ genau in dem Bereich, der für die Aktivierung der $BK_{(Ca)}$ in anderen Präparaten als relevant demonstriert wurde.

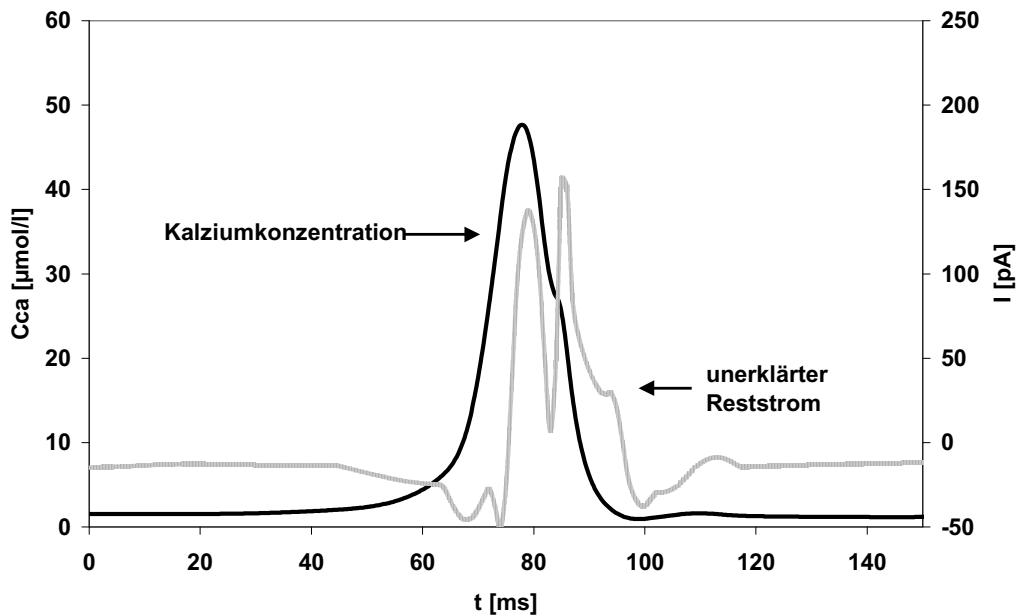


Abb. 3.22: Verlauf der Kalziumkonzentration in einer submembranösen Mikrodomäne, dargestellt gegen die linke Ordinate, parallel aufgetragen gegen den Verlauf des unerklärten Auswärtsstroms I_x . Die Werte für V_S und k entsprechen denen aus Abb. 3.21.

Die Hypothese, dass I_x ein kalziumaktivierter Auswärtsstrom ist, wäre bei Annahme einer ähnlichen Konzentrationsabhängigkeiten wie der des BK(Ca)-Kanals mit den Ergebnissen dieser orientierenden Berechnungen von $[\text{Ca}^{2+}]_s$ vereinbar. Sollten also tatsächlich kalziumabhängige Auswärtsströme eine bislang nicht ausreichend bekannte Rolle im Rahmen der Repolarisation schneller Spikes spielen, so müsste eine Blockade dieser Ströme Veränderungen der schnellen elektrischen Aktivität und letztlich auch der mechanischen Aktivität bewirken. Daher erfolgten im nächsten Schritt experimentelle Untersuchungen zu Effekten von Blockern kalziumabhängiger Kaliumkanäle auf die Spontanaktivität der RPV.

3.2 Pharmakologische Beeinflussung der Spontanaktivität

3.2.1 Native Messungen

Die mit extrazellulären Elektroden abgeleitete elektrische Spontanaktivität lässt analog zu den intrazellulären Messungen einen Wechsel zwischen Ruheperioden und klar abgegrenzten Spikes erkennen.

In Abb. 3.22 werden zwei MSC und die begleitenden spontanen Kontraktionen dargestellt. Die elektrische Aktivität setzt vor Beginn der Kontraktion ein, der Abfall der Kontraktionskraft verläuft annähernd parallel zum Auslaufen der elektrischen Aktivität.

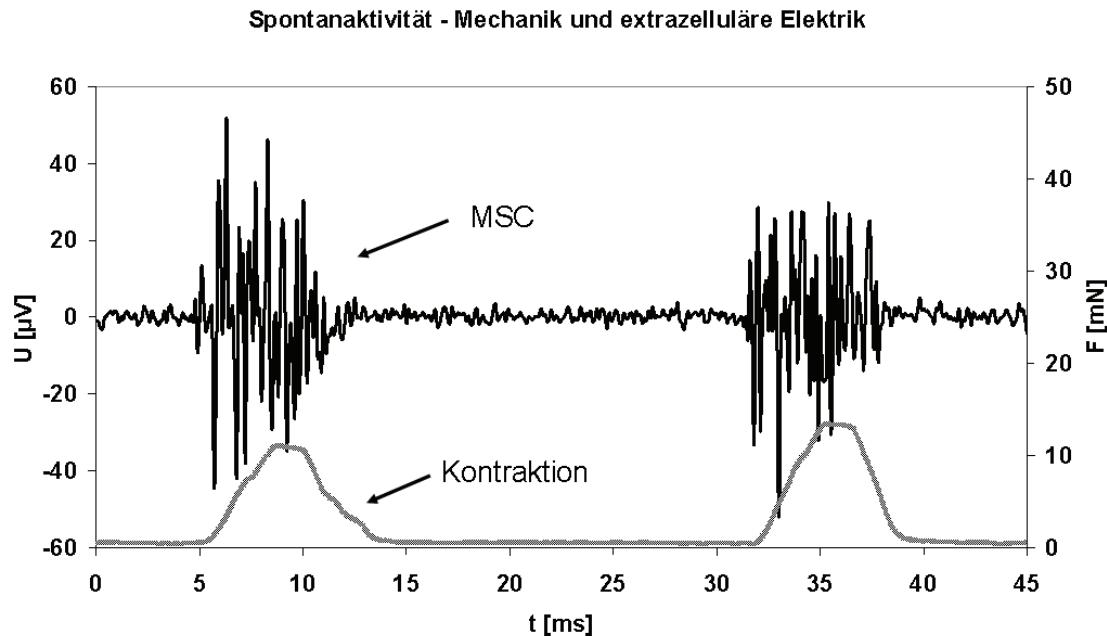


Abb. 3.23: Extrazellulär abgeleitete spontane MSC und Kontraktionen der RPV.

Ein kurzer Ausschnitt des ersten MSC ist in Abb. 3.23 wiedergegeben und einem kurzen Ausschnitt aus einer intrazellulären Registrierung an einem anderen Präparat in gleichem Zeitmaßstab gegenübergestellt. Die mit beiden Methoden ermittelten Darstellungen der schnellen elektrischen Aktivität zeigen offensichtlich große Ähnlichkeiten im zeitlichen Verlauf, so dass angenommen werden kann, dass es sich um Korrelate des gleichen elektrischen Prozesses handelt.

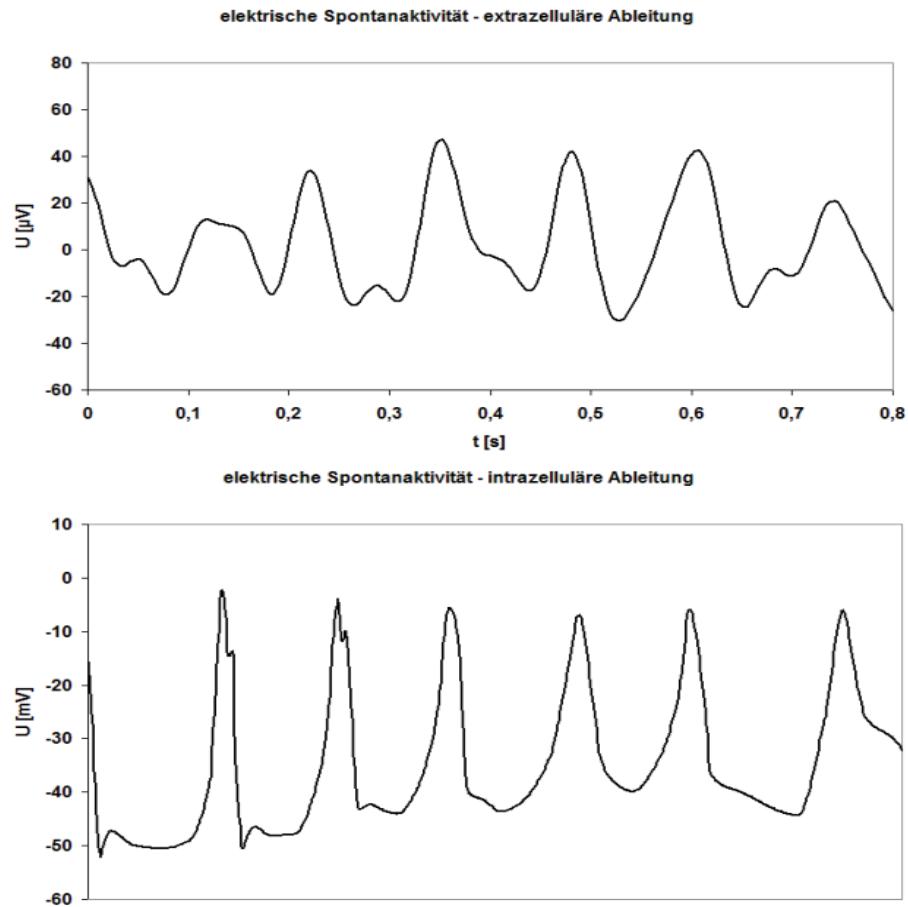


Abb. 3.24: Gegenüberstellung extrazellulär und intrazellulär abgeleiteter schneller elektrischer Aktivität während des MSC. Der untere Graph stellt Daten aus einer intrazellulären Registrierung im identischen Zeitmaßstab parallel zum extrazellulär abgeleiteten Potenzial dar. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der Ordinaten in μ V (oberer Teil) bzw. mV (unterer Teil).

Als weiteren Beleg hierfür zeigt Abb. 3.24 ein Frequenzspektrum (berechnet mit Chart 5.0, ADInstruments). Das Spektrum ist aus den Daten von 23 MSC zusammengesetzt und zeigt einen deutlichen Peak bei 7,5 Hz, entsprechend einem Signal mit einer Periodizität von 133ms. Der Vergleich mit Abb. 3.2 sowie mit den Ergebnissen der Auswertung der schnellen intrazellulär gemessenen Spikes zeigt, dass dieser Peak dem Intervall der intrazellulär gemessenen schnellen Spikes entspricht.

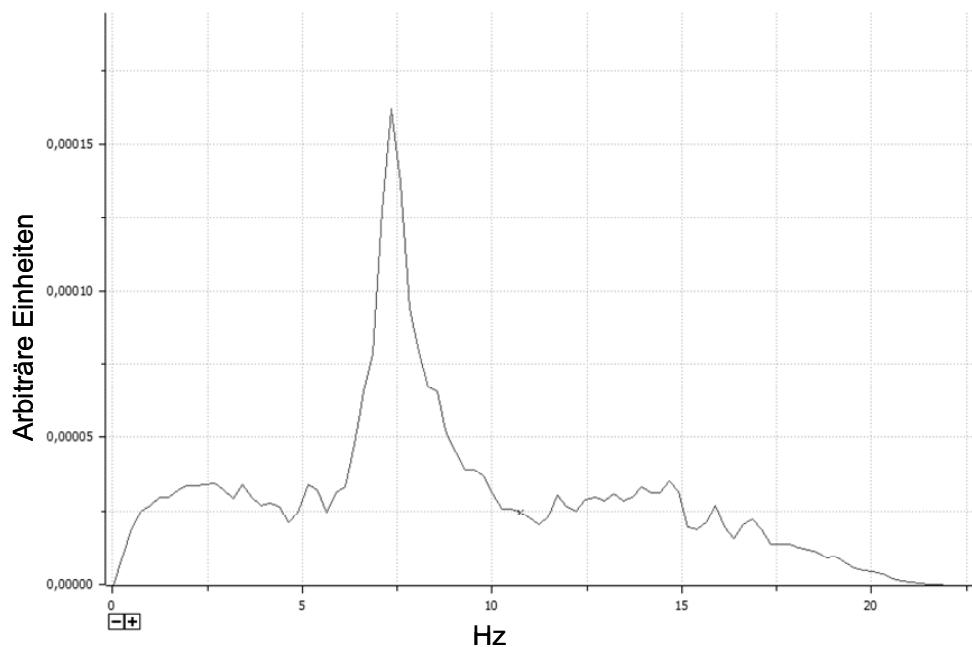


Abb. 3.25: Frequenzspektrum der extrazellulär abgeleiteten elektrischen Aktivität in Hz, dargestellt in arbiträren Einheiten, berechnet mit der im Aufzeichnungsprogramm enthaltenen *fast-fourier-transformation*.

Eine simultane Registrierung der Kraft und extrazellulärer Potenziale wurde durchgeführt, um die Spontanaktivität und ihre Modulation durch verschiedene Substanzen zu untersuchen. Veränderungen von Elektrik und Mechanik werden jeweils für die verschiedenen Substanzen getrennt dargestellt.

Es wurden insgesamt 17 Messungen durchgeführt. In allen zeigte sich eine spontane elektrische und mechanische Aktivität des Präparates. Es zeigten sich zwei wesentliche Grundmuster von Aktivität, eines mit regelmäßig auftretenden und deutlich voneinander abgrenzbaren Aktionen, die jeweils von Phasen elektrischer und mechanischer Inaktivität unterbrochen waren sowie ein zweites, deutlich seltener beobachtetes Muster mit unregelmäßigerer Aktivität ohne Phasen zwischenzeitlicher Inaktivität. Vier Präparate zeigten das unregelmäßige, 13 das regelmäßige Aktivitätsmuster.

Die Zugehörigkeit zu einem dieser Muster bestand jeweils von Beginn der Aufzeichnung an und blieb bis zu deren Ende unverändert. Zusammenhänge zwischen beobachtetem Aktivitätstyp und experimentellen Bedingungen oder Varianten in der Präparation wurden nicht beobachtet.

3.2.2 Effekte von TEA

3.2.2.1 mechanische Veränderungen

Es wurden insgesamt 8 Experimente mit TEA durchgeführt. In allen Experimenten wurden die Effekte von 1mM TEA untersucht, in 5 Experimenten wurden nach Auswaschen die Effekte von 3 und 10mM TEA getestet. Im Vergleich zu den unter Kontrollbedingungen gemessenen Werten führte die Zugabe von TEA in die Perfusionslösung zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der Kontraktionsamplitude, der integrierten Kraft und der Kontraktionsdauer. Gleichzeitig verringerte sich die Kontraktionsfrequenz. Die genannten Effekte waren nach Auswaschen des TEA binnen weniger Minuten vollständig reversibel. Die mechanische Spontanaktivität blieb bis zum maximal getesteten Wert von 10 mM erhalten (Abb. 3.25).

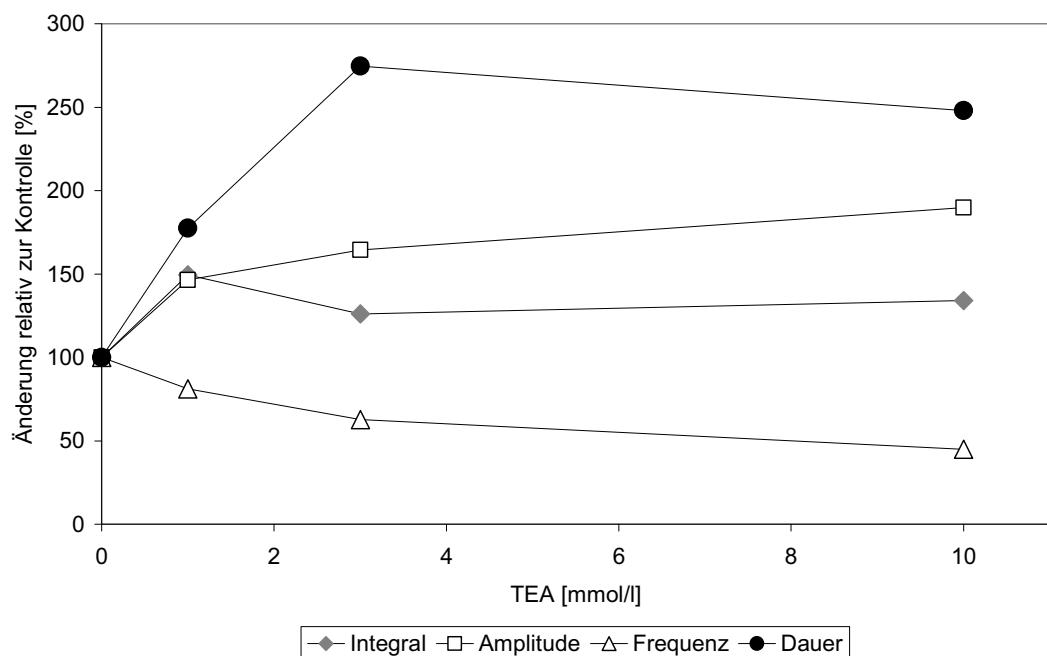


Abb. 3.26: Mechanische Effekte von TEA bei den Konzentrationen 1, 3 und 10 mmol/l. Die Messpunkte sind als Mittelwerte der relativen Änderungen zur Kontrolle angegeben (n=8 für 1mM TEA, n=5 für 3 und 10 mM TEA).

Gegenüber den Kontrollwerten wurde die Frequenz durch TEA deutlich gesenkt, während die mittlere Amplitude und die Dauer der Einzelkontraktionen sowie das Kraftintegral zunahmen. Statistisch signifikant waren die Ergebnisse für die Messgrößen „Integral“, „Amplitude“ und „Frequenz“, wegen der großen Streuung

wurde für den Parameter „Dauer“ keine Signifikanz erreicht, allerdings ist eine Tendenz zur Verlängerung der einzelnen Aktionen deutlich erkennbar. Die einzelnen Werte und die statistische Auswertung zeigt Tabelle 3.4. Eine Dosisabhängigkeit der Wirkung wurde für alle Messgrößen deutlich erkennbar, statistische Signifikanz erreichte sie für die Änderungen von Amplitude und Frequenz der Kontraktionen (s. Tab. 7.2 des Anhangs).

	1 mM (n=8)			3 mM (n=5)			10 mM (n=5)		
	MW	SEM	p	MW	SEM	p	MW	SEM	p
Integral	149,550	13,795	0,090	125,995	45,849	0,032	133,979	68,322	0,053
Amplitude	146,395	15,776	0,022	164,394	36,826	0,019	189,773	41,177	0,010
Frequenz	81,033	5,208	0,008	62,652	2,640	0,010	44,997	5,083	0,001
Dauer	177,506	64,400	0,180	274,619	210,991	0,240	248,020	192,871	0,084

Tab. 3.4: Mechanische Effekte von TEA bei den Konzentrationen 1, 3 und 10 mmol/l (n=8 für 1mM TEA, n=5 für 3 und 10 mM TEA). Angegeben sind jeweils die Mittelwerte der prozentualen Änderungen gegenüber der Kontrolle (MW), der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) sowie die Signifikanz p.

Aus den genannten Ergebnissen folgt, dass es bereits ab Konzentrationen von 1mM, in denen TEA als spezifischer Blocker von $BK_{(Ca)}$ -Kanälen angesehen wird [40], zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Strömen zu Ungunsten letzterer kommt. Ein eindeutiger Hinweis hierauf ist die deutliche Zunahme der Kontraktionskraft, die nur durch eine Zunahme der Kalziumströme erklärbar ist, wie sie zu erwarten ist, wenn repolarisierende Ströme pharmakologisch blockiert werden. Konkret würde dies am ehesten der Reduktion eines repolarisierenden (kalziumabhängigen) Kaliumstromes entsprechen.

3.2.2.2 elektrische Veränderungen

Den genannten Veränderungen der Mechanik entsprechen dosisabhängige Veränderungen der elektrischen Spontanaktivität. Abb. 3.26 zeigt die stark alterierte Konfiguration der Einzelspikes bei Konzentrationen von 10mmol/l im Vergleich zu denen bei 1 mmol/l. In Konzentrationsstufen von 1 und 3 bewirkt TEA an den untersuchten Präparaten vor allem eine deutlich höhere Synchronisierung der

extrazellulär abgeleiteten MSC, eine Zunahme der Amplituden sowie eine leichte Verlangsamung des Auftretens schneller Spikes.

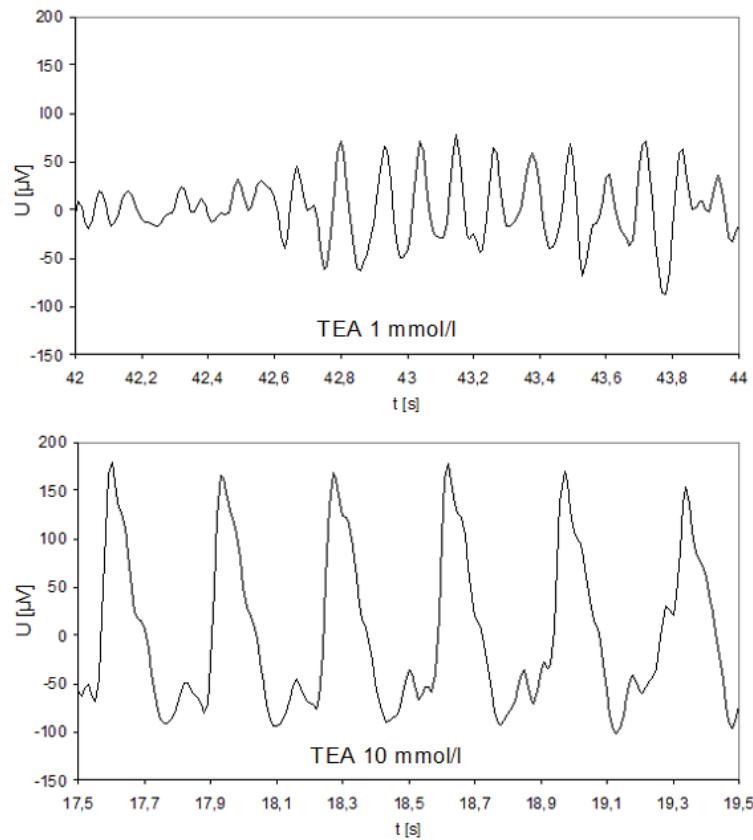


Abb. 3.27: Elektrische Effekte von TEA, extrazelluläre Ableitung. Gegenüber der nativen Messung zeigt sich bereits bei einer Konzentration von 1mmol/l eine zunehmende Synchronisierung und Zunahme der Amplituden. Bei 10mmol/l ist die Spikefrequenz deutlich reduziert, die Amplituden stark erhöht.

3.2.3 Effekte von Charybdotoxin

3.2.3.1 mechanische Veränderungen

Es wurden 4 Experimente mit CTX durchgeführt. Die Zugabe von CTX in den Konzentrationsstufen 5, 45 und 250 nM bewirkte ab Konzentrationen von 45 nM nach wenigen Minuten eine signifikante Zunahme der Kontraktionsamplitude sowie des Kraftintegrals bei gleichzeitiger Abnahme der Frequenz. Auch die Kontraktionsdauer zeigte eine – wenn auch nicht statistisch signifikante – Tendenz zur Zunahme (Tab. 3.5 und Abb. 3.27). Eine Dosisabhängigkeit der Wirkung wurde für alle Messgrößen erkennbar, statistische Signifikanz erreichte sie lediglich für die Änderungen von Kraftintegral und Kontraktionsamplitude (s. Tab. 7.3 des Anhangs).

	5 nM			45 nM			250 nM			p
	MW	SEM	p	MW	SEM	p	MW	SEM		
Integral	101,607	5,594	0,700	117,080	7,075	0,070	181,113	43,219	0,003	
Amplitude	103,000	2,000	0,200	131,909	10,457	0,038	168,553	12,618	0,001	
Frequenz	87,532	6,137	0,100	66,584	5,397	0,030	61,967	2,912	0,001	
Dauer	110,181	9,304	0,350	113,523	6,652	0,130	128,485	9,920	0,064	

Tab. 3.5: Mechanische Effekte von CTX bei den Konzentrationen 5, 45 und 250 nmol/l (n=5 für 5 und 45nM CTX, n=8 für 250 nM CTX). Angegeben sind jeweils die Mittelwerte der prozentualen Änderungen gegenüber der Kontrolle (MW), der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) sowie die Signifikanz p.

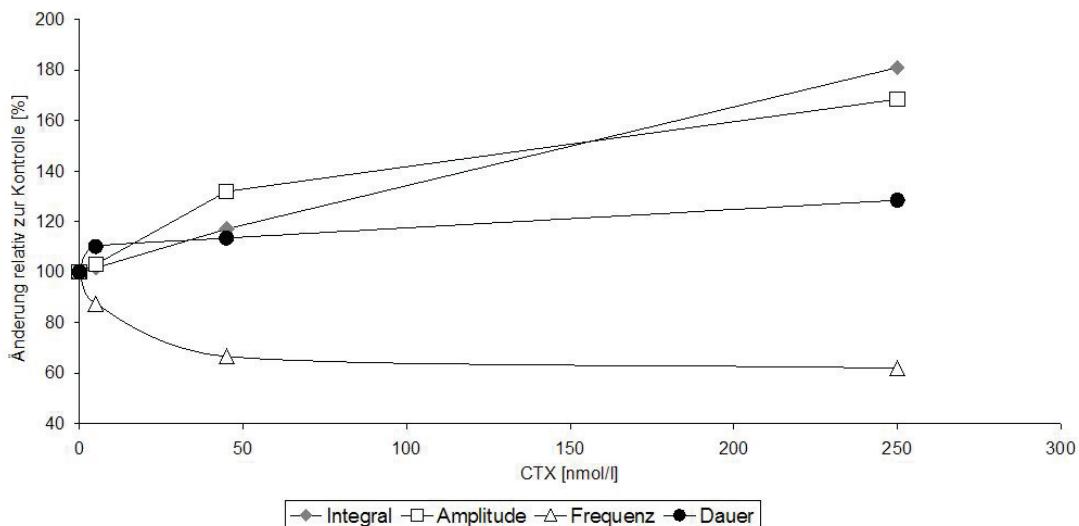


Abb. 3.28: Mechanische Effekte von CTX bei den Konzentrationen 5, 45 und 250 nmol/l. Die Messpunkte sind als Mittelwerte der relativen Änderungen zur Kontrolle angegeben.

3.2.3.2 elektrische Veränderungen

Charybdotoxin führt – ähnlich wie TEA – zu einer Verlängerung der einzelnen MSC und zu einer Zunahme der MSC – Amplituden. Gleichzeitig kommt es zu einer Verlängerung des Spike-Intervalls und dem ebenfalls für TEA beschriebenen Effekt einer Verbesserung der Abgrenzbarkeit einzelner Spikes innerhalb eines MSC (Abb. 3.28).

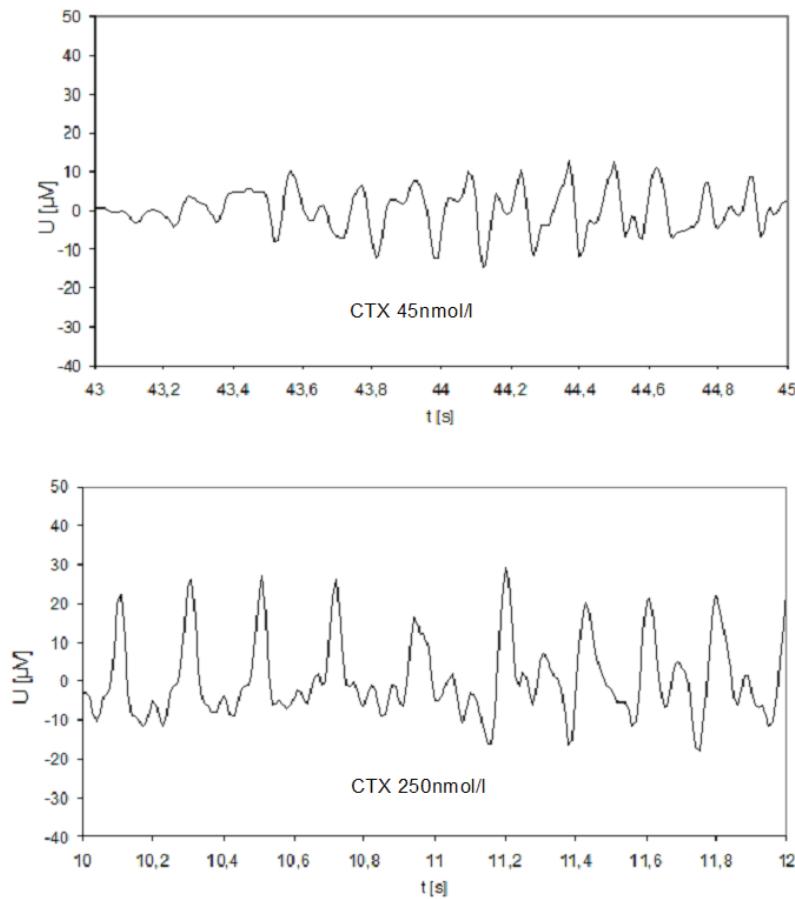


Abb. 3.29: Elektrische Effekte von CTX, extrazelluläre Ableitung. Gegenüber der nativen Messung (oberes Bild) zeigt sich ab einer Konzentration von 45nmol/l eine zunehmende Synchronisierung und Zunahme der Amplituden. Bei 250nmol/l (unteres Bild) ist die Spikefrequenz deutlich reduziert, die Amplituden stark erhöht.

3.2.4 Wirkung von 4-AP

3.2.4.1 mechanische Veränderungen

Es wurden 5 Experimente mit 4-AP durchgeführt. Die Zugabe von 4-AP in den Konzentrationsstufen 0,3, 1 und 3 mmol/l bewirkte nach wenigen Minuten eine signifikante Zunahme der Kontraktionsamplitude sowie des Kraftintegrals bei gleichzeitiger Abnahme der Frequenz. Die Effekte auf Kontraktionsfrequenz und Kontraktionsdauer waren bereits ab einer Konzentration von 0,3 mmol/l statistisch signifikant, die Änderungen von Amplitude und Kraftintegral erst ab 3 mmol/l (Tab. 3.6). Eine Dosisabhängigkeit der Wirkung von 4-AP ist tendenziell deutlich erkennbar, statistische Signifikanz erreichte sie lediglich für die Veränderungen von Kraftintegral

und Kontraktionsdauer (s. Tab. 7.4 des Anhangs). Alle Wirkungen waren nach längerem Auswaschen weitgehend reversibel.

	0,3 mM (n=5)			1 mM (n=5)			3 mM (n=5)		
	MW	SEM	p	MW	SEM	p	MW	SEM	p
Integral	173,185	35,347	0,110	258,378	79,565	0,110	377,705	71,869	0,018
Amplitude	184,045	34,205	0,070	230,437	54,371	0,074	302,459	70,890	0,046
Frequenz	62,852	9,608	0,018	42,991	9,996	0,005	31,426	9,729	0,002
Dauer	150,462	17,414	0,044	242,981	45,717	0,035	425,998	80,093	0,015

Tab. 3.6: Mechanische Effekte von 4-AP bei den Konzentrationen 0,3, 1 und 3 mmol/l (n=5). Angegeben sind jeweils die Mittelwerte der prozentualen Änderungen gegenüber der Kontrolle (MW), der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) sowie die Signifikanz p.

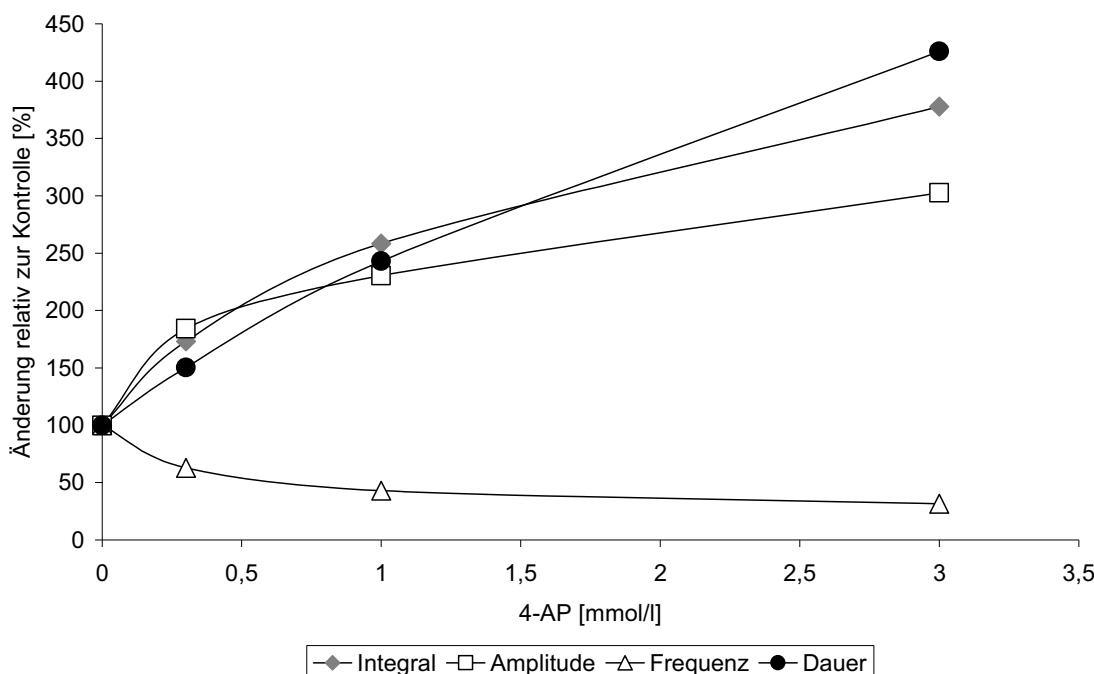


Abb. 3.30: Mechanische Effekte von 4-AP bei den Konzentrationen 0,3, 1 und 3 mmol/l. Die Messpunkte sind als Mittelwerte der relativen Änderungen zur Kontrolle angegeben.

3.2.4.2 elektrische Veränderungen

Die Wirkungen von 4-AP auf die elektrische Aktivität fasst Abb. 3.29 zusammen. Wie bei den zuvor beschriebenen Substanzen kommt es zu einer ausgeprägten Rhythmisierung der elektrischen Aktivität. Eine Abnahme der Frequenz der schnellen Spikes ließ sich bis hin zu Dosen von 3mM, die bereits ausgeprägte mechanische Effekte erzeugen, nicht beobachten, es kam im Gegenteil eher zu einer Abnahme der Abstände zwischen einzelnen Spikes.

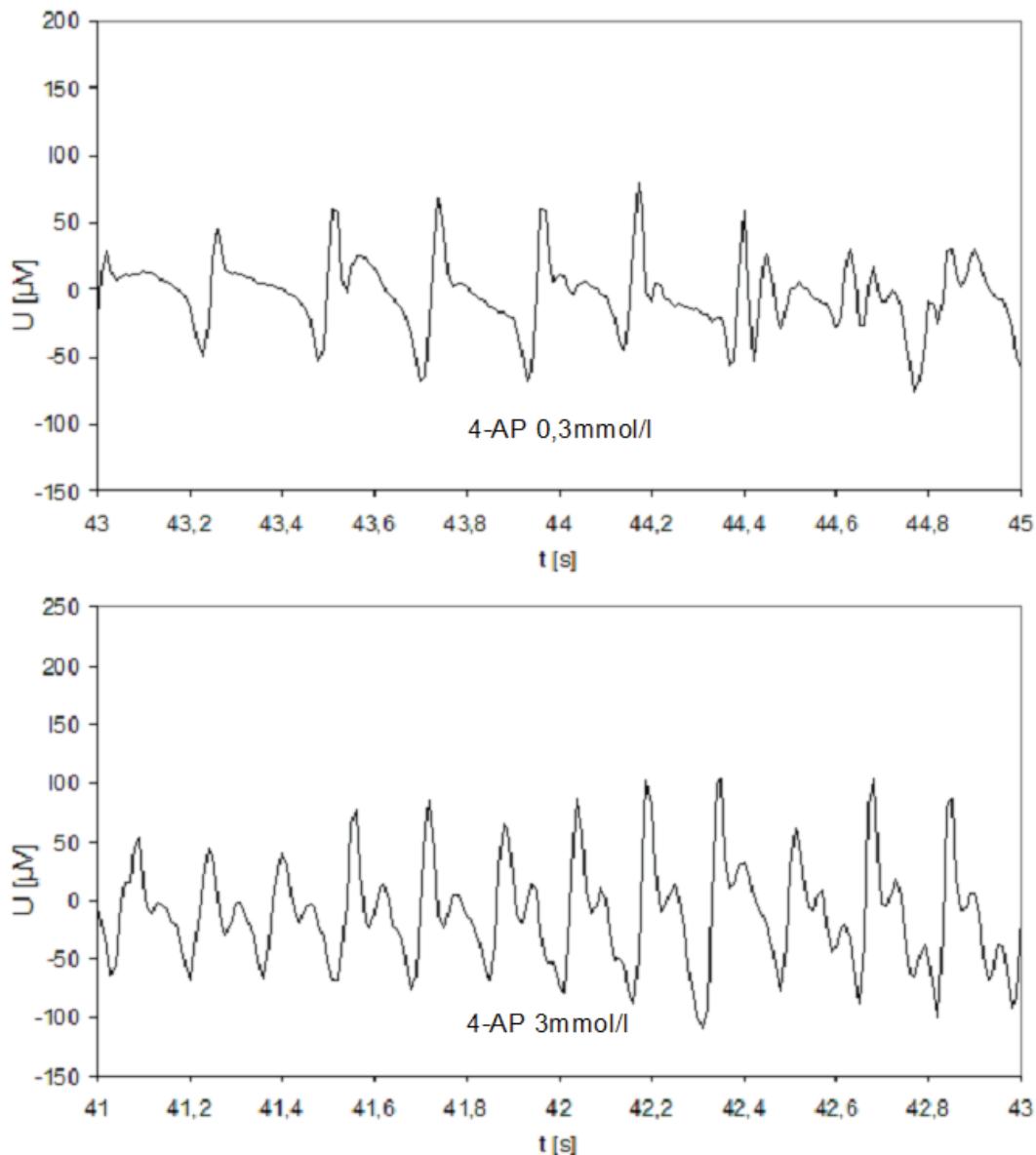


Abb. 3.31: Elektrische Effekte von 4-AP, extrazelluläre Ableitung. Gegenüber der nativen Messung zeigt sich ab einer Konzentration von 0,3mmol/l (oberes Bild) eine zunehmende Synchronisierung und Zunahme der Amplituden. Bei 3mmol/l (unteres Bild) sind Spikefrequenz und Amplituden erhöht.

3.2.5 Effekte von Apamin

3.2.5.1 mechanische Veränderungen

Die Zugabe von Apamin in Konzentrationen von 100 nM zeigte nach Ausmessung der Parameter Kontraktionsamplitude, Kontraktionsfrequenz und Kraftintegral eine reproduzierbare und signifikante Veränderung in der mechanischen Aktivität.

3.2.5.2 elektrische Veränderungen

Angesichts des offensichtlichen Fehlens von Effekten auf die Mechanik ist mit Veränderungen der Elektrik nicht zu rechnen, die gemachten Beobachtungen ergaben hierfür übereinstimmend ebenfalls keinen Anhalt.

4 Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert und in einen Zusammenhang mit den bisher zum Thema publizierten Daten und Konzepten gestellt. Zunächst wird dabei auf die Modellbildung eingegangen, anschließend auf die experimentellen Daten.

4.1 Ergebnisse der Modellbildung

In den durchgeführten Modellberechnungen konnten die Verläufe der bekannten Stromkomponenten der RPV näher charakterisiert werden. Darüber hinaus ergaben sich Hinweise darauf, dass mindestens eine weitere, bislang nicht identifizierte, Stromkomponente an der Repolarisation schneller Spikes beteiligt ist. Bevor die Ergebnisse der Modellbildung geordnet nach den einzelnen Stromkomponenten diskutiert werden, wird auf methodische Aspekte des gewählten Ansatzes zur Modellbildung eingegangen.

4.1.1 Methodische Gründe für die Entstehung des unerklärten Differenzstroms

Aus der Verrechnung zwischen notwendigen und von den Modellströmen tatsächlich entwickelten Strömen ergibt sich eine aus dem Modell direkt ableitbare Differenz. Dieser Reststrom wurde bereits im vorangehenden Abschnitt dargestellt. I_x ist immer dann besonders groß, wenn die Modellströme, die ihrerseits den experimentell an Einzelzellen charakterisierten Strömen entsprechen, stark vom errechneten notwendigen Strom I_M abweichen. Für diese Abweichung gibt es zwei mögliche Interpretationen:

4.1.1.1 Abweichungen durch das Verfahren der Berechnung von I_M

Die Berechnung von I_M erfolgte auf Grundlage von Datensätzen von mit durch Mikroelektrodenmessungen ermittelten Potenzialverläufen, wie sie durch die von Small et al. [81] beschriebene Methode registriert worden sind. Abweichungen der Registrierungen von den wahren Werten dieser Potenzialverläufe würden Ströme ergeben, die nicht den tatsächlich fließenden entsprächen.

Derartige Abweichungen wären einerseits durch die bekannten Schwierigkeiten in der Kalibrierung der hochohmigen Mikroelektroden und der Kompensation von Spitzenpotenzialen denkbar [106], andererseits durch Schädigungen der Integrität der jeweils abgeleiteten Zelle. Insbesondere durch Shuntströme, die im Bereich der Insertionsstelle der Mikroelektrode in die Zelle auftreten, fallen die registrierten Potenzialänderungen geringer aus als die realen [107].

Um auszuschließen, dass diese theoretisch zu erwartenden Unterschätzungen des Membranpotenzials Auswirkungen auf die generierten Modellströme und ihre Erklärungskraft für den Gesamtstrom haben, wurde die bereits im Methodenteil angesprochene Spreizungsfunktion auf die Daten angewendet und somit eine Korrektur der Shuntströme vorgenommen.

Eine weitere mögliche Erklärung für Abweichungen von I_M vom wahren Wert wäre, dass die in der Ableitung von Gl. 4b aus Gl. 4a festgelegte Bedingung (Annahme des Fehlens von Längsströmen) nicht zutrifft. Voraussetzung für das Auftreten dieser Längsströme wären Potentialdifferenzen zwischen verschiedenen Gewebsabschnitten und letztlich zwischen benachbarten Zellen. Der zum Ausgleich dieser Potenzialdifferenzen notwendige Längstrom könnte z.B. über niederohmige interzelluläre Verbindungen („Gap-Junctions“) fließen.

In diesem Fall würde zwar der Verlauf des kapazitiven Stromes korrekt errechnet. Allerdings würde der Betrag dieses Stromes nicht allein dem von I_M , sondern dem der Summe aus I_M und dem Längstrom I_L entsprechen.

Zur Abschätzung des hierdurch zu erwartenden Effektes kann die folgende hypothetische Situation herangezogen werden: Für eine bestimmte Potenzialänderung, die durch Ströme an einem Membranabschnitt erzeugt werden soll, dessen Umgebung rein passiv als elektrische Kapazität in Erscheinung tritt, müssen deutlich höhere Ströme fließen, als für die Umladung des eigentlich betrachteten Abschnittes notwendig wären. Der Grund ist, dass Teile der durch die lokalen Ionenkanäle erzeugten Ströme als Längsströme in die Umladung der umgebenden Membrankapazität abfließen. Ähnlich ist die Situation, wenn angrenzende Bereiche zwar elektrisch aktiv sind, jedoch keine vollständige Synchronisation zeigen.

Während der Ableitung des Membranpotenzials werden diese Prozesse nicht unmittelbar erkennbar. Allerdings ergeben sich bei der Ableitung von Potenzialen an Abschnitten, die mit großen passiven Kapazitäten verbunden sind, Potenzialänderungen

mit kleineren Amplituden und langsameren Geschwindigkeiten, als wenn nur die Kapazität im aktiven Bereich umgeladen werden muss, da die lokal erzeugten Ströme von der jeweiligen Ausstattung mit Ionenkanälen abhängen und somit als weitgehend konstant angesehen werden können.

Golenhofen et al. [35] gehen auf dieses Problem im Kontext von Mikroelektrodenmessungen an der Portalvene des Meerschweinchens ein. In der genannten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die intrazellulär abgeleiteten schnellen Spikes mit den größten Amplituden auch die mit der geringsten Dauer waren. Dieser Zusammenhang wurde im Sinne der o.g. Erwägungen dahingehend interpretiert, dass während der kürzesten und höchsten Spikes die Synchronisation im Gewebe am besten, die Längsströme am kleinsten und darum der Anteil der lokal erzeugten Ströme, welcher in die Umladung der Membrankapazität fließen kann, am größten ist.

Ob und in welchem Umfang Längsströme während der schnellen Spikes der RPV auftreten, ist also für die Berechnung von I_M relevant. Für die Beantwortung dieser Frage ist entscheidend, inwieweit sich die schnellen elektrischen Erregungen im Organverband der RPV ausbreiten und wie hoch ihr Synchronisationsgrad ist.

Obwohl der genaue Modus der Ausbreitung von Multi-Spike-Komplexen (MSCs) nicht bekannt ist, lassen sich sehr wohl Aussagen über die Ausbreitung der schnellen Spikes treffen: In der Auswertung der Einleitungsphase wurde gezeigt, dass bereits früh im Ablauf der MSCs, noch vor Auftreten des ersten „echten“ Spikes, stufen- bzw. wellenförmige Depolarisationen auftreten, dass also die Fortleitung der Erregung durch elektrotonisch fortgeleitete schnelle Spikes getragen wird.

Der Nachweis dieser elektrotonischen Fortleitung ist ein Zeichen für das Auftreten von Längsströmen in den Randbereichen des elektrisch aktiven Gewebeabschnitts. Geht man davon aus, dass einzelne MSCs sich von einer Zelle zur jeweils benachbarten fortpflanzen, dass also eine „Erregungsfront“ existiert, die einzelne Zellen während der Erregungsausbreitung überquert, so wäre die an einem Ort abgeleitete elektrische Aktivität mit ihrem Übergang zwischen Einleitungsphase und Phase der schnellen Spikes mit dem räumlichen Überqueren des Ableitpunktes durch die Erregungsfront gleichzusetzen. Die weitere Entwicklung der Form der schnellen Spikes während des MSCs zeigt, dass diese im mittleren Abschnitt ihre größten Amplituden und ihre kürzeste Dauer aufweisen. Die analysierten Spikes wurden entsprechend aus diesem Abschnitt gewählt.

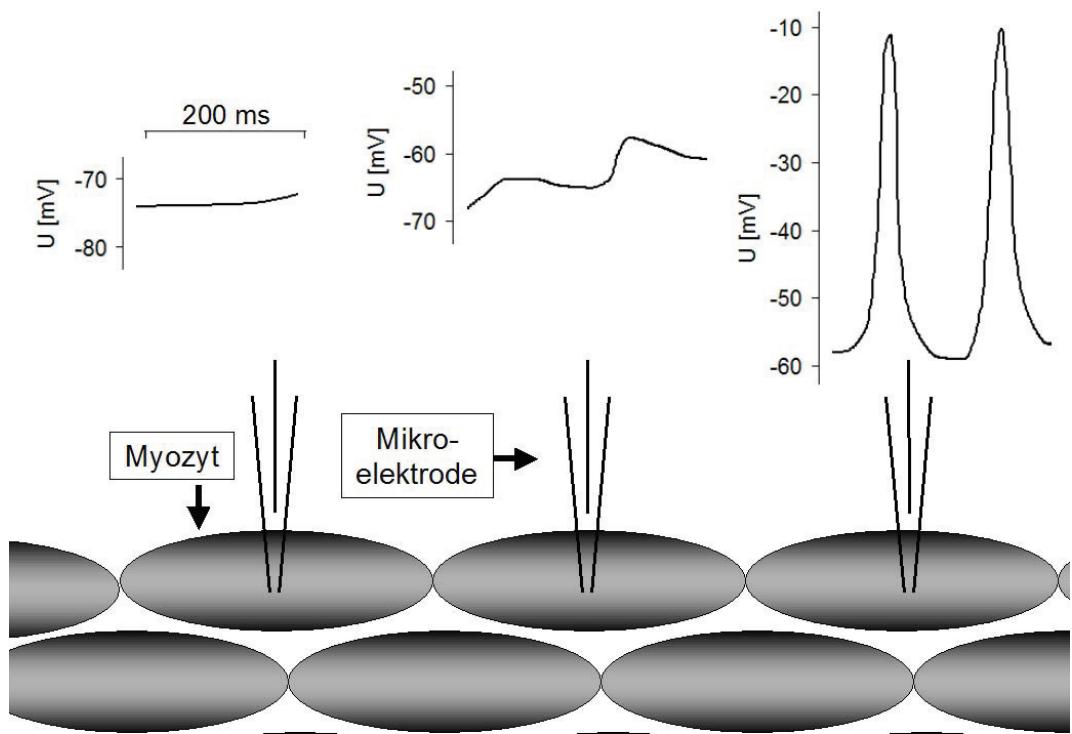


Abb. 4.1: Die u.a. in Abbildung 3.2 gezeigten, an einem einzigen Punkt des Präparates registrierten Multi-Spike-Komplexe breiten sich entlang der Längsachse der RPV aus. Würde nicht an einem Punkt über längere Zeiträume sondern an mehreren Punkten über einen kurzen Zeitraum das Membranpotenzial gemessen, würde sich prinzipiell das hier gezeigte Bild darstellen: Die Ausbreitung der Erregung erfolgt von rechts nach links. Während an einem Punkt bereits schnelle Spikes gemessen werden (rechter Bildteil), zeigen sich in einem Abstand lediglich unterschwellige, elektrotonisch fortgeleitete Potenzialschwankungen, in deren Verlauf jedoch Potenzialschwankungen mit einem zeitlichen Ablauf erkennbar sind, der dem der schnellen Spikes entspricht (mittlerer Bildteil). Wird der Abstand weiter vergrößert sind die Potenzialverläufe der schnellen Spikes so stark gedämpft, dass nur noch eine langsame kontinuierliche Depolarisation erkennbar ist (linker Bildteil). Bei den hier gezeigten Potenzialverläufen handelt es sich nicht um tatsächlich gemessene, mit der Abbildung soll vielmehr die räumliche Situation während einer Momentaufnahme der elektrischen Aktivität illustriert werden.

Da die in diesem Abschnitt auftretenden Spikes im Vergleich mit anderen, unter den genannten Aspekten theoretisch deutlich schlechter synchronisierten Spikes (wie z.B. den ersten Spikes zu Beginn des MSC), nur leichtgradige Formabweichungen zeigen, scheint die Bedeutung der synchronisierenden Längsströme auf Form und Dauer der schnellen Spikes und Amplitude insgesamt eher gering zu sein. Hinweise auf die Existenz eines Längsstromes ergeben sich aus den Modellberechnungen zu Beginn der Depolarisation der schnellen Spikes. Der Strom, welcher das Membranpotenzial bis zur Aktivierungsschwelle von I_{CaL} treibt (entsprechend dem Fehlbetrag zwischen I_{CaL} und

I_M während der Depolarisation in Abb. 3.11), kann am ehesten durch einen aus benachbarten, kurzzeitig vor der betrachteten Zelle depolarisierenden Zellen stammenden, Längsstrom erklärt werden.

Grundsätzlich sind unter den o.g. Aspekten sowohl Unter- als auch Überschätzungen der tatsächlich fließenden Ströme möglich. Eine Überschätzung würde auftreten, wenn die schnelle Depolarisation einer Zelle von Längsströmen anderer Zellen unterstützt wird, eine Unterschätzung dann, wenn eine Zelle Teile des von ihr erzeugten Einwärtsstromes als depolarisierenden Längsstrom an andere Zellen abtritt.

Da Amplitude und Verlauf der einzelnen monophasisch repolarisierenden Spikes sowohl in allen Präparaten als auch während der Phase der schnellen Spikes praktisch identisch waren, ist weder davon auszugehen, dass sich im Verlauf eines MSC der Status einer Zelle von der einer Längsstrom empfangenden zu der einer Längsstrom erzeugenden wandelt, noch dass es wesentliche Unterschiede im Spannungsverlauf zwischen beiden Typen von Zellen gibt. Hieraus folgt unmittelbar, dass die durch den Spannungspuls in den jeweiligen Zellen erzeugten gesamten Membranströme in der Mittlung über mehrere Zellen dem für Umladung der Kapazität einer einzelnen Zelle aus dem Differential des Potenzialverlaufes berechneten Strom entsprechen.

Anders formuliert muss in einem Zellverband bei einem in mehreren Zellen identischen Potenzialverlauf zu jedem Zeitpunkt die Summe aller Längsströme Null und die Summe aller lokal erzeugten Membranströme mit der aller die Membrankapazität umladenden Ströme identisch sein.

Hieraus ergibt sich, dass die gewählte Methode, mit der letztlich der Membranen umladende Strom ermittelt wird, nicht unbedingt für jede einzelne Zelle, jedoch insgesamt repräsentativ die fließenden Ströme beschreibt.

4.1.1.2 Abweichungen der Modellstromkomponenten

Der sich aus dem Spannungsverlauf ergebende Gesamtstrom weicht von dem in der vorliegenden Arbeit durch Summation der Modellstromkomponenten modellierten Gesamtstrom ab.

Wird diese Abweichung in Form des berechneten Differenzstroms I_x über dem Membranpotenzial aufgetragen, ergibt sich ein interessanter Verlauf mit einer

ausgeprägten Hysterese. Die Aktivierung eines kalziumabhängigen Kaliumstroms erscheint die einzige plausible Erklärung hierfür.

Trotz der hierfür genannten Argumente ist zumindest nicht auszuschließen, dass auch andere Faktoren zu dieser Abweichung beitragen. Die Modellstromkomponenten wurden in dieser Arbeit auf Grundlage der in publizierten Patch-Clamp-Studien beschriebenen Charakteristika der konstant nachgewiesenen Membranströme erstellt. Die Charakterisierung von Strömen an isolierten Zellen birgt die Problematik, dass einerseits durch die Enzymwirkungen während der Isolationsprozedur, andererseits durch die Herauslösung der Zellen aus dem Organverband an sich sowohl strukturelle als auch funktionelle Veränderungen der Ionenkanäle auftreten können. Theoretisch können hierdurch sowohl die Kinetik als auch die Amplitude der einzelnen makroskopischen Stromkomponenten deutlich alteriert werden. Beschreibungen entsprechender Phänomene an glatten Muskelzellen geben Aiello et al. [108], Cole et al [39], Sperelakis et al. [109] und Schubert et al. [110].

Bewusst nicht im Modell berücksichtigt wurden Ströme, die nicht sicher reproduzierbar in Myozyten der RPV nachgewiesen wurden. Hierzu gehören T-Typ Kalziumströme [57] und Natriumströme [61]. Gegen eine relevante Einschränkung der Erklärungskraft des Modells durch dieses Vorgehen spricht, dass für die genannten Ströme praktisch nur im Rahmen der Depolarisation eine funktionelle Relevanz anzunehmen ist. Die Depolarisation wird jedoch durch den Modellstrom I_{CaL} hinreichend gut erklärt.

Im Folgenden wird auf die durch die Modellberechnungen näher bestimmte Bedeutung der einzelnen Stromkomponenten eingegangen.

4.1.2 Stromkomponenten und ihre Bedeutung im Rahmen der MSC

4.1.2.1 I_{CaL}

I_{CaL} ist der einzige reproduzierbar nachgewiesene spannungs- und zeitabhängige Einwärtsstrom an glatten Muskelzellen der RPV. Daher ist es naheliegend, dass I_{CaL} die schnellen Depolarisationen im Rahmen der MSCs trägt. Durch ein einfaches mathematisches Modell konnten die in isolierten Zellen der RPV gemessenen Einwärtsströme über einen weiten Spannungsbereich dargestellt und in diesem Rahmen für beliebige Spannungsverläufe modelliert werden.

Die Berechnung mit an Einzelzellmessungen orientierten Parametern für Aktivierung, Inaktivierung, Zeitkonstanten und Leitfähigkeit ergab während schneller Spikes

Einwärtsströme, die dem totalen Ionenstrom I_M während der Depolarisation im Verlauf sehr ähnlich sind. Zwischen einzelnen Spikes fließt nur ein sehr kleiner I_{CaL} . Um eine zur Erklärung der Depolarisation der schnellen Spikes ausreichende Amplitude von I_{CaL} zu generieren, wurde der Parameter g_{CaLmax} auf einen Wert von 5000pS gesetzt. Weitere Anpassungen waren zur Generierung eines Verlaufes von I_{CaL} , mit dem der errechnete notwendige Einwärtsstrom erklärt werden konnte, nicht notwendig. Dies entspricht einer geringfügigen Erhöhung gegenüber den publizierten Werten (z.B. [66]: 4000pS).

Eine mögliche theoretische Erklärung dafür, dass nicht exakt die experimentell in Patch-Clamp-Studien ermittelten, sondern leicht veränderte Werte für den Parameter g_{CaLmax} die während der Depolarisation fließenden Ströme am besten erklären können liegt darin, dass Effekte der enzymatischen und mechanischen Zellseparation sowie Konzentrationsänderungen intrazellulärer second-Messenger zu gravierenden funktionellen Veränderungen der L-Typ Kalziumkanäle führen können [111].

Wie bereits im Ergebnisteil angesprochen, ist zu Beginn der schnellen Spike-Depolarisation I_{CaL} kleiner als I_M (Abb. 3.11). Zwischen -40mV und -30mV erreicht I_{CaL} dann entsprechend höhere Werte und entspricht im Amplitude und Verlauf I_M . Da erst ab dem genannten Spannungsbereich von -40mV bis -30mV die Schwelle der Aktivierung von I_{CaL} erreicht wird, ist die Diskrepanz bei negativeren Membranpotenzialen gut erklärlieblich. Offensichtlich fließt also in der initialen Phase der Depolarisation ein Strom, der das Membranpotenzial bis zur Schwelle der Aktivierung von I_{CaL} treibt.

Der genaue Ursprung dieses treibenden Stromes ist auf Basis der durchgeföhrten Modellberechnungen nicht zu klären. Allerdings kann weitgehend ausgeschlossen werden, dass eine der aus Patch-Clamp-Experimenten bekannten Stromkomponenten diese Rolle übernimmt. Aus theoretischen Erwägungen abgeleitet bieten sich alternativ in erster Linie von extern in die Zelle eingeprägte Schrittmacherströme an. Da von einer lokalen Fortleitung der Erregung im glattmuskulären Gewebe der RPV ausgegangen werden kann, ist es wahrscheinlich, dass Änderungen der Membranpotenzials einzelner benachbarter Zellen sich gegenseitig beeinflussen und somit unter anderem depolarisierende Ströme von einer Zelle in ihre Nachbarzellen eingeprägt werden. Diese würden dann letztlich die Membran bis zur Schwelle der Aktivierung des zelleigenen I_{CaL} depolarisieren.

Ein weiteres Ergebnis der Modellberechnungen zu I_{CaL} betrifft die Rolle von I_{CaL} im Ablauf des gesamten MSC. Nähere Einzelheiten hierzu sind in Abb. 4.2 dargestellt.

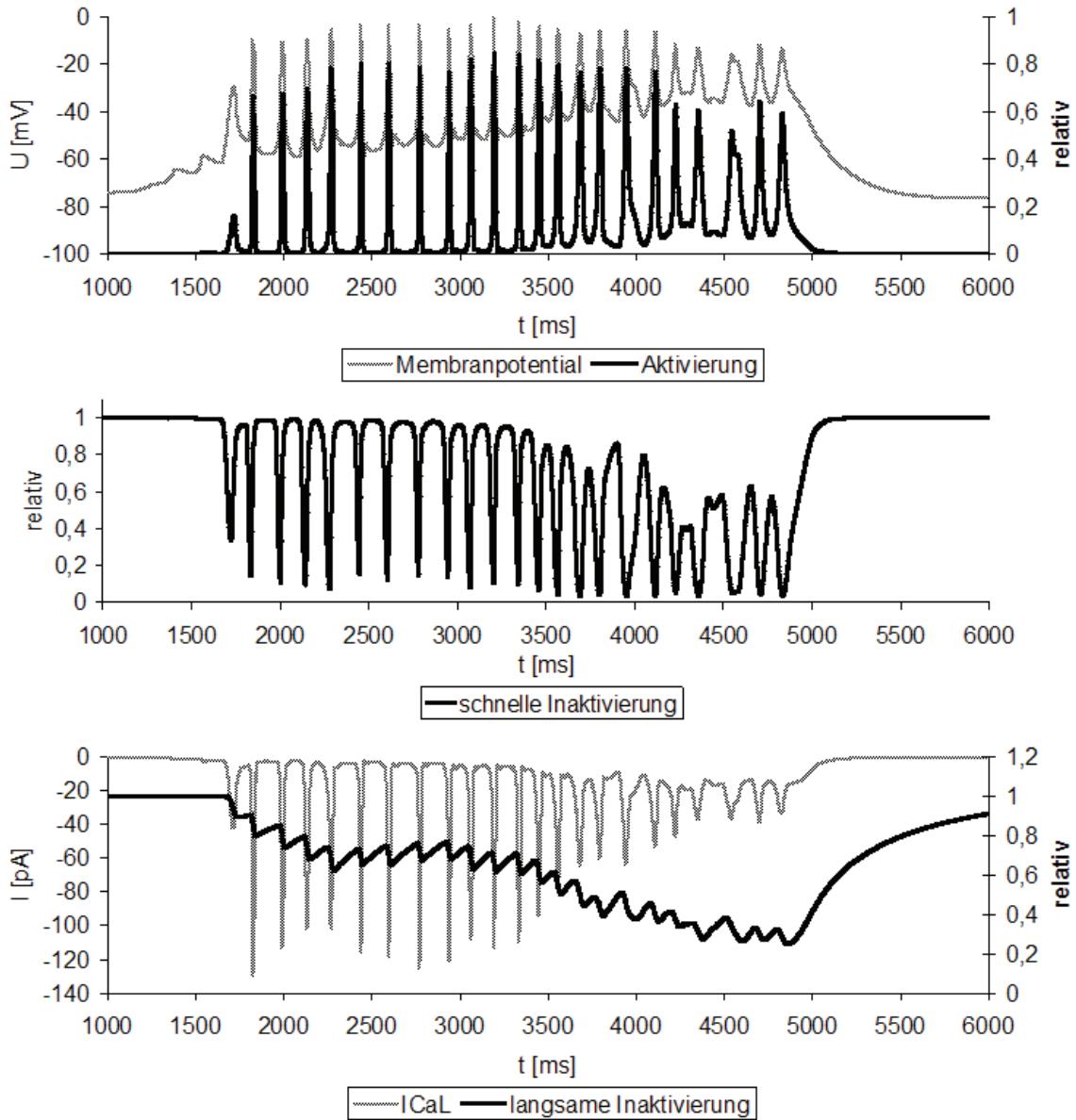


Abb. 4.2: Aktivierung (oben), schnelle Inaktivierung (Mitte) und langsame Inaktivierung (unten) von I_{CaL} , jeweils aufgetragen gegen die rechte Ordinate. Im unteren Bild ist zusätzlich der Verlauf von I_{CaL} selbst gegen die linke Ordinate aufgetragen, im oberen Bild der Potenzialverlauf. Die Abnahme der Verfügbarkeit (=Zunahme der Inaktivierung) und die Abnahme der Aktivierung während der zweiten Hälfte des MSC sind klar erkennbar. Auf Ebene von I_{CaL} entspricht dies einer Abnahme der Amplituden während der schnellen Spikes mit den im Text besprochenen Auswirkungen aus die kalziumabhängigen Auswärtsströme.

In der zweiten Hälfte des MSC kommt es zu einer zunehmenden Inaktivierung und einer leichten Abnahme der maximalen Aktivierung während der schnellen Spikes. Durch die zunehmende Depolarisation des Plateau potenzials kommt es zu einer

stärkeren Aktivierung zwischen einzelnen Spikes. I_{CaL} selbst wird hierdurch während der Spikes deutlich kleiner. Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die maximalen Kalziumkonzentrationen im submembranösen Kompartiment ebenfalls deutlich abnehmen und möglicherweise nicht mehr die zur Aktivierung der kalziumabhängigen Kaliumströme notwendigen Werte erreichen. In diese Richtung weisen auch die Ergebnisse der durchgeführten Modellberechnungen zur Kalziumkonzentration, siehe auch Abb. 7.3 und 7.4 des Anhangs. Eine vollständige Repolarisation der Spikes wäre dann nicht mehr möglich. Dies würde erklären, warum der Beginn der Plateaudepolarisation mit der im unteren Teil von Abb. 4.2 deutlich sichtbaren Abfall der maximalen Kalziumströme zeitlich in engem Zusammenhang steht.

Zusammenfassend konnte durch die Modellbildung gezeigt werden, dass der an isolierten Zellen charakterisierte Einwärtsstrom mit den typischen Eigenschaften eines L-Typ Kanalstroms die während der Depolarisation schneller Spikes fließenden Einwärtsströme erklären kann. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den in der Literatur angegebenen experimentellen Daten: Liu et al. [103] zeigten, dass der Einwärtsstrom isolierter Zellen der RPV sensitiv gegenüber dem L-Typ-Kalziumkanalblocker Nifedipin ist. Bereits zuvor hatten Shimamura et al. [112] berichtet, dass sowohl die mechanische als auch die elektrische Spontanaktivität der RPV durch Nifedipin gehemmt werden kann.

4.1.2.2 I_{TO}

Den spannungs- und zeitabhängigen Auswärtsströmen der Portalvene wurden die Funktionen der Repolarisation der schnellen Spikes und der Kontrolle des Ruhemembranpotenzials zugesprochen [64].

Die dargestellten Berechnungen für I_{TOs} und I_{TOf} haben gezeigt, dass die an Einzelzellen charakterisierten Auswärtsströme während der schnellen elektrischen Aktivität des glatten Muskels der RPV den errechneten totalen Auswärtsstrom wegen zu geringer Amplituden und zeitlich unzureichend korrelierender Verläufe nicht vollständig erklären. I_{TOf} entwickelt insgesamt nur relativ kleine Amplituden und ist etwa ab der

Hälfte des MSC praktisch nicht mehr nachweisbar. Am ehesten ist der funktionelle Beitrag so zu interpretieren, dass insbesondere zu Beginn des MSC eine Verlangsamung der Anstiegs geschwindigkeit der schnellen Spikes und eine Reduktion der Spikefrequenz bewirkt wird. Hierdurch wird Zeit für die Aktivierung anderer repolarisierender Ströme gewonnen und die vollständige Repolarisation der schnellen Spikes begünstigt, so dass I_{CaL} weniger rasch inaktiviert.

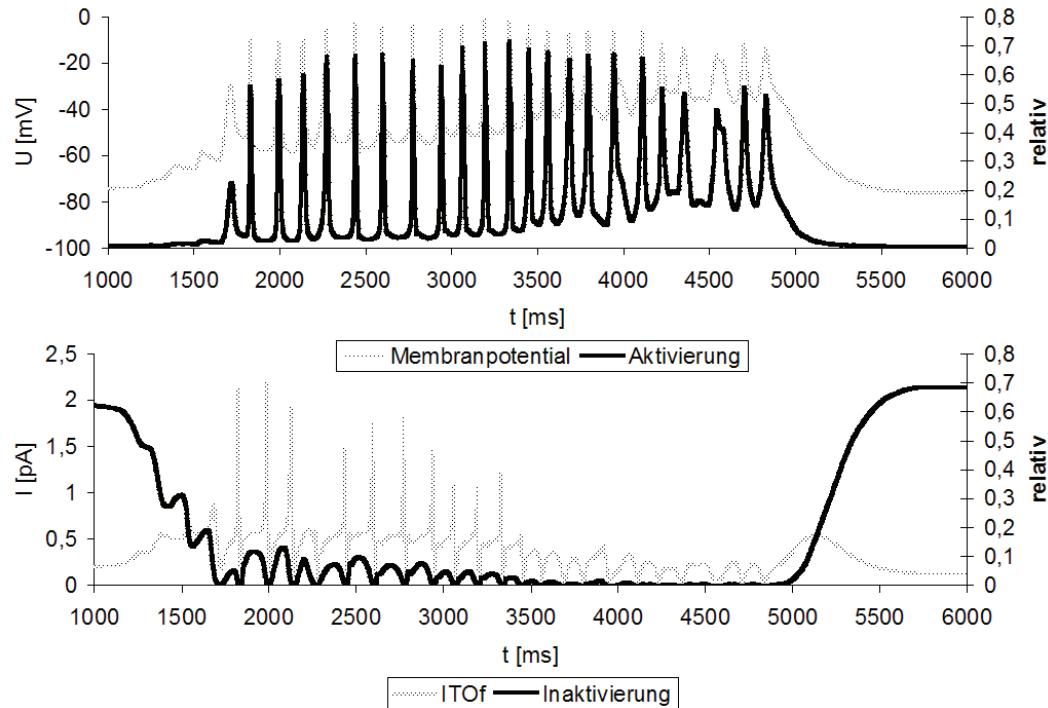


Abb. 4.3: Aktivierung (oben) und Inaktivierung (unten) des schnellen Auswärtsstroms I_{TOF} , jeweils aufgetragen gegen die rechte Ordinate. Im unteren Bild ist zusätzlich der Verlauf von I_{TOF} selbst gegen die linke Ordinate aufgetragen, im Bild darüber der Potenzialverlauf. Die schnelle Abnahme der Verfügbarkeit (=Zunahme der Inaktivierung) zu Beginn und die weitere Abnahme während der ersten Hälfte des MSC sind klar erkennbar. Die Aktivierung zeigt ähnlich wie im Fall von I_{CaL} entsprechend dem Potenzialverlauf ebenfalls eine geringgradige Abnahme während zweiten Hälfte des MSC. I_{TOF} kann wegen des beschriebenen Verlaufs der Parameter nur während der ersten Hälfte des MSC im Rahmen der schnellen Spikes kleine Amplituden entwickeln.

I_{TOs} aktiviert während der schnellen Spikes und erklärt einen Teil von I_M . Verglichen mit dem totalen Auswärtsstrom ist I_{TOs} jedoch zu klein und zu langsam aktivierend, um eine vollständige Erklärung der auswärts gerichteten Anteile von I_M zu ermöglichen.

Im Verlauf eines MSC kommt er zur partiellen Inaktivierung von I_{TOs} (Abb. 4.3). Der Betrag des Inaktivierungspараметers „d“ halbiert sich nach etwa der Hälfte der Dauer eines MSC und nimmt im Verlauf weiter ab.

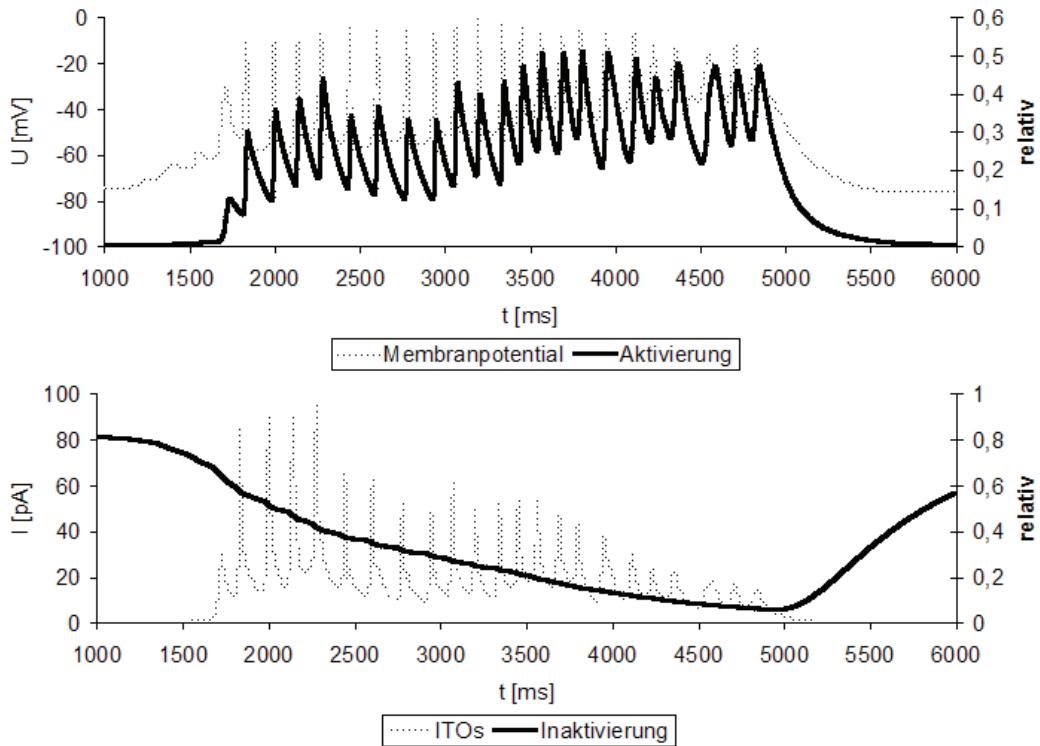


Abb. 4.4: Aktivierung (oben) und Inaktivierung (unten) von I_{TOs} jeweils aufgetragen gegen die rechte Ordinate. Im unteren Bild ist zusätzlich der Verlauf von I_{TOs} selbst gegen die linke Ordinate aufgetragen, im Bild darüber der Potenzialverlauf. Über den gesamten Zeitraum des MSC erfolgt eine langsame Abnahme der Verfügbarkeit (=Zunahme der Inaktivierung). Die Aktivierung zeigt im Gegensatz zu I_{CaL} und I_{TOf} eine Zunahme während zweiten Hälften des MSC, da die Zeitkonstante der Aktivierung langsamer ist und somit die Aktivierung von I_{TOs} von der Depolarisation der Plateaupotenzials mehr profitiert als sie durch die Abnahme der Spikeamplituden eingeschränkt wird. Insgesamt überwiegt jedoch der Effekt der zunehmenden Inaktivierung, so dass es in der zweiten Hälfte des MSC zu einer deutlichen Abnahme der Amplitude von I_{TOs} kommt.

Durch das Zusammenwirken der spannungs- und zeitabhängigen Auswärtsströme wird zu Beginn des MSC gesichert, dass eine vollständige Repolarisation der schnellen Spikes stattfindet. Während I_{TOf} eher über die Verlangsamung der schnellen Depolarisation die notwendige Zeit für die Aktivierung des langsameren I_{TOs} schafft, wird die eigentliche Repolarisation zu großen Teilen durch I_{TOs} bewirkt. Die beschriebene langsame Inaktivierung von I_{TOs} ist die Ursache der im Verlauf des MSC auftretenden Depolarisation des basalen Potenzials zwischen einzelnen schnellen Spikes.

Darüber hinaus ist sowohl für I_{TOs} als auch für I_{TOf} eine Bedeutung für die Entladungsfrequenz der schnellen Spikes anzunehmen, da beide Ströme auch zwischen einzelnen Spikes vorhanden sind und depolarisierende Ströme neutralisieren. I_{TOs}

übernimmt die Aufgabe während Depolarisation vor jedem Spike, I_{TOs} hingegen bremst die langsame Depolarisation unmittelbar nach dem Spike. Die Tatsache, dass es im MSC-Verlauf trotz der Inaktivierung von I_{TOs} nicht zu einer wesentlichen Zunahme der Spikefrequenz kommt, steht damit nicht im Widerspruch, da, wie aus Abb. 4.3 ersichtlich, die basale Amplitude von I_{TOs} nicht wesentlich abnimmt.

4.1.2.3 I_{NI}

In der Literatur wird die physiologische Bedeutung von I_{NI} meist nur am Rande im Rahmen der Interpretation pharmakologischer Studien diskutiert. So erklären Kirkup et al. [59] die von ihnen beobachtete Hemmung der mechanischen Aktivität der RPV durch Niflumsäure partiell durch eine Stimulation der nicht-inaktivierenden Ströme.

Über den möglichen Einfluss von I_{NI} auf den Verlauf der elektrischen Spontanaktivität finden sich in der bekannten Literatur hingegen keine näheren Aussagen.

Die Rolle des Modellstroms I_{NI} hängt deutlich von der Gestaltung der Modellierungsparameter ab. Der Anstieg der Strom-Spannungsbeziehung und das Umkehrpotenzial sind die kritischen Größen. Für g_{NI} liegt die Spannbreite der in der Literatur angegebenen Werte zwischen 3100pS [62] und 360pS [68].

Wird ein Umkehrpotenzial von etwa -65 mV angenommen, wie es dem von Cogolludo et al gemessenen Wert in physiologischem, kalziumhaltigem Medium entspricht, ergibt sich eine depolarisierende Wirkung von I_{NI} während der Ruheperiode. Bei Annahme eines Umkehrpotenzials von -40mV [62] ergibt sich ein permanenter Einwärtsstrom von -10pA. Während der für viele Sekunden anhaltenden Ruhephasen zwischen den komplexen Aktionspotenzialen müsste dieser Einwärtsstrom permanent durch einen gleich großen Auswärtsstrom kompensiert werden. Die bekannten Auswärtsströme in Zellen der RPV sind jedoch beim Ruhepotenzial hierfür nicht ausreichend aktiviert.

Diese scheinbaren Unvereinbarkeiten mit der physiologischen Situation lassen sich durch die Berücksichtigung der im Rahmen von Patch-Clamp-Messungen unweigerlich auftretenden Leckströme auflösen. Diese sind im experimentell ermittelten I_{NI} , nicht jedoch im I_{NI} intakter Zellen enthalten. Nach Subtraktion eines typischen Leckstroms vom experimentell ermittelten I_{NI} konnte im Rahmen der durchgeführten Berechnungen aus den Daten von Noack et al. [62] eine Modellkomponente mit einem Umkehrpotenzial nahe dem Ruhemembranpotenzial erzeugt werden. Der Beitrag dieser Komponente zur Erklärung von I_M ist allerdings gering. Über den gesamten Verlauf der

MSC wirkt I_{NI} repolarisierend. Seine Funktion im Rahmen der elektrischen Spontanaktivität scheint daher eher in der Stabilisierung des Ruhemembranpotenzials und in der langsamen Repolarisation des MSC-Plateaupotenzials als in der schnellen Spikes zu liegen.

4.1.2.4 Der unerklärte Reststrom I_x

Die Subtraktion von I_{CaL} und I_{TOs} vom totalen ionalen Strom ergibt den unerklärten Reststrom I_x . Zu jedem Zeitpunkt, an dem ein Reststrom errechnet wird, stimmen die erwarteten Ströme nicht mit den vom Modell generierten überein und zeigen dadurch eine Diskrepanz zwischen den in Patch-Clamp-Experimenten charakterisierten und den im Organpräparat fließenden Strömen an. I_x stellt den Verlauf des theoretisch notwendigen, von den Komponenten des Modells nicht produzierten Stroms dar.

In den vorherigen Abschnitten wurde gezeigt, dass im Rahmen des angewendeten Modells I_x vor allem während der Repolarisation eine hohe Amplitude aufweist. Wie bereits beschrieben ergibt sich für I_x eine hysteretische Strom-Spannungsbeziehung mit einer Einkerbung im Bereich der zweiten Depolarisation der schnellen Spikes.

Da neben der vorliegenden Arbeit nach Kenntnis des Autors bislang keine systematische Untersuchung über die Erklärungskraft der bislang bekannten Stromkomponenten an der RPV existiert, wurden bislang auch keine Konzepte zur Erklärung eines unbekannten Reststroms entwickelt.

Im Rahmen der Einleitung wurden die an Zellen der RPV nachgewiesenen Ionenströme und Kanäle beschrieben. Die rein spannungsabhängigen der dort genannten Komponenten sind in den Patch-Clamp-Messungen, die den hier genutzten Modellstromkomponenten zu Grunde liegen, vollständig abgebildet, sieht man von möglichen Alterationen der Ströme durch die Patch-Clamp-Präparation an sich ab. Nicht abgebildet sind die spannungs- und kalziumabhängigen Komponenten, da, wie bereits ausgeführt, deren Charakterisierung nur in Anwesenheit von Kalziumionen in der extrazellulären Lösung möglich ist. Eine genaue Charakterisierung der Auswärtsströme ist unter dieser Bedingung jedoch deutlich erschwert, da eine Vermischung mit dem einwärtsgerichteten Kalziumstrom auftritt.

Aus diesem Grund kommen kalziumabhängige Kaliumströme als mögliche Träger von I_x in Frage. Bereits Beech et al [64] diskutierten einen Beitrag von kalziumabhängigen Kaliumkanälen zur Repolarisation des Aktionspotenzials. Allerdings wurde hierbei

nicht differenziert, auf welchen Abschnitt der komplexen elektrischen Spontanaktivität sich dieser Beitrag beziehen könnte.

Die errechneten Werte von $[Ca^{2+}]_s$ sind unter Annahme der in den letzten Jahren zunehmend besser charakterisierten Kolokalisation von L-Typ Kalziumkanälen und BK(Ca)-Kanälen plausibel [73, 74, 113] und liegen in dem Bereich, der z.B. für die Aktivierung von BK_(Ca)-Kanälen relevant ist (Abb. 4.4). Hieraus ergibt sich die Möglichkeit einer Aktivierung von kalziumabhängigen Kaliumkanälen und ihre Beteiligung an der Repolarisation der schnellen Spikes, die auch mit den erhobenen experimentellen Daten unterstützt werden kann.

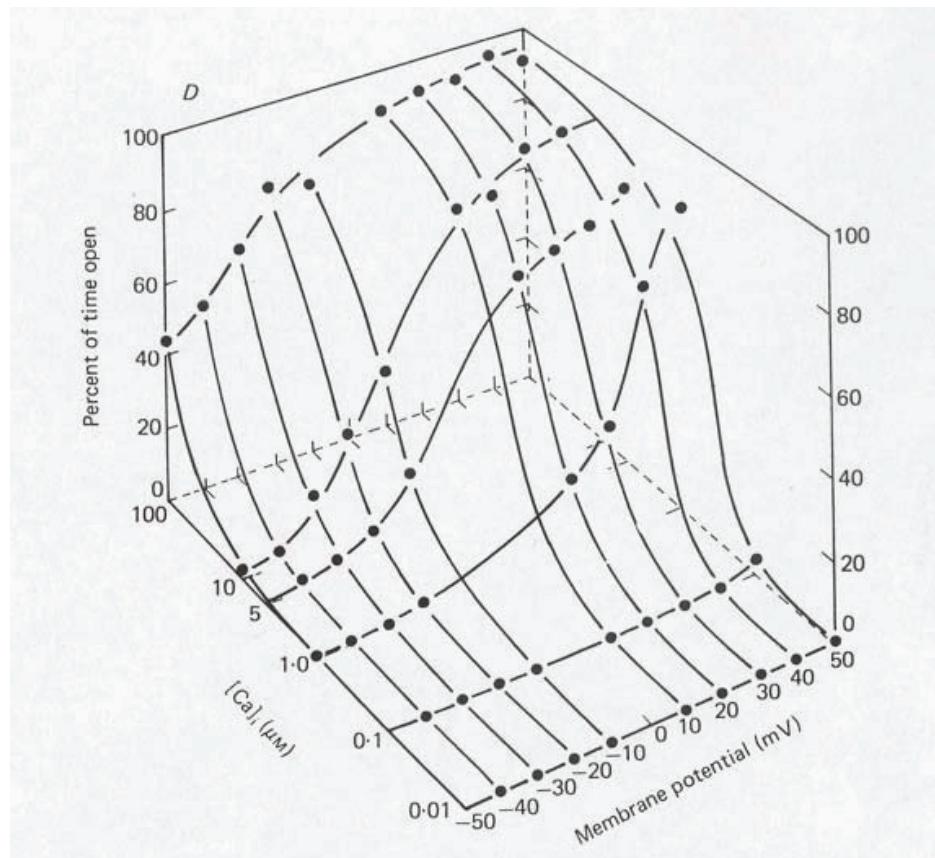


Abb. 4.5: Abhängigkeit der Öffnungswahrscheinlichkeit kalziumabhängiger Kaliumkanäle (BK(Ca)) von Membranpotenzial und $[Ca^{2+}]$, ermittelt an kultivierten Skelettmuskelzellen der Ratte durch Barrett et al. (Abb. entnommen aus [114]). Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Modell ergibt während schneller Spikes Konzentrationen bis ca. $60\mu\text{mol/l}$.

4.2 Effekte von Kaliumkanalblockern auf die Spontanaktivität

Vor dem Hintergrund der o.g. methodischen Probleme bei der Charakterisierung von Auswärtsströmen in Patch-Clamp-Studien und der Schwierigkeiten, die

Repolarisationsphase der schnellen Spikes auf deren Grundlage zu erklären, wurden experimentelle Untersuchungen über die Wirkungen von Kaliumkanalblockern auf die physiologische Spontanaktivität durchgeführt.

In den durchgeführten experimentellen Untersuchungen konnten deutliche Effekte von CTX, TEA und 4-AP sowohl auf die mechanische als auch auf die elektrische Spontanaktivität der RPV nachgewiesen werden. Für eine Beteiligung von durch diese Substanzen beeinflussten Auswärtsströmen an der schnellen Spike-Komponente der elektrischen Aktivität sprechen insbesondere die gezeigten Veränderungen der extrazellulär abgeleiteten Potenziale. Bezüglich dieser sind die Effekte der verschiedenen Blocker jedoch unterschiedlich.

CTX und das in niedrigen Konzentrationen bis ca. 3 mmol/l ebenfalls für $BK_{(Ca)}$ -Kanäle spezifische TEA bewirken eine deutliche Zunahme des Intervalls zwischen einzelnen Spikes, während 4-AP eine Verkürzung bewirkt. Diese Wirkung von 4-AP wurde an der Portalvene des Meerscheinchens von Hara et al. [115] beschrieben. Bereits Connor et al. [116] fanden an Neuronen, dass ein von ihnen charakterisierter Auswärtsstrom seine Hauptwirkung weniger in der direkten Repolarisation der Aktionspotenzials als vielmehr in der Verlangsamung der Depolarisation im Intervall zwischen einzelnen Spikes entfaltete. Über diesen Mechanismus könnte auch die hier gezeigte Steigerung der Spike-Frequenz unter 4-AP erklärt werden.

Die Verlangsamung der Spike-Frequenz und die Verbreiterung einzelner Spikes durch die $BK_{(Ca)}$ -Blocker hingegen sprechen für eine Beteiligung dieser Kanäle an der unmittelbaren schnellen Repolarisation. Die von Hamon et al. [117] beobachtete Verlangsamung der Spike-Repolarisation in Gegenwart von TEA lässt sich ebenfalls entsprechend interpretieren..

Die erhobenen Daten zu mechanischen Effekten zeigen im Gegensatz zu den elektrischen Veränderungen für 4-AP, TEA und CTX einheitlich Frequenzabnahme, Verlängerung der Einzelkontraktion und Steigerung der Kontraktionskraft. Die beiden letztgenannten Effekte lassen sich direkt als Folge der beobachteten Effekte der einzelnen Substanzen interpretieren: Der die Kontraktionskraft bestimmende Kalziuminflux steigt, unabhängig davon, ob wie bei TEA die Zahl der einzelnen Depolarisationen pro Zeiteinheit größer wird, oder ob die Länge der einzelnen Depolarisationen beträchtlich zunimmt, wie es für 4-AP anzunehmen ist. Ebenso ist eine Verzögerung der Repolarisation des Plateau potenzials bei Blockade repolarisierender Auswärtsströme plausibel.

Die Abnahme der Frequenz der spontanen Kontraktionen durch die Wirkung von Kaliumkanalblockern ist nicht unmittelbar erklärlich, da die Verringerung repolarisierender Ströme zunächst eine Zunahme der Erregbarkeit und damit auch der Frequenz erwarten lassen würden. Am ehesten wäre der beobachtete Effekt durch eine vermehrte Inaktivierung exzitatorischer Ströme erklärlich. Ursache für diese vermehrte Inaktivierung könnte am ehesten die verlängerte und höhere Depolarisation und eine unvollständige Repolarisation durch die Hemmung der repolarisierenden Kaliumkanäle sein.

4.3 Das Zusammenwirken der Stromkomponenten während schneller Spikes

Auf Grundlage der Ergebnisse der Modellbildung lassen sich den einzelnen Stromkomponenten Funktionen während der schnellen Spikes zuweisen.

Demnach wird die Depolarisation einzelner schneller Spikes durch den kurzzeitigen Längstrom einer benachbarten Zelle mit Spike-Aktivität bis zur Schwelle der Aktivierung von I_{CaL} getrieben. Die Depolarisation führt zur Aktivierung des spannungsabhängigen Auswärtsstroms I_{TOs} . Gleichzeitig kommt es durch den Einstrom von Kalziumionen zum Anstieg von $[Ca^{2+}]_s$. Hierdurch werden kalziumabhängige Kaliumkanäle geöffnet. Durch das Zusammenwirken der verschiedenen zeitspannungs- und kalziumabhängigen Kaliumströme kommt es zur Repolarisation.

Bezüglich des bei einem Teil der Spikes beobachteten triphasischen Verlaufes der Repolarisation ist anzunehmen, dass es durch die rasche Abdiffusion des Kalziums aus den Mikrodomänen zu einem sehr schnellen Rückgang der kalziumabhängigen Kaliumströme kommt und hierdurch die Repolarisation unterbrochen wird, da die Kalziumströme – wenn auch mit fallender Amplitude – auch nach Erreichen des ersten Peaks des schnellen Spikes weiter fließen.

Der gewählte Ansatz, bei der Rekonstruktion des Gesamtstroms von den minimal notwendigen Einzelstromkomponenten auszugehen, findet seine Bestätigung in theoretischen und experimentellen Ergebnissen zur energetischen Optimierung in biologischen Systemen [118, 119]. Insbesondere repetitive Erregungen, wie sie im Rahmen der Spontanaktivität auftreten, sind dann energetisch günstig, wenn sie mit den geringstmöglichen Mengen an Ladungsverschiebungen erzeugt werden können, da jeder Fluss entlang des elektrochemischen Gradienten durch einen aktiven Transportvorgang unter Energieverbrauch wieder ausgeglichen werden muss.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Aussagen über die physiologische Signifikanz und Erklärungskraft der hauptsächlich im Rahmen von Patch-Clamp-Experimenten an isolierten Zellen der RPV charakterisierten Stromkomponenten für die elektrische Spontanaktivität des intakten Gefäßes zu treffen.

Durch eine numerische Differenzierung des während spontaner Kontraktioinen mit intrazellulären Mikroelektroden abgeleiteten Membranpotenzials aus vorliegenden Datensätzen gelang es, den diesem zugrunde liegenden totalen ionalen Strom zu ermitteln.

Parallel wurden auf Grundlage der von Hodgkin et al. [45] entwickelten Gleichungssysteme die in der Literatur beschriebenen Einwärts- und Auswärtsstromkomponenten mittels eines mathematischen Modells nachgebildet.

In der Synthese beider Verfahren wurde untersucht, inwieweit die Flüsse der Modellströme mit den errechneten notwendigen Stromflüssen während der schnellen Spike-Aktivität der RPV übereinstimmen. Hierzu wurden verschiedene Parameterkonstellationen gewählt, um mögliche methodische Mängel bei der Ermittlung der bekannten Ströme zu berücksichtigen.

Mit dieser Methode konnten die Funktionen der einzelnen Stromkomponenten im Verlauf einzelner schneller Spikes aus dem MSC der RPV geklärt werden. Die tragende Rolle von Kalziumströmen für die Depolarisation wurde bestätigt. Die bekannten spannungsabhängigen Auswärtsströme erklären hingegen nur einen Teil des während der Repolarisation des Spikes fließenden Gesamtstroms.

Aus der Modellbildung ergaben sich Hinweise für eine Beteiligung kalziumabhängiger Stromkomponenten an der Repolarisation schneller Spikes. Die Effekte von Blockern kalziumabhängiger Kaliumkanäle wurden zur Überprüfung dieser Hypothese experimentell untersucht und ausgewertet. Hierbei zeigten sich ausgeprägte Effekte von BK(Ca)-blockierenden Substanzen (TEA und CTX) auf mechanische Aktivität und die Potentialkonfiguration einzelner Spikes. Die experimentellen Daten stützen also die aus der Modellbildung heraus entwickelte Hypothese.

Daraus ergibt sich letztlich, dass Stromkomponenten, die im Rahmen von Patch-Clamp-Experimenten charakterisiert werden, unter gewissen Bedingungen eine gute Grundlage für das Verständnis der elektrischen Abläufe und zur Charakterisierung physiologischer Organaktivität sind. Die Integration von experimentellen Daten aus Experimenten, die

mit verschiedenen Methoden an einem bestimmten Präparat durchgeführt werden, kann einen Beitrag zum Verständnis von Organfunktionen und pharmakologischen Interventionsmöglichkeiten leisten.

In den letzten Jahren konnten durch entsprechende Ansätze insbesondere im Bereich der Kardiologie auch auf klinischer Ebene relevante pathophysiologische Einsichten in teilweise bereits lange bekannte Krankheitsbilder gewonnen und pharmakologische Strategien entwickelt werden. Bekannte Beispiele bilden das Long-QT- oder das Brugada-Syndrom [120, 121].

Die Ausdehnung entsprechender Methoden auf glattmuskuläre Organe im Rahmen der Erweiterung unserer pathophysiologischen Konzepte erscheint unter diesen Aspekten als ein lohnendes Ziel.

6 Literatur

1. van Helden, D.F., Hosaka, K. & Imtiaz, M.S. Rhythmicity in the microcirculation. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 34, 59-66(2006).
2. Bomzon, A. & Huang, Y.T. Vascular smooth muscle cell signaling in cirrhosis and portal hypertension. *Pharmacol. Ther.* 89, 255-72(2001).
3. Cook, D.A. Mechanisms of cerebral vasospasm in subarachnoid haemorrhage. *Pharmacol. Ther.* 66, 259-84(1995).
4. Holschneider, A.M. Electrophysiological principles of motility disturbances in the small and large intestines--review of the literature and personal experience. *Prog Pediatr Surg* 24, 125-41(1989).
5. Izzard, A.S. & Heagerty, A.M. Hypertension and the vasculature: arterioles and the myogenic response. *J. Hypertens.* 13, 1-4(1995).
6. Yasue, H. Pathophysiology and treatment of coronary arterial spasm. *Chest* 78, 216-23(1980).
7. McHale, N., Hollywood, M., Sergeant, G. & Thornbury, K. Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 570, 23-8(2006).
8. Sutter, M.C. The mesenteric-portal vein in research. *Pharmacol. Rev.* 42, 287-325(1990).
9. Kamishima, T. & McCarron, J.G. Depolarization-evoked increases in cytosolic calcium concentration in isolated smooth muscle cells of rat portal vein. *J. Physiol. (Lond.)* 492 (Pt 1), 61-74(1996).
10. Cuthbert, A.W. & Sutter, M.C. The effects of drugs on the relation between the action potential discharge and tension in a mammalian vein. *Br J Pharmacol Chemother* 25, 592-601(1965).
11. Collier, M.L., Ji, G., Wang, Y. & Kotlikoff, M.I. Calcium-induced calcium release in smooth muscle: loose coupling between the action potential and calcium release. *J. Gen. Physiol.* 115, 653-62(2000).
12. Hirano, K., Derkach, D.N., Hirano, M., Nishimura, J. & Kanaide, H. Protein kinase network in the regulation of phosphorylation and dephosphorylation of smooth muscle myosin light chain. *Mol. Cell. Biochem.* 248, 105-14(2003).

13. Hirano, K. Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca²⁺ sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Sci.* 104, 109-15(2007).
14. Lincoln, T.M. Myosin phosphatase regulatory pathways: different functions or redundant functions?. *Circ. Res.* 100, 10-2(2007).
15. Pfitzer, G. Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J. Appl. Physiol.* 91, 497-503(2001).
16. Somlyo, A.P. & Somlyo, A.V. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol. Rev.* 83, 1325-58(2003).
17. Funaki, S. & Bohr, D. ELECTRICAL AND MECHANICAL ACTIVITY OF ISOLATED VASCULAR SMOOTH MUSCLE OF THE RAT. *Nature* 203, 192-4(1964).
18. Johansson, B. & Ljung, B. Spread of excitation in the smooth muscle of the rat portal vein. *Acta Physiol. Scand.* 70, 312-22(1967).
19. Voth, D., Schipp, R., Agsten, M., Schürmann, K., Kohlhardt, M. & Dudek, J. [The influence of the cation milieu and various drugs on the contractility and autorhythm of a spontaneous active smooth vascular muscle in vitro]. *Arch Kreislaufforsch* 60, 364-87(1969).
20. Hamilton, T.C., Weir, S.W. & Weston, A.H. Comparison of the effects of BRL 34915 and verapamil on electrical and mechanical activity in rat portal vein. *Br. J. Pharmacol.* 88, 103-11(1986).
21. Jetley, M. & Weston, A.H. Some effects of sodium nitroprusside, methoxyverapamil (D600) and nifedipine on rat portal vein. *Br. J. Pharmacol.* 68, 311-9(1980).
22. Manzini, S., Maggi, C.A. & Meli, A. System and organ-selectivity of smooth muscle relaxants on in vitro spontaneously contracting preparations. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 270, 50-60(1984).
23. Newgreen, D.T., Bray, K.M., McHarg, A.D., Weston, A.H., Duty, S., Brown, B.S. et al. The action of diazoxide and minoxidil sulphate on rat blood vessels: a comparison with cromakalim. *Br. J. Pharmacol.* 100, 605-13(1990).
24. Southerton, J.S., Weston, A.H., Bray, K.M., Newgreen, D.T. & Taylor, S.G. The potassium channel opening action of pinacidil; studies using biochemical, ion flux and microelectrode techniques. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 338, 310-8(1988).

25. Mukerji, M.S., Leathard, H.L. & Huddart, H. The effects of potassium channel blockers on progesterone-induced suppression of rat portal vein contractility. *J. Pharm. Pharmacol.* 52, 983-90(2000).
26. Suarez-Kurtz, G., Garcia, M.L. & Kaczorowski, G.J. Effects of charybdotoxin and iberiotoxin on the spontaneous motility and tonus of different guinea pig smooth muscle tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259, 439-43(1991).
27. Uvelius, B. & Sigurdsson, S.B. Stimulatory effects of Ba²⁺ on contractile activity in the smooth muscle of the rat portal vein. *Acta Physiol. Scand.* 113, 201-5(1981).
28. Winquist, R.J., Heaney, L.A., Wallace, A.A., Baskin, E.P., Stein, R.B., Garcia, M.L. et al. Glyburide blocks the relaxation response to BRL 34915 (cromakalim), minoxidil sulfate and diazoxide in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 248, 149-56(1989).
29. Rang, H., Dale, M. & Ritter, J. *Pharmacology*, 5th Ed. (ed.) (Churchill Livingstone, 2003).
30. Horowitz, B., Ward, S.M. & Sanders, K.M. Cellular and molecular basis for electrical rhythmicity in gastrointestinal muscles. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 19-43(1999).
31. Povstyan, O.V., Gordienko, D.V., Harhun, M.I. & Bolton, T.B. Identification of interstitial cells of Cajal in the rabbit portal vein. *Cell Calcium* 33, 223-39(2003).
32. Kuriyama, H., Osa, T. & Tasaki, H. Electrophysiological studies of the antrum muscle fibers of the guinea pig stomach. *J. Gen. Physiol.* 55, 48-62(1970).
33. Golenhofen, K. & von Loh, D. Elektrophysiologische Untersuchungen zur normalen Spontanaktivität der isolierten *Taenia coli* des Meerschweinchens . *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 314, 312-328(1970).
34. el-Sharkawy, T.Y., Morgan, K.G. & Szurszewski, J.H. Intracellular electrical activity of canine and human gastric smooth muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 279, 291-307(1978).
35. Golenhofen, K. & von Loh, D. Intracelluläre Potentialmessungen zur normalen Spontanaktivität der isolierten Portalvene des Meerschweinchens . *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 319, 82-100(1970).
36. Hermsmeyer, K. Multiple pacemaker sites in spontaneously active vascular muscle. *Circ. Res.* 33, 244-51(1973).

37. Ljung, B. & Stage, L. Adrenergic excitatory influences on initiation and conduction of electrical activity in the rat portal vein. *Acta Physiol. Scand.* 80, 131-41(1970).
38. Takahashi, S., Hitomi, J., Satoh, Y., Takahashi, T., Asakura, H. & Ushiki, T. Fine structure of the mouse portal vein in relation to its peristaltic movement. *Arch. Histol. Cytol.* 65, 71-82(2002).
39. Cole, W.C., Clément-Chomienne, O. & Aiello, E.A. Regulation of 4-aminopyridine-sensitive, delayed rectifier K⁺ channels in vascular smooth muscle by phosphorylation. *Biochem. Cell Biol.* 74, 439-47(1996).
40. Hille, B. *Ionic channels of excitable membranes* (ed.) (Sinauer Associates Inc., 1994).
41. Hodgkin, A. & Huxley, A. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)* 116, 497-506(1952).
42. Hodgkin, A. & Huxley, A. Propagation of electrical signals along giant nerve fibers. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 140, 177-83(1952).
43. Hodgkin, A. & Huxley, A. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)* 116, 473-96(1952).
44. Hodgkin, A. & Huxley, A. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)* 116, 449-72(1952).
45. Hodgkin, A. & Huxley, A. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. (Lond.)* 117, 500-44(1952).
46. Klöckner, U. & Isenberg, G. Action potentials and net membrane currents of isolated smooth muscle cells (urinary bladder of the guinea-pig). *Pflugers Arch.* 405, 329-39(1985).
47. Noble, D. & Tsien, R.W. Reconstruction of the repolarization process in cardiac Purkinje fibres based on voltage clamp measurements of membrane current. *J. Physiol. (Lond.)* 200, 233-54(1969).
48. Victorri, B., Vinet, A., Roberge, F.A. & Drouhard, J.P. Numerical integration in the reconstruction of cardiac action potentials using Hodgkin-Huxley-type models. *Comput. Biomed. Res.* 18, 10-23(1985).
49. Ramón, F., Anderson, N.C., Joyner, R.W. & Moore, J.W. A model for propagation of action potentials in smooth muscle. *J. Theor. Biol.* 59, 381-408(1976).

- 50 Lang, R. & Rattray-Wood, C. in Smooth Muscle Excitation (ed. eds. Bolton, T. & Tomita, T.) pp. 391-402 (Academic press, 1996).
51. Mironneau, J., Martin, C., Arnaudeau, S., Jmari, K., Rakotoarisoa, L., Sayet, I. et al. High-affinity binding sites for [3H]saxitoxin are associated with voltage-dependent sodium channels in portal vein smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 184, 315-9(1990).
52. Pacaud, P., Loirand, G., Mironneau, C. & Mironneau, J. Noradrenaline activates a calcium-activated chloride conductance and increases the voltage-dependent calcium current in cultured single cells of rat portal vein. *Br. J. Pharmacol.* 97, 139-46(1989).
53. Mironneau, J. & Gargouil, Y.M. Action of indapamide on excitation-contraction coupling in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 57, 57-67(1979).
54. Hotta, K. & Yamamoto, Y. Ionic mechanisms involved in the strontium-induced spike and plateau in the smooth muscle of rat portal vein. *J. Physiol. (Lond.)* 336, 199-210(1983).
55. Fiol de Cuneo, M., Ruiz, R.D., Lacuara, J.L. & Santillan de Torres, R. Effects of calcium antagonists on spontaneous and pharmacologically increased contractility of vascular smooth muscle. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 263, 28-39(1983).
56. Jetley, M. & Weston, A.H. Some effects of D600, nifedipine and sodium nitroprusside on electrical and mechanical activity in rat portal vein [proceedings]. *Br. J. Pharmacol.* 58, 287P-288P(1976).
57. Loirand, G., Pacaud, P., Mironneau, C. & Mironneau, J. Evidence for two distinct calcium channels in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Pflugers Arch.* 407, 566-8(1986).
58. Cox, R.H., Katzka, D. & Morad, M. Characteristics of calcium currents in rabbit portal vein myocytes. *Am. J. Physiol.* 263, H453-63(1992).
59. Kirkup, A.J., Edwards, G. & Weston, A.H. Investigation of the effects of 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid (NPPB) on membrane currents in rat portal vein. *Br. J. Pharmacol.* 117, 175-83(1996).
60. Ledoux, J., Chartier, D. & Leblanc, N. Inhibitors of calmodulin-dependent protein kinase are nonspecific blockers of voltage-dependent K⁺ channels in vascular myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 1165-74(1999).
61. Okabe, K., Kajioka, S., Nakao, K., Kitamura, K., Kuriyama, H. & Weston, A.H. Actions of cromakalim on ionic currents recorded from single smooth muscle cells of the rat portal vein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252, 832-9(1990).

62. Noack, T., Deitmer, P. & Lammel, E. Characterization of membrane currents in single smooth muscle cells from the guinea-pig gastric antrum. *J. Physiol. (Lond.)* 451, 387-417(1992).
63. Hume, J.R. & Leblanc, N. Macroscopic K⁺ currents in single smooth muscle cells of the rabbit portal vein. *J. Physiol. (Lond.)* 413, 49-73(1989).
64. Beech, D.J. & Bolton, T.B. Two components of potassium current activated by depolarization of single smooth muscle cells from the rabbit portal vein. *J. Physiol. (Lond.)* 418, 293-309(1989).
65. Noack, T., Deitmer, P., Edwards, G. & Weston, A.H. Characterization of potassium currents modulated by BRL 38227 in rat portal vein. *Br. J. Pharmacol.* 106, 717-26(1992).
66. Edwards, G., Niederste-Hollenberg, A., Schneider, J., Noack, T. & Weston, A.H. Ion channel modulation by NS 1619, the putative BKCa channel opener, in vascular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 113, 1538-47(1994).
67. Edwards, G., Zygmunt, P.M., Högestätt, E.D. & Weston, A.H. Effects of cytochrome P450 inhibitors on potassium currents and mechanical activity in rat portal vein. *Br. J. Pharmacol.* 119, 691-701(1996).
68. Cogolludo, A.L., Pérez-Vizcaíno, F., López-López, G., Ibarra, M., Zaragozá-Arnáez, F. & Tamargo, J. Propafenone modulates potassium channel activities of vascular smooth muscle from rat portal veins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299, 801-10(2001).
69. Thorneloe, K.S., Chen, T.T., Kerr, P.M., Grier, E.F., Horowitz, B., Cole, W.C. et al. Molecular composition of 4-aminopyridine-sensitive voltage-gated K(+) channels of vascular smooth muscle. *Circ. Res.* 89, 1030-7(2001).
70. Kerr, P.M., Clément-Chomienne, O., Thorneloe, K.S., Chen, T.T., Ishii, K., Sontag, D.P. et al. Heteromultimeric Kv1.2-Kv1.5 channels underlie 4-aminopyridine-sensitive delayed rectifier K(+) current of rabbit vascular myocytes. *Circ. Res.* 89, 1038-44(2001).
71. Bolton, T.B. & Imaizumi, Y. Spontaneous transient outward currents in smooth muscle cells. *Cell Calcium* 20, 141-52(1996).
72. Inoue, R., Kitamura, K. & Kuriyama, H. Two Ca-dependent K-channels classified by the application of tetraethylammonium distribute to smooth muscle membranes of the rabbit portal vein. *Pflugers Arch.* 405, 173-9(1985).

73. Grunnet, M. & Kaufmann, W.A. Coassembly of big conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels and L-type voltage-gated Ca^{2+} channels in rat brain. *J. Biol. Chem.* 279, 36445-53(2004).
74. Müller, A., Kukley, M., Uebachs, M., Beck, H. & Dietrich, D. Nanodomains of single Ca^{2+} channels contribute to action potential repolarization in cortical neurons. *J. Neurosci.* 27, 483-95(2007).
75. Loirand, G., Pacaud, P., Baron, A., Mironneau, C. & Mironneau, J. Large conductance calcium-activated non-selective cation channel in smooth muscle cells isolated from rat portal vein. *J. Physiol. (Lond.)* 437, 461-75(1991).
76. Pacaud, P., Loirand, G., Lavie, J.L., Mironneau, C. & Mironneau, J. Calcium-activated chloride current in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Pflugers Arch.* 413, 629-36(1989).
77. Cao, K., Tang, G., Hu, D. & Wang, R. Molecular basis of ATP-sensitive K^+ channels in rat vascular smooth muscles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 463-9(2002).
78. Patejdl, R., Noack, P., Hopp, H., Weston, A. & Noack, T. The importance of the different ionic current components in action potential generation in vascular smooth muscle (portal vein). *Trace Elements and Electrolytes* 22, 248-253(2005).
79. Jack, J., Noble, D. & Tsien, R. *Electric Current Flow in Excitable Cells* (ed.) (Oxford University Press, 1975).
80. Bortoff, A. in *Methods In Pharmacology – Volume 3 – Smooth Muscle* (ed. eds. Daniel, E. & Paton, D.) pp. 185-200 (Plenum Press, 1975).
81. Small, R.C. & Weston, A.H. Simultaneous long-term recording of the mechanical and intracellular electrical activity of smooth muscles. *J Pharmacol Methods* 3, 33-8(1980).
82. Kuriyama, H. & Ito, Y. in *Methods In Pharmacology Vol. 3 Smooth Muscle* (ed. eds. Daniel, E. & Paton, D.) p. 201 – 230 (Plenom Press, 1975).
83. Stämpfli, R. A new method for measuring membrane potentials with external electrodes. *Experientia* 10, 508-9(1954).
84. Burnstock, G. & Straub, R. A method for studying the effects of ions and drugs on the resting and action potentials in smooth muscle with external electrodes. *J. Physiol. (Lond.)* 140, 156-67(1958).
85. Berger, W. Registrierung von Membranpotentialänderungen glatter Ringmuskelfasern des Froschmagens beim Einfluß verschiedener Ionenkonzentrationen.

(Eine Modifikation des Saccharose-Trennwandverfahrens) . Pflügers Archiv European Journal of Physiology 272, 37(1960).

86. Bolton, T., Tomita, T. & Vassort, G. in Smooth Muscle: An Assessment Of Current Knowledge (ed. eds. Bülbring, E., Brading, A., Jones, A., Tomita, T. & Edward, A.) (Raven Press, 1981).
87. Lammel, E. A theoretical study on the sucrose gap technique as applied to multicellular muscle preparations. I. Saline-sucrose interdiffusion. Biophys. J. 36, 533-53(1981).
88. Lammel, E. A theoretical study on the sucrose gap technique as applied to multicellular muscle preparations. II. Methodical errors in the determination of outward currents. Biophys. J. 36, 555-73(1981).
89. Lammel, E. A theoretical study on the sucrose gap technique as applied to multicellular muscle preparations. III. Methodical errors in the determination of inward currents. Biophys. J. 42, 159-70(1983).
90. Neher, E., Sakmann, B. & Steinbach, J.H. The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. Pflugers Arch. 375, 219-28(1978).
91. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F.J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflugers Arch. 391, 85-100(1981).
92. Amberg, G.C., Navedo, M.F. & Santana, L.F. On the loose: uncaging Ca^{2+} - induced Ca^{2+} release in smooth muscle. J. Gen. Physiol. 127, 221-3(2006).
93. Armstrong, C.M. & Loboda, A. A model for 4-aminopyridine action on K channels: similarities to tetraethylammonium ion action. Biophys. J. 81, 895-904(2001).
94. Yeh, J.Z., Oxford, G.S., Wu, C.H. & Narahashi, T. Dynamics of aminopyridine block of potassium channels in squid axon membrane. J. Gen. Physiol. 68, 519-35(1976).
95. Villarroel, A., Alvarez, O., Oberhauser, A. & Latorre, R. Probing a Ca^{2+} - activated K⁺ channel with quaternary ammonium ions. Pflugers Arch. 413, 118-26(1988).
96. Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R. & Phillips, M. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca^{2+} -activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. Nature 313, 316-8(1985).

97. Smith, C., Phillips, M. & Miller, C. Purification of charybdotoxin, a specific inhibitor of the high-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel. *J. Biol. Chem.* 261, 14607-13(1986).
98. Garcia, M. & Kaczorowski, G. in *Potassium Channel Modulators* (ed. eds. Weston, A. & Hamilton, T.) pp. 77-109 (Blackwell Scientific, 1992).
99. Garcia, M.L., Galvez, A., Garcia-Calvo, M., King, V.F., Vazquez, J. & Kaczorowski, G.J. Use of toxins to study potassium channels. *J. Bioenerg. Biomembr.* 23, 615-46(1991).
100. Habermann, E. Apamin. *Pharmacol. Ther.* 25, 255-70(1984).
101. Ts'ao, C.H., Glagov, S. & Kelsey, B.F. Special structural features of the rat portal vein. *Anat. Rec.* 166, 529-39(1970).
102. Hermann, A. & Gorman, A.L. Effects of tetraethylammonium on potassium currents in a molluscan neurons. *J. Gen. Physiol.* 78, 87-110(1981).
103. Liu, H., Li, K. & Sperelakis, N. Tyrosine kinase inhibitor, genistein, inhibits macroscopic L-type calcium current in rat portal vein smooth muscle cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75, 1058-62(1997).
104. Noack, T., Edwards, G., Deitmer, P., Greengrass, P., Morita, T., Andersson, P.O. et al. The involvement of potassium channels in the action of ciclazindol in rat portal vein. *Br. J. Pharmacol.* 106, 17-24(1992).
105. Standen, N.B. & Stanfield, P.R. A binding-site model for calcium channel inactivation that depends on calcium entry. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 217, 101-10(1982).
106. Gagné, S. & Plamondon, R. Tip potential of open-tip glass microelectrodes: theoretical and experimental studies. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 61, 857-69(1983).
107. Ince, C., van Bavel, E., van Duijn, B., Donkersloot, K., Coremans, A., Ypey, D.L. et al. Intracellular microelectrode measurements in small cells evaluated with the patch clamp technique. *Biophys. J.* 50, 1203-9(1986).
108. Aiello, E.A., Walsh, M.P. & Cole, W.C. Phosphorylation by protein kinase A enhances delayed rectifier K^+ current in rabbit vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 268, H926-34(1995).
109. Sperelakis, N., Xiong, Z., Haddad, G. & Masuda, H. Regulation of slow calcium channels of myocardial cells and vascular smooth muscle cells by cyclic nucleotides and phosphorylation. *Mol. Cell. Biochem.* 140, 103-17(1994).

110. Schubert, R. & Nelson, M.T. Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 505-12(2001).
111. Ruiz-Velasco, V., Zhong, J., Hume, J.R. & Keef, K.D. Modulation of Ca²⁺ channels by cyclic nucleotide cross activation of opposing protein kinases in rabbit portal vein. *Circ. Res.* 82, 557-65(1998).
112. Shimamura, K. & Sunano, S. Effects of Bay K 8644 on the spontaneous electrical and mechanical activities of the rat portal vein. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 342, 554-8(1990).
113. Akita, T. & Kuba, K. Functional triads consisting of ryanodine receptors, Ca(2+) channels, and Ca(2+)-activated K(+) channels in bullfrog sympathetic neurons. Plastic modulation of action potential. *J. Gen. Physiol.* 116, 697-720(2000).
114. Barrett, J.N., Magleby, K.L. & Pallotta, B.S. Properties of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 331, 211-30(1982).
115. Hara, Y., Kitamura, K. & Kuriyama, H. Actions of 4-aminopyridine on vascular smooth muscle tissues of the guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.* 68, 99-106(1980).
116. Connor, J.A. & Stevens, C.F. Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *J. Physiol. (Lond.)* 213, 21-30(1971).
117. Hamon, G. & Worcel, M. Mechanism of action of angiotensin II on excitation-contraction coupling in the rat portal vein. *Br. J. Pharmacol.* 75, 425-32(1982).
118. Noble, D. The initiation of heartbeat. 2nd Ed. (ed. ed. Noble, D.) (Clarendon Press, 1969).
119. Attwell, D. & Laughlin, S.B. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 1133-45(2001).
120. Brugada, P. & Brugada, J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J. Am. Coll. Cardiol.* 20, 1391-6(1992).
121. Jervell, A. & Lange-Nielsen, F. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am. Heart J.* 54, 59-68(1957).
122. Datté, J.Y., Yapo, P.A. & Offoumou, M.A. Nitric oxide effect on 5-hydroxytryptamine-induced vasoconstrictions of isolated smooth muscle. *Pharmacol Rep* 57, 113-20(2005).

123. Reilly, W.M. & Burnstock, G. The effect of ATP analogues on the spontaneous electrical and mechanical activity of rat portal vein longitudinal muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 138, 319-25(1987).
124. Shimamura, K., Zhou, M., Toba, M., Kimura, S., Higuchi, T., Kawaguchi, H. et al. Effects of L-arginine on spontaneous contraction of the rat portal vein. *Pflugers Arch.* 446, 30-5(2003).
125. Shimamura, K., Kimura, S., Zhou, M., Wang, Y., Toba, M., Ohashi, A. et al. Evidence for the involvement of the cyclooxygenase-metabolic pathway in diclofenac-induced inhibition of spontaneous contraction of rat portal vein smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res* 41, 195-206(2005).

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

- $[Ca^{2+}]$ – Kalziumkonzentration
- $[Ca^{2+}]_s$ – Kalziumkonzentration im submembranösen Kompartiment
- $[Ca^{2+}]_c$ – Kalziumkonzentration im Kernkompartiment
- α – Anteil freier, ionisierter Kalziumionen an allen intrazellulären Kalziumionen
- 4AP – 4-Aminopyridin
- AP – Aktionspotenzial
- CTX – Charybdotoxin
- cAMP – zyklisches Adenosinmonophosphat
- F – Faraday-Konstante 96.485,34 C/mol
- I_{CaL} – L-Typ Kalziumstrom
- I_L – interzellulärer Längstrom
- I_M – lokal in einer (Modell-)Zelle erzeugter Ionenstrom
- I_{NI} – Nicht inaktivierender Hintergrundstrom
- I_{TOs} – langsam inaktivierender Auswärtsstrom
- I_{TOf} – schnell inaktivierender Auswärtsstrom
- I_X – durch bekannte Ströme nicht erklärter Teil von I_M
- ITX – Iberiotoxin
- k – Anteiliger Konzentrationsausgleich zwischen V_s und V_c .
- MSC – Multi Spike Complex
- n_{Ca} – Stoffmenge von Kalziumionen
- RMP – Ruhemembranpotential
- RPV – Rat Portal Vein
- STOCS – Spontaneous Transient Outward Current
- STICS – Spontaneous Transient Inward Current
- t – Zeit
- TEA – Tetraethylammonium
- V_s – Submembranöses Mikrokompartment
- V_c – Zentrales Mikrokompartment
- z – Ladungszahl (für Kalzium 2)

7.2 Ergänzende Materialien zum Haupttext

7.2.1 Pharmakologie der RPV

Die folgende Tabelle zeigt eine Auswahl der zahlreichen pharmakologischen Studien, die an Präparationen der RPV durchgeführt wurden. Eine Zusammenfassung der unter physiologischen Gesichtspunkten relevanten Ergebnisse gibt der Haupttext im Abschnitt 1.1.1.

Quelle	Substanz	Kraft	Frequenz	Elektr. Aktivität	RMP
[122]	Serotonin	+	0		
[17]	Adrenalin	+	+	+	+
[17]	Acetylcholin	+	+	+/-	+/-
[20]	Verapamil	-	+	-	+
[117]	Angiotensin II	+	+	+	0
[117]	Tetrodotoxin	0	0		
[21]	Nifedipin	-			
[59]	Niflumic-Acid	-			
[25]	Progesteron	-	-		
[25]	Iberiotoxin 100nM	+			
[25]	TEA 1mM	+			
[25]	4-AP	+			
[25]	Apamin	-			
[25]	Bariumchlorid	+	-		
[25]	Glibenclamid	+	-		
[23]	Cromakalim (BRL34915)	--	--	--	--
[23]	Diazoxide	--	--	--	--
[23]	Minoxidil	--	--	--	-
[104]	Ciclazindol	+	-		
[104]	Glibenclamid	+	-		
[123]	ATP-Analoga	+	+	+	+
[124]	L-Arginin	0	+	+	+
[125]	Diclofenac	-	0	-	0
[24]	Pinacidil	-	-	-	

[26] (Meerschweinchen)	Charybdotoxin	0	0		
[26] (Meerschweinchen)	Iberiotoxin	0	0		
[26] (Meerschweinchen)	TEA 0,3-3mM	0	0		
[19]	Adrenalin	+	-		
[19]	Noradrenalin	+	-		
[19]	Acetylcholin	+	-		
[19]	ATP ADP AMP	--	-		
[19]	Angiotensin II	+	+		
[19]	Oxytocin	-	-		
[19]	Vasopressin	-	-		
[28]	4-AP	+			
[28]	TEA	+			
[28]	Charybdotoxin	+			
[28]	Apamin	0			

Tab. 7.1: Ausgewählte experimentelle Ergebnisse zu Effekten verschiedener Pharmaka auf die elektrische und mechanische Spontanaktivität der Portalvene. „+“ entspricht einer Zunahme, „-“ einer Abnahme, „0“ keiner klaren Änderung der jeweiligen Größe. In der Spalte "RMP" entspricht “-“ einer Hyper-, “+“ einer Depolarisation des Ruhemembranpotentials. Alle bis auf die gekennzeichnete Arbeit von Suarez-Kurz et al. [26] beziehen sich auf die Portalvene der Ratte.

7.2.2 Die Strom-Spannungsbeziehung von I_{CaL} und gemessenen Strömen

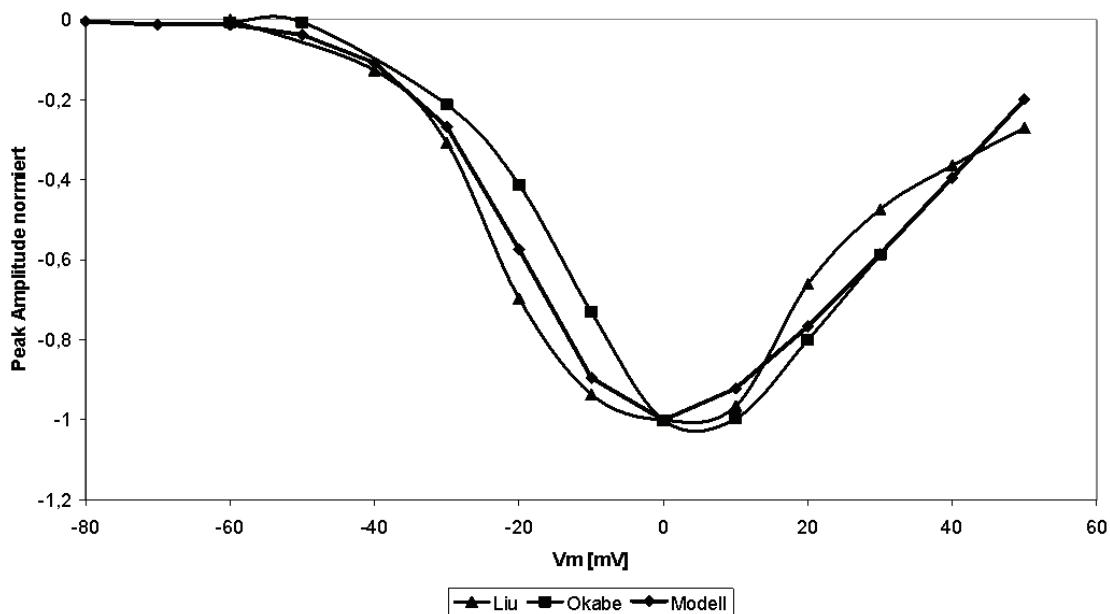


Abb. 7.1: Die Strom-Spannungsbeziehung der maximalen Amplituden bei verschiedenen Testpotentialen zeigte eine gute Übereinstimmung zwischen dem Modellstrom I_{CaL} mit den von [103] und [61] publizierten Daten. Die jeweils ermittelte maximale Amplitude wurde auf den Betrag 1 normiert.

7.2.3 Transformation der Rohdaten zum Spannungsverlauf

Wie im Haupttext im Abschnitt 3.1.1 angegeben, wurde eine Spreizungsfunktion auf die Rohdaten aus den intrazellulären Mikroelektrodenmessungen angewendet. Die Rationale hierfür wird im Einleitungsteil des Haupttextes diskutiert und besteht im Wesentlichen darin, dass Shuntströme, die über das von der Mikroelektrode ausgehende Membranleck fließen, zu einer Unterschätzung des Membranpotentials führen.

Die angewendete Spreizungsfunktion hat die in Gl. 7.1 angegebene Form:

$$U_S = 2 * U_R + 40 \quad (7.1)$$

Hierbei steht U_S für das transformierte Potential, U_R für die Rohdaten der Registrierung. Diese Funktion bewirkt einen Transformation der Daten dahingehend, dass der Wert des bisherigen Ruhepotentials nunmehr bei etwa -80mV statt -60mV und der Wert der maximalen Spike-Depolarisationen etwa 0mV statt -20mV beträgt. Das Ergebnis wird mit Abb. 7.2 veranschaulicht, die den bekannten MSC-Verlauf zeigt. Ab dem durch einen Pfeil gekennzeichneten Zeitpunkt wechselt der Datensatz von den Ausgangsdaten zur angewendeten Spreizungsfunktion. Wie aus der Abbildung ersichtlich, bewirkt die Transformation keine wesentliche Veränderung des Plateau potenzials des MSC.

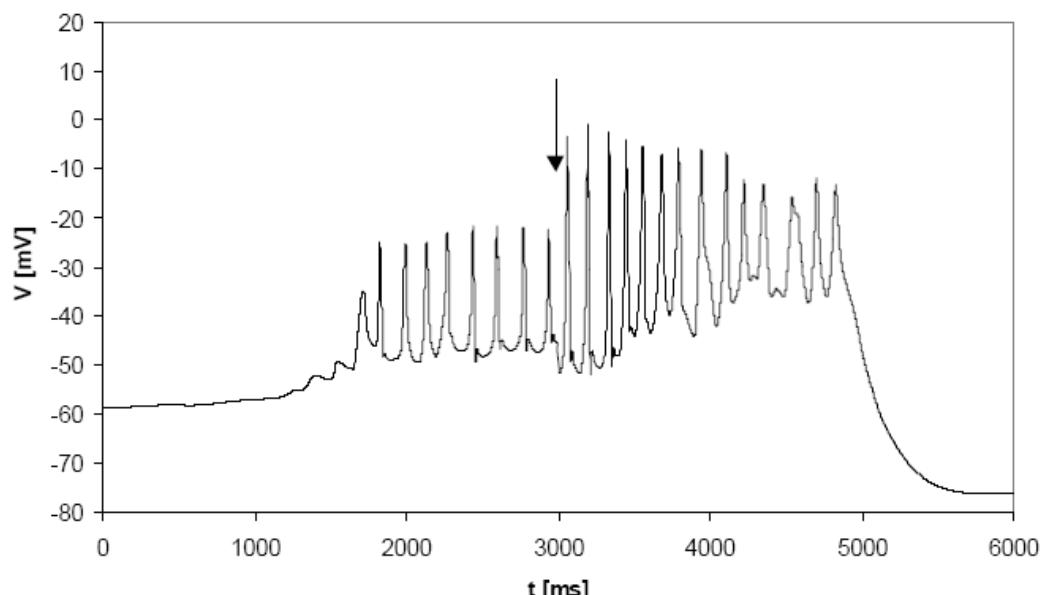


Abb. 7.2: MSC-Verlauf nach Rohdaten und nach Anwendung der Spreizungsfunktion Gl. 7.1, Wechsel beim Pfeil

7.2.4 Parameter der Aktivierung und Inaktivierung von I_{TOf} und I_{TOs}

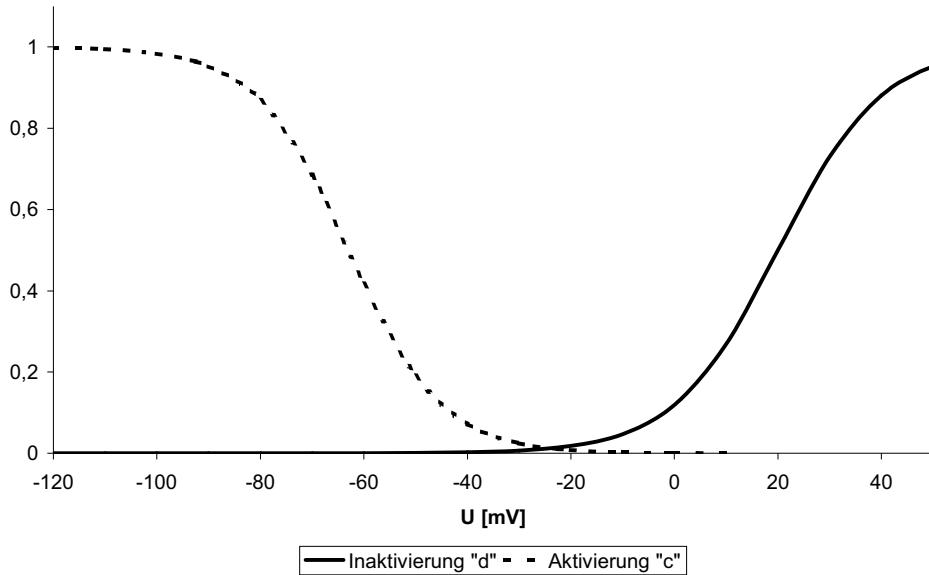


Abb. 7.3:

Steady-State-Aktivierung und -Inaktivierung des langsamen spannungsabhängigen Auswärtsstroms I_{TOs} . Die Ordinate ist mit relativen Einheiten bezeichnet, der Wert „1“ entspricht einer vollständigen, „0“ einer nicht vorhandenen Aktivierung („d“) bzw. vollständigen Verfügbarkeit („c“).

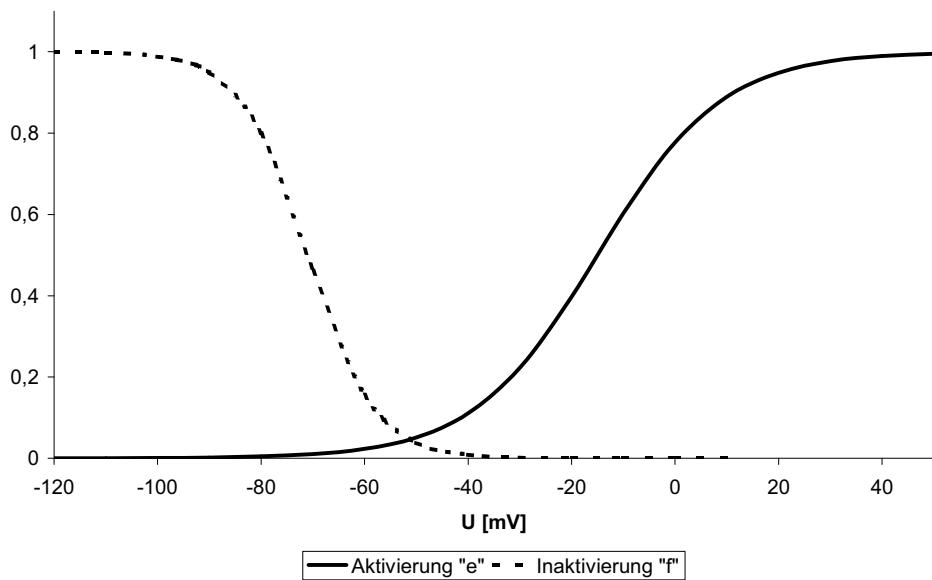


Abb. 7.4: Steady – State Aktivierung und Inaktivierung des schnellen spannungsabhängigen Auswärtsstroms I_{TOf} . Die Ordinate ist mit relativen Einheiten bezeichnet, der Wert „1“ entspricht einer vollständigen, „0“ einer nicht vorhandenen Aktivierung („e“) bzw. vollständigen Verfügbarkeit („f“). Die Inaktivierungskurve zeigt ihren halbmaximalen Wert tief im negativen Potenzialbereich und hat einen steilen Verlauf, so dass schon bei leichten Depolarisationen eine deutliche Einschränkung der Verfügbarkeit eintritt, die wegen der schnellen Kinetik dieses Stromes besonders schnell wirksam wird.

7.2.5 Modellierung von Änderungen der Kalziumkonzentration

Die Berechnung der Kalziumkonzentration wurde in Anlehnung an die Modelle von Lang et al. [50] sowie von Standen et al. [105] durchgeführt. Das Modell basiert auf der Annahme eines submembranösen Kompartiments, welches dem unmittelbar an die inneren Poren der spannungsabhängigen Kalziumkanäle angrenzenden Raum entspricht. In der Literatur werden die einzelnen Elemente dieses Kompartimentes oft als Mikrodomänen bezeichnet. In diesen Mikrodomänen sind Kalziumkanäle und kalziumabhängige Ionenkanäle (z.B. $BK_{(Ca)}$) eng benachbart, so dass die schnellen Konzentrationsänderungen in der Domäne direkte Auswirkungen auf andere Ionenkanäle haben, ohne dass es zu detektierbaren Änderungen von $[Ca^{2+}]$ in zentralen Abschnitten der Zelle kommen muss.

Das von extrazellulär einströmende Kalzium im submembranösen Kompartiment steht im diffusionsvermittelten Ausgleich mit dem zentralen Zytoplasma.

Das hier vorliegende stark vereinfachende Modell ist darauf ausgerichtet, die Änderungen von $[Ca^{2+}]$ im submembranösen Kompartiment V_S während der schnellen Spikes der MSC der RPV abzuschätzen. Hierzu wurde zunächst die Stoffmenge an Kalzium n berechnet, die pro Zeiteinheit in die Zelle gelangt. Grundlage der Berechnung ist der beschriebene Modellstrom I_{CaL} . Die Berechnung erfolgt auf Grundlage der Faradayschen Gesetze:

$$n_{Ca} = \alpha \frac{I_{Ca} * t}{z * F} \quad (7.2)$$

Hierbei entspricht t der Zeit, z der Ladungszahl von Kalzium und F der Faradayschen Konstante. Der Faktor α bildet das Verhältnis zwischen freiem und gebundenem Kalzium, wie es experimentell an Zellen der RPV ermittelt wurde. Es beträgt nach Daten von Kamishima et al. (1996) 1:114.

Das Verteilungsvolumen für das einströmende Kalzium wird auf Grundlage der für die Berechnung der Membrankapazität angenommenen Werte (Gl. 2 und 3, Abschnitt

3.1.2) ermittelt und die Zelle vereinfachend als zylindrisch geformtes Objekt angenommen. Entsprechend ergibt sich für das totale Zellvolumen V_t :

$$V_t = \Pi * r^2 * l = \Pi * 3,5 \mu\text{m}^2 * 100 \mu\text{m} = 3,85 \text{ pl} \quad (7.3)$$

Hierbei entspricht r dem Radius des Zylinders und l der Länge.

Im nächsten Schritt wird das submembranöse Kompartiment V_s als Anteil am Gesamtvolumen V_t definiert. Der Anteil von V_s an V_t wird durch einen dimensionslosen Faktor s definiert:

$$V_s = V_t * s \quad (7.4)$$

Im so definierten submembranösen Raum V_s wird $[\text{Ca}^{2+}]$ durch das von außen einströmende Kalzium einerseits und den diffusionsbedingten Austausch mit dem Kernkompartiment andererseits bestimmt:

$$\Delta C_s = \frac{n_{\text{Ca}}}{V_s} + k * ([\text{Ca}^{2+}]_c - [\text{Ca}^{2+}]_s) \quad (7.5)$$

Hierbei entspricht $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_s$ der Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]$ im submembranösen, $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ im zentralen Kompartiment während des betrachteten Zeitraums. Der zweite Term von Gl. 7.5 beschreibt die Effekte der Ausgleichsbewegung zwischen den Kompartimenten. Sind beide Konzentrationen gleich, so nimmt dieser Term den Wert 0 an und $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_s$ wird allein durch das von extrazellulär einströmende Kalzium bestimmt. Sind die Konzentrationen verschieden, so bestimmt der Faktor k den Umfang der im betrachteten Intervall stattfindenden Konzentrationsangleichung zwischen submembranösem und zentralem Kompartiment. Aus Gründen der Übersichtlichkeit und Beschränkung auf die Kernfragestellung wurde $[\text{Ca}^{2+}]$ im zentralen Kompartiment als konstant bei 100nmol/l angenommen.

Auch in V_S besteht unter Ruhebedingungen zum Zeitpunkt t_0 eine Kalziumkonzentration von 100nmol/l. Ihre Änderungen im zeitlichen Verlauf wurde numerisch in diskreten Schritten aus den Vorwerten und den Änderungen im gewählten Berechnungsintervall ermittelt. Die entsprechende Formel zur Berechnung der Konzentration im zeitlichen Verlauf lautet entsprechend:

$$[Ca^{2+}]_S(t_n) = [Ca^{2+}]_S(t_{n-1}) + \Delta[Ca^{2+}]_S \quad (7.6)$$

Die folgenden Abbildungen 7.5 und 7.6 zeigen den Verlauf von $[Ca^{2+}]$ in Abhängigkeit von den gewählten Werten für die Größe des zentralen Kompartimentes und die Geschwindigkeit des Konzentrationsausgleiches mit dem zentralen Kompartiment. Dabei zeigt sich wie erwartet, dass ein größerer Wert von V_S zu niedrigeren Werten von $[Ca^{2+}]_S$ führt, die zeitliche Dynamik der Änderungen sich jedoch nicht wesentlich ändert.

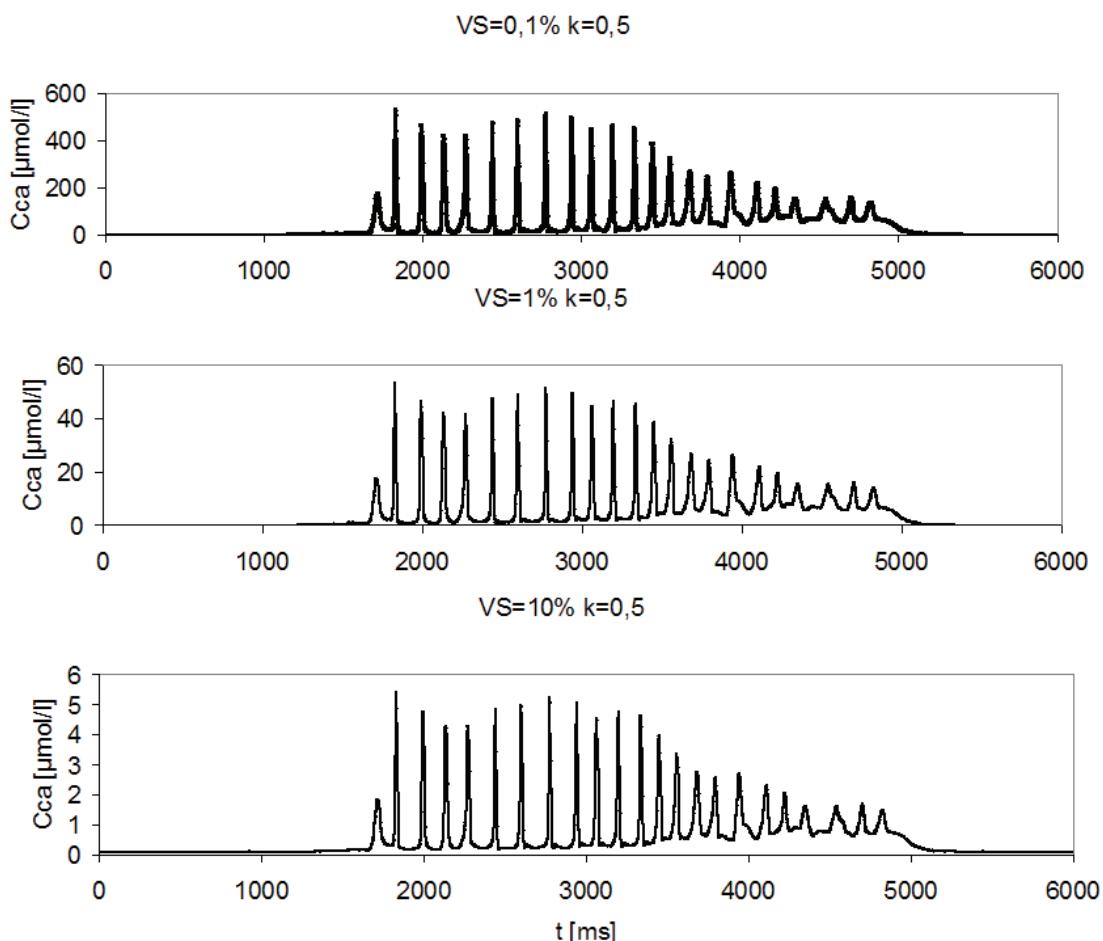


Abb. 7.5: Modellberechnung von $[Ca^{2+}]_S$ während eines MSC in Abhängigkeit von Änderungen des Anteils von V_S am gesamten Volumen der Zelle bei konstanten Diffusionsraten. Der jeweilige Anteil von V_S ist jeweils über der Verlaufsgrafik angegeben.

Hingegen bewirken Verringerungen der Diffusionsgeschwindigkeit eine Akkumulation von Kalzium während des MSC, während höhere Diffusionsgeschwindigkeiten eher kleinere Kalziumspikes ohne wesentliche Erhöhungen von $[Ca^{2+}]$ im Intervall und im Verlauf des MSC zur Folge haben. Für die weitere Diskussion der Ergebnisse der Modellbildung sei auf den Haupttext verwiesen.

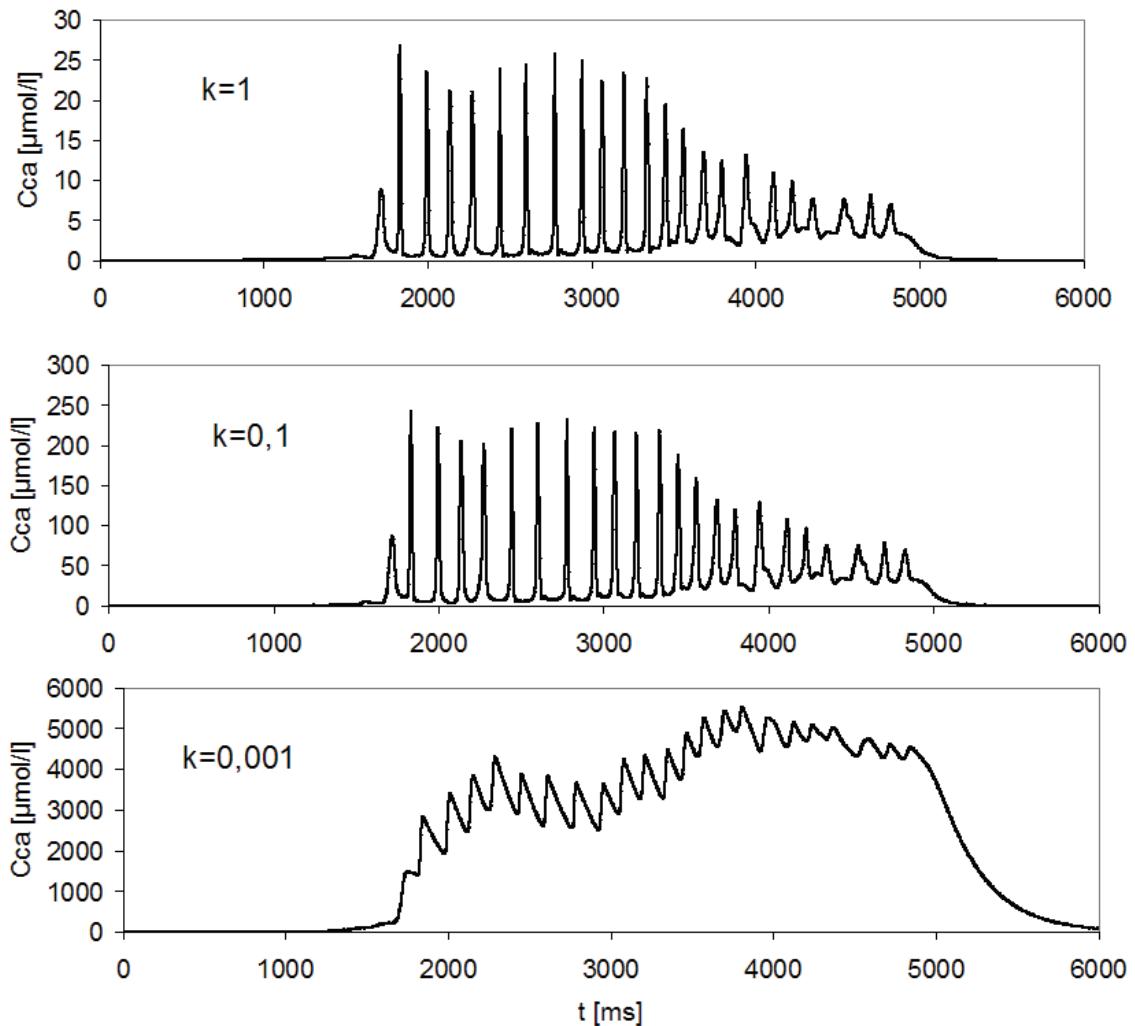


Abb. 7.6: Modellberechnung von $[Ca^{2+}]_s$ während eines MSC in Abhängigkeit von Änderungen der dimensionslosen Diffusionsrate k und konstantem Wert für den Anteil von V_s am gesamten Volumen der Zelle. Der jeweilige Anteil von k ist jeweils im linken Teil der Verlaufsgrafik angegeben.

7.2.6 Effekte von Kaliumkanalblockern auf die mechanische Spontanaktivität der RPV

	p 1 vs. 3 mM	1 vs. 10 mM	3 vs. 10 mM
Integral	n.s.	n.s.	n.s.
Amplitude	n.s.	0,03	n.s.
Frequenz	0,02	0,001	0,02
Dauer	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 7.2: Darstellung der Signifikanzen (p) für die Effekte von Änderungen der TEA-Konzentration auf die mechanische Spontanaktivität. Die obere Zeile gibt an, für welche Konzentrationen jeweils die Effekte auf die in der linken Spalte genannten Parameter verglichen und statistisch getestet wurden (n.s. – nicht signifikant; mM – mmol/l)

	p 5 vs. 45 nM	5 vs. 250 nM	45 vs. 250 nM
Integral	n.s.	0,004	n.s.
Amplitude	0,034	0,001	0,047
Frequenz	n.s.	n.s.	n.s.
Dauer	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 7.3: Darstellung der Signifikanzen (p) für die Effekte von Änderungen der CTX-Konzentration auf die mechanische Spontanaktivität. Die obere Zeile gibt an, für welche Konzentrationen jeweils die Effekte auf die in der linken Spalte genannten Parameter verglichen und statistisch getestet wurden (n.s. – nicht signifikant; nM – nmol/l)

	p 0,3 vs. 1 mM	0,3 vs. 3 mM	1 vs. 3 mM
Integral	n.s.	0,04	0,3
Amplitude	n.s.	n.s.	n.s.
Frequenz	n.s.	n.s.	n.s.
Dauer	n.s.	0,025	n.s.

Tab. 7.4: Darstellung der Signifikanzen für die Effekte von Änderungen der 4-AP-Konzentration auf die mechanische Spontanaktivität. Die obere Zeile gibt an, für welche Konzentrationen jeweils die Effekte auf die in der linken Spalte genannten Parameter verglichen und statistisch getestet wurden (n.s. – nicht signifikant; mM – mmol/l)

7.3 Veröffentlichungen

Vorträge:

R. Patejdl, Th. Noack: Analyse und Modellbildung der elektrischen Spontanaktivität der Portalvene. Treffen der Ostseephysiologen, Greifswald, 05.06.2004

R. Patejdl, Th. Noack: Analyse und Modellbildung der elektrischen Spontanaktivität der Portalvene. 33. Rostocker Gespräche über kardiovaskuläre Funktion und Hypertonie, Rostock, 26.06.2004

R. Patejdl, Th. Noack: The importance of Kv and Kca channels in action potential generation in vascular smooth muscle. 84. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Göttingen, 07.03.2005

R. Patejdl, Th. Noack: Schnelle Änderungen freien Calciums an der intrazellulären Membran steuern Calcium-aktivierte Kaliumkanäle in schneller Abfolge am Gefäßmuskel auch unter physiologischen Bedingungen. 34. Rostocker Gespräche über kardiovaskuläre Funktion und Hypertonie, Rostock, 04.05.2005

R. Patejdl, Th. Noack: Spontaneous activity of the portal vein: Experimental results and mathematical model. Joint Workshop on smooth muscle function, Rostock, 06.12.2005

R. Patejdl, Th. Noack: Spontaneous electrical activity of the rat portal vein - The effects of potassium channel modulators. Joint Workshop on smooth muscle function, Rostock, 17.12.2007

R. Patejdl, Th. Noack: Analyse des vaskulären Aktionspotenzialverlaufs und dessen Komponenten am Rattenmodell. 37. Rostocker Gespräche über kardiovaskuläre Funktion und Hypertonie, Rostock, 31.05.2008

Originalarbeiten

R. Patejdl, P. Noack, H.-H. Hopp, A. Weston and Th. Noack: The importance of the different ionic current components in action potential generation in vascular smooth muscle (portal vein). Trace Elements and Electrolytes, Volume 22, No. 4/2005, 248-253

Abstracts

R. Patejdl, Th. Noack: The importance of Kv and Kca channels in action potential generation in vascular smooth muscle. Pflügers Archiv European Journal of Physiology Volume 449, Supplement - 01 / März 2005

R. Patejdl, Th. Noack: Importance of Calcium Activated Potassium Currents for the Electrical Activity during Vasomotion in Vascular Smooth Muscle. Journal of Vascular Research, 2006; Volume 43

Poster

R. Patejdl, Th. Noack: Importance of Calcium Activated Potassium Currents for the Electrical Activity during Vasomotion in Vascular Smooth Muscle. Annual Meeting of the German Society for Microcirculation and Vascular Biology Rostock, Germany, September 16th, 2005

T. Noack, G. Genrich, R. Patejdl: Transversal coordination of spontaneous activity in smooth muscle, 88. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Gießen 04.03.2009

7.4 Lebenslauf

Daten zur Person

Name: Robert Patejdl

Anschrift: Borwinstraße 13, 18057 Rostock

Geburtsdatum: 09.03.1982

Geburtsort: Rostock

Familienstand: ledig

Ausbildung:

1989 – 1993 J. Gagarin – Grundschule Rostock

1993 – 2000 Südstadt – Gymnasium Rostock
Abschluss mit allgemeiner Hochschulreife

2000 – 2001 Zivildienst, Arbeiterwohlfahrt Kröpelin

2001 – 2006 Studium der Humanmedizin, Universität Rostock

Berufliche Tätigkeit:

1/2007 – heute Klinik für Neurologie und Poliklinik, Universität Rostock
Facharztausbildung

7.5 Selbständigkeitserklärung / Eidesstattliche Erklärung nach § 4 Abs. 2.5

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, 06.04.2009

Robert Patejdl

7.6 Danksagung

Die vorliegenden Untersuchungen entstanden auf Anregung von Prof. Dr. Noack, der mich ermutigte, aus einem zunächst unverbindlichen Interesse für Elektrophysiologie gezielte Untersuchungen und letztlich eine Dissertation zu entwickeln. Ihm danke ich herzlich für die jederzeit großzügig gewährte fachliche Beratung und Begleitung der Arbeit.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Physiologie, namentlich besonders bei Dr. Hans-Heinrich Hopp, Ulrike Mikkat und Dr. Hartmut Mewes.

Meinen Lehrern an Schule und Hochschule, namentlich stellvertretend Herrn Dr. Thomas Walter, danke ich für das von Ihnen im mir geweckte und fortentwickelte Interesse an naturwissenschaftlichen Fragestellungen und Arbeitmethoden.

Meiner Lebensgefährtin und meinen Eltern danke ich für die vielfältige Unterstützung während des Studiums und während der Fertigstellung dieser Arbeit.

8 Thesen

1. Teile der glatten Muskulatur des Gefäßsystems und des Gastrointestinaltrakts zeigen eine elektrische und mechanische Spontanaktivität. Diese ist die Grundlage zahlreicher basaler physiologischer Transport-, Speicherungs- und Durchmischungsprozesse. Die Analyse und Zuordnung der Bedeutung einzelner Ionenströme für die Ausbildung der schnellen Anteile der elektrischen Aktivität, die sogenannten „schnellen Spikes“, war Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Als Modellpräparat wurde die Portalvene der Ratte (RPV) gewählt.
2. Die RPV generiert schnelle Spikes im Rahmen von Multi-Spike-Komplexen (MSCs).
Als Grundlage der Analyse wurde der Nettostrom während des schnellen Spikes errechnet. Dies erfolgte auf Grundlage des kapazitiven Stroms, der numerisch auf Grundlage des Potentialverlaufs ermittelt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass dem Spike ein monophasischer Einwärtsstrom und ein zweiphasiger Auswärtsstrom zu Grunde liegt.
3. Zur Rekonstruktion des Nettostroms wurden ein Kalziumstrom (I_{CaL}), ein schnell und ein langsam inaktivierender Auswärtsstrom (I_{TOf} und I_{TOs}) sowie ein nicht inaktivierender Hintergrundstrom (I_{NI}) berechnet. Die einzelnen Ströme entsprechen den in Patch-Clamp-Experimenten charakterisierten Komponenten.
4. Der dem schnellen Spikes zu Grunde liegende Einwärtsstrom wurde durch I_{CaL} hinreichend erklärt, was die physiologische Relevanz der in Patch-Clamp-Messungen charakterisierten Einwärtsströme bestätigt. Im Verlauf eines MSC kommt es zur langsamen Inaktivierung in I_{CaL} und somit zur Abnahme seiner Amplitude.
5. I_{TOf} ist nur während der ersten Spikes eines MSC vorhanden und wirkt den schnellen Depolarisationen entgegen. I_{TOs} inaktiviert im späteren MSC-Verlauf teilweise. I_{NI} bewirkt eine Stabilisierung des Ruhemembranpotentials.

Die während der schnellen Spikes fließenden Nettoströmen werden von den bekannten Auswärtsströmen nur teilweise erklärt.

6. Der sich daraus ergebende Differenzstrom zwischen den Auswärtsströmen des Modells und dem Nettostrom hat eine schleifenförmig-hysteretische Strom-Spannungsbeziehung, die einer deutlichen Änderung der Leitfähigkeit in einem Zeitraum von weniger als 10 Millisekunden entspricht. Da alle bekannten spannungsabhängigen Ströme in das Modell eingeschlossen wurden, muss es sich um einen in Patch-Clamp-Messungen bislang nicht charakterisierten Strom handeln, dessen Aktivierung nicht ausschließlich spannungsabhängig ist. Diese Voraussetzungen erfüllt der kalziumabhängigen Kaliumstrom $I_{BK(Ca)}$.
7. Berechnungen des zeitlichen Verlauf der intrazellulären Kalziumkonzentration „ $[Ca^{2+}]$ “ auf Grundlage des Flusses von I_{CaL} zeigen, dass während der schnellen Spikes in der Umgebung der Kalziumkanäle für $[Ca^{2+}]$ Werte im millimolaren Bereich anzunehmen sind. Dies entspricht dem Aktivierungsbereich von $I_{BK(Ca)}$.
8. Experimentelle Untersuchungen mit den $BK_{(Ca)}$ -Kanal-Blockern Tetraethylammonium (TEA), Charybdotoxin (CTX) und 4-Aminopyridin (4-AP), einem Blocker spannungsabhängiger Kaliumkanäle (K_V), ergaben für alle getesteten Substanzen auf mechanischer Ebene eine Zunahme der kumulativen Kontraktionskraft, der Amplitude und Dauer der Einzelkontraktionen sowie eine Abnahme der Kontraktionsfrequenz. Damit konnte gezeigt werden, dass sowohl K_V als auch $BK_{(Ca)}$ – Kanäle für die physiologischen Erregungsmuster relevant sind.
9. Extrazelluläre Ableitungen der spontanen elektrischen Aktivität zeigen, dass TEA und CTX zu einer Verlangsamung der schnellen Spike-Abläufe führen, während 4-AP eine Beschleunigung der Spike-Entladungen bewirkt. Daraus kann geschlossen werden, dass 4-AP-sensitive K_V -Ströme eine verlangsamte Generierung von Spikes bewirken. $BK(Ca)$ -Ströme sind anscheinend direkt an der Repolarisation der schnellen Spikes beteiligt und bilden die Grundlage für den hier identifizierten Auswärtsstrom mit hysteretischer Strom-Spannungsbeziehung.