

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Rostock

Direktor: Prof. Köhling

***Modulation der myogenen Reaktion
kleiner Arterien durch den Kaliumkanalblocker BDS-I***

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Esther Uhlig

geboren am 23.01.1980 in Karl-Marx-Stadt

Schwerin, 08.06.2010

*Gutachter 1: Prof. Dr. Rudolf Schubert, Medizinische Fakultät Mannheim,
Universität Heidelberg*

*Gutachter 2: PD Dr. Timo Kirschstein, Medizinische Fakultät Universität
Rostock*

Gutachter 3: Prof. Dr. A. Patzak, Humboldt Universität zu Berlin

Tag der Verteidigung: 02.03.2011

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| <i>Abkürzungen</i> | 6 |
| <i>1 Einleitung</i> | 7 |
| 1.1 Die myogene Reaktion | 7 |
| 1.2 Die glatte Muskulatur | 8 |
| 1.3 Mechanismus der myogenen Reaktion | 8 |
| 1.3.1 Intrazelluläre Signaltransduktionswege | 12 |
| 1.4 Kaliumkanäle | 13 |
| 1.5 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle | 14 |
| 1.5.1 Blocker spannungsgesteuerter Kaliumkanäle | 14 |
| 1.5.1.1 4-Aminopyridin (4-AP) | 14 |
| 1.5.1.2 BDS-I („blood pressure depressing substance“) | 15 |
| 1.6 Aufgabenstellung | 16 |
| <i>2 Material und Methoden</i> | 18 |
| 2.1 Tiermodell | 18 |
| 2.2 Untersuchungsobjekt | 18 |
| 2.3 Gefäßpräparation | 18 |
| 2.4 Fixierung der Arterie in der Messkammer | 19 |
| 2.4.1 Isobare Versuchsanordnung | 19 |
| 2.4.2 Isometrische Versuchsanordnung | 20 |
| 2.5 Versuchsablauf | 21 |
| 2.5.1 Isobare Versuchsanordnung | 21 |
| 2.5.2 Isometrische Versuchsanordnung | 24 |
| 2.6 Reaktive | 25 |
| 2.7 Statistik | 25 |
| <i>3 Ergebnisse</i> | 26 |
| 3.1 Reaktivitätsprüfung der Gefäße | 26 |
| 3.2 Die Wirkung von 4-Aminopyridin und BDS-I auf den myogenen Tonus | 30 |
| 3.3 Mechanismus der Wirkungsweise von BDS-I | 32 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.4 | Die Wirkung von BDS-I auf die myogene Reaktion | 33 |
| 4 | <i>Diskussion</i> | 35 |
| 4.1 | Methodendiskussion | 35 |
| 4.1.1 | Versuchslösungen | 35 |
| 4.1.2 | Präparation der Gefäße | 36 |
| 4.1.3 | Isobarer und isometrischer Versuchsaufbau | 37 |
| 4.2 | Wirkung von 4-Aminopyridin und BDS-I auf den myogenen Tonus | 38 |
| 4.2.1 | 4-Aminopyridin | 38 |
| 4.2.2 | BDS-I | 38 |
| 4.3 | Mechanismus der dilatierenden Wirkungsweise von BDS-I | 39 |
| 4.4 | Wirkung von BDS-I auf die myogene Reaktion | 40 |
| 5 | <i>Zusammenfassung</i> | 43 |
| 6 | <i>Literaturverzeichnis</i> | 44 |
| 7 | <i>Thesen</i> | 49 |
| | <i>Selbständigkeitserklärung</i> | 51 |
| | <i>Lebenslauf</i> | 52 |
| | <i>Danksagung</i> | 53 |

Abkürzungen

| | |
|--------------------|--|
| 4-AP | 4-Aminopyridin |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BDS-I | blood pressure depressing substance = blutdrucksenkende Substanz |
| con | Kontrolle |
| DAG | Diacylglycerin |
| DEA-NO | 2-(N,N-Diethylamino)-diazolat-2-oxid.diethylammonium |
| dia ₄₀ | Durchmesser bei 40mmHg |
| dia ₈₀ | Durchmesser bei 80mmHg |
| dia ₁₂₀ | Durchmesser bei 120mmHg |
| dia _{max} | maximaler Durchmesser |
| dia _{akt} | Durchmesser zu einem bestimmten Zeitpunkt |
| 20-HETE | 20-Hydroxyeicosatetraenoidsäure |
| IP ₃ | Inositoltrisphosphat |
| KCa-Kanäle | kalziumgesteuerte Kaliumkanäle |
| Kv-Kanäle | spannungsgesteuerte Kaliumkanäle |
| MLC | Myosinleichtkettenkinase |
| MLCP | Myosinleichtkettenphosphatase |
| NADPH | reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat |
| PKC | Proteinkinase C |
| TEA | Tetraethylammonium |
| TTX | Tetrodotoxin |
| VSMC | vascular smooth muscle cells = glatte Gefäßmuskelzellen |

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der myogenen Reaktion kleiner Blutgefäße und der Rolle von spannungsabhängigen Kaliumkanälen (Kv-Kanälen) bei dieser Reaktion.

1.1 Die myogene Reaktion

Die myogene Reaktion von Arterien spielt bei der Autoregulation von Blutfluss und -druck im Herzkreislaufsystem eine führende Rolle. Diese besonders in Gehirn-, Nieren- und Skelettmuskelgefäßen ausgeprägte Reaktion der Blutgefäße in Antwort auf intraluminale Druckänderungen nennt man auch Baylisseffekt, der erstmals 1902 beschrieben wurde.

Diese Reaktion gewährleistet im nachgeschalteten Kapillargebiet eine annähernd konstante Perfusion, auch wenn es zu systemischen Blutdruckschwankungen des Organismus im physiologischen Bereich kommt. Die Intensität der myogenen Reaktion hängt stark von den betrachteten Gefäßgebieten und der Größe der kleinen Arterien ab. So wird der Baylisseffekt besonders ausgeprägt in mittelgroßen Blutgefäßen, jedoch schwächer bei großen bzw. sehr kleinen Gefäßen beobachtet. Weiterhin zeigt sich die Antwort in z.B. Gehirnarterien ausgeprägter als in Mesenterialarterien.

Der Auslöser für die Gefäßkontraktion bei Erhöhung des Drucks ist nicht der Druck selbst, sondern die durch ihn erzeugte Erhöhung der Wandspannung der kleinen Arterien. Durch die Kontraktion wird die Wandspannung anschließend wieder verringert (Schubert and Mulvany 1999).

Die Wand arterieller Blutgefäße besteht von innen nach außen aus Endothel, glattem Muskel und Adventitia, in der sich Nervenendigungen befinden. Die für die myogene Reaktion verantwortlichen Mechanismen spielen sich ausschließlich im glatten Muskel ab, wie Versuche nach mechanischer Entfernung des Endothels und Blockade von Nervenendigungen in der Adventitia mit Tetrodotoxin, Phentolamin, Propranolol und Atropin gezeigt haben. Nach Nervenblockade und Entfernung des Endothels kam es zu keiner Änderung der myogenen Reaktion, was gegen eine Beteiligung des Endothels bzw. der Nervenendigungen spricht (Schubert and Mulvany 1999; Anschutz and Schubert 2005).

1.2 Die glatte Muskulatur

Die Erhöhung der Kalziumkonzentration in glatten Muskelzellen führt über komplexe Mechanismen zur Kontraktion. Die zunehmende Interaktion zwischen Aktin und Myosin nach Druckerhöhung bewirkt eine Verkürzung glatter Muskelzellen. Da diese im Blutgefäß zirkulär angeordnet sind, wird die Verkürzung in eine Vasokonstriktion „übersetzt“.

Eingeströmtes und/oder freigesetztes Kalzium bindet in den glatten Muskelzellen an Calmodulin. Dieser Komplex aktiviert Proteinkinasen, die Caldesmon am Aktinfilament und die leichten Myosinketten des Myosinkopfes phosphorylieren. Caldesmon blockiert bei niedriger Kalziumkonzentration die Bindungsstelle für den Myosinkopf am Aktin; nach Phosphorylierung ist eine Deblockade zu verzeichnen. Durch die Übertragung einer Phosphatgruppe von ATP durch die MLC-Kinase auf die leichten Myosinketten kommt es zur Interaktion des Myosins mit Aktin und zur Kontraktion (Silbernagl 2001). Im nicht phosphorylierten Status wird die Interaktion zwischen Aktin und Myosin verhindert. Das Gleichgewicht zwischen nichtphosphoryliertem und phosphoryliertem Myosin wird von zwei Enzymen bestimmt: der Myosinleichtkettenkinase (MLCK) und der Myosinleichtkettenphosphatase (MLCP). Dabei phosphoryliert die MLCK das Myosin und führt zur Kontraktion, während die MLCP dephosphoryliert, den Muskel und somit die Arterie dilatieren lässt. Die MLCK wird vorrangig kalziumabhängig reguliert, das heißt, alle Stoffe, die den Kalziumspiegel beeinflussen, wirken sich gleichzeitig auf die MLCK aus. Trotz der Tatsache, dass Ca^{2+} unerlässlich für die myogene Reaktion ist, zeigen neuere Daten, dass auch andere, kalziumunabhängige Mechanismen eine wichtige Rolle spielen. Diese wurden erst kürzlich beschrieben und wirken hauptsächlich über eine Regulation der MLCP. Dabei bleibt die Aktivität der MLCK weitgehend konstant (Somlyo and Somlyo 2003).

1.3 Mechanismus der myogenen Reaktion

Die genauen Mechanismen der myogenen Reaktion sind noch Gegenstand intensiver Untersuchungen. Dabei scheint sicher zu sein, dass es durch die Erhöhung des transmuralen Drucks und durch die begleitende Erhöhung der Wandspannung zur Depolarisation der glatten Muskelzellen mit nachfolgendem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} und zur Gefäßkontraktion kommt. Die genaue Ursache der Depolarisation wird noch diskutiert. Die am meisten verbreitete Hypothese geht von Kanälen aus, die durch Dehnung aktiviert werden. Durch einen einwärtsgerichteten Kationenstrom kommt es zur Depolarisation und zur myogenen Reaktion (Welsh, Nelson et al. 2000). Weiterhin werden wahrscheinlich andere Kanäle, wie spannungsgesteuerte Kalziumkanäle (McCarron, Crichton et al. 1997) und kalziumaktivierte Ka-

liumkanäle (Kirber, Ordway et al. 1992; Dopico, Kirber et al. 1994) vom transmuralen Druck beeinflusst.

Durch die Depolarisation wird ein intrazellulärer Kalziumanstieg herbeigeführt, dessen hauptsächliche Quelle der Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} -Ionen durch spannungsgesteuerte Kalziumkanäle ist. Bei spezifischer Blockade von spannungsgesteuerten Kalziumkanälen bleibt die myogene Reaktion aus. Dagegen kontrahieren nach Zugabe von Bay K 8644, einer Substanz die diese Kanäle öffnet, Mesenterialgefäße der Ratte nach Druckerhöhung verstärkt (Wesselman, VanBavel et al. 1996). Der Kalziumeinstrom löst eine Signalkaskade aus, die die Phosphorylierung des Myosins steigert und so letztendlich zur Kontraktion führt. Wird der transmembrane Kalziumeinfluss blockiert, bleibt die Konstriktion aus, wobei die Depolarisation der Membran kaum beeinflusst wird (Knot and Nelson 1995; Knot and Nelson 1998). Andererseits bleibt die myogene Reaktion erhalten, wenn mittels einer hohen extrazellulären Kaliumkonzentration eine Depolarisation verhindert wird (McCarron, Crichton et al. 1997).

Für diese beiden Beobachtungen könnte es mehrere Erklärungen geben: 1. Kalziumionen spielen eher eine geringe Rolle im Auslösen der druckinitiierten Depolarisation; 2. die Depolarisation ist nicht unmittelbarer Auslöser der myogenen Reaktion und 3. es müssen Signalkaskaden parallel zur Depolarisation existieren (Schubert, Lidington et al. 2008). Fest steht jedoch, dass der Einstrom von extrazellulärem Kalzium von essentieller Bedeutung für die Auslösung des Baylisseeffekts ist. Kalziumfreie extrazelluläre Lösung verhindert den intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg (Zou, Ratz et al. 1995; Knot and Nelson 1998), die Phosphorylierung des Myosins (Zou, Ratz et al. 1995; Zou, Ratz et al. 2000) und damit letztendlich die druckassoziierte Kontraktion.

Weiterhin kommt es zu einer minimalen Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, dem sarkoplasmatischen Retikulum, in Form sogenannter „Sparks“ (Jaggar, Porter et al. 2000), deren Frequenz durch den transmuralen Druck reguliert wird (Jaggar 2001). Durch diese „Sparks“ werden Ca^{2+} -gesteuerte Kaliumkanäle (KCa-Kanäle) aktiviert. Kaliumionen strömen aus und die Membran hyperpolarisiert. Dadurch schließen sich die spannungsabhängigen Kalziumkanäle und die globale Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle sinkt. Damit bilden die KCa-Kanäle einen negativen Rückkopplungsmechanismus, der das Ausmaß der myogenen Reaktion limitiert. Passend zu dieser Hypothese ist die myogene Reaktion nach spezifischer Blockade der kalziumaktivierten Kaliumkanäle gesteigert (Brayden and Nelson 1992; Knot, Standen et al. 1998; Brenner, Perez et al. 2000; Jaggar 2001). Weiterhin gibt es endogene Mediatoren, wie der Cytochrom P450 abhängige Metabolit 20-HETE, der KCa-Kanäle hemmt und bei seiner Druck-induzierten Freisetzung die myogene Reaktion vermitteln könnte

(Lange, Gebremedhin et al. 1997; Gebremedhin, Lange et al. 2000). In einigen Arterienpräparationen wurde beobachtet, dass die Blockade von Cytochrom P450 abschwächend auf die myogene Reaktion wirkt (Kausser, Clark et al. 1991; Gebremedhin, Lange et al. 2000; Frisbee, Roman et al. 2001; Frisbee, Roman et al. 2001; Zhang, Wang et al. 2004). Cytochrom P450 ist ein Hämoprotein, welches als elektronenübertragendes Enzym in vielen Monooxygenasen enthalten ist. Diese wiederum sind von besonderer Bedeutung für Biotransformationsreaktionen der Leber. Allerdings gibt es keinen direkten Beweis für einen kausalen Zusammenhang zwischen Cytochrom P450, KCa-Kanälen und dem Baylisseffekt (Schubert, Lidington et al. 2008).

Ursprünglich wurde vermutet, dass die myogene Reaktion nur durch einen druckinduzierten Kalziumeinfluss zustande kommt, der dann zur Aktivierung von Calmodulin, der Myosinleichtkettenkinase und zur Phosphorylierung der Myosinketten führt.

Die Druck-induzierten Veränderungen im intrazellulären Kalziumhaushalt können den Ablauf der myogenen Reaktion jedoch nicht vollständig erklären. Messungen haben ergeben, dass nach anfänglichem initialen Kalziumanstieg und Kontraktion eine Erhaltungsphase folgt, in der die Kalziumkonzentration konstant bleibt und die Kontraktion weiter zunimmt. Diesen Mechanismus könnte eine zunehmende Ca^{2+} -Sensitivität erklären (Schubert, Lidington et al. 2008). Die Arbeitsgruppe Somlyo (Somlyo and Somlyo 2003) erklärt sich diesen Zusammenhang über das Aktivitätsverhältnis zwischen Myosinleichtkettenkinase und -phosphatase . Die gemessene Kalziumsensitivität müsste dabei dem Grad der MLC-Phosphorylierung bei einem konstanten Kalziumspiegel durch veränderte Aktivität der MLCP entsprechen (Somlyo and Somlyo 2003). Ungünstiger Weise ist die Bestimmung der MLCP-Aktivität mittels Routineverfahren bei den in dieser Arbeit untersuchten kleinen Arterien bisher nicht möglich (Schubert, Lidington et al. 2008).

Die Arbeitsgruppe Lagaud et al. setzte isolierte Arterien einer hohen extrazellulären Kaliumlösung aus. Dadurch depolarisierten glatte Muskelzellen, L-Typ Kalziumkanäle öffneten sich und Kalziumionen konnten die Membran durchqueren. Durch Applikation von 60 mmol/l KCl wird der intrazelluläre Kalziumspiegel stärker erhöht als bei Druckerhöhung unter nicht-depolarisierten Bedingungen (Lagaud, Gaudreault et al. 2002). Die hohe extrazelluläre KCl-Lösung steigert nicht nur den intrazellulären Kalziumspiegel, sondern auch den Basaltonus. Von der Gruppe Ratz et al. wurde festgestellt, dass hohe extrazelluläre KCl-Lösungen auch die Kalziumsensitivität von glatten Muskelzellen erhöht (Ratz, Berg et al. 2005). Aus diesen Beobachtungen ergibt sich, dass unter erhöhtem extrazellulärem Kaliumspiegel die myogene Reaktion intensiver abläuft, als unter kaliumarmen Bedingungen. Des Weiteren wurde expe-

rimentell nachgewiesen, dass die Kalziumsensitivität bei einem Druck von 80mmHg deutlich höher liegt, als bei 10mmHg (Schubert, Kalentchuk et al. 2002). Diese Beobachtung bestätigt die Vermutung, dass die Kalziumsensitivität von besonderer Bedeutung für die Regulation der myogenen Reaktion ist.

Anfänglich wurden das kalziumabhängige Modell und der Mechanismus der Kalziumsensitivitätsänderung zur Erklärung der myogenen Reaktion einfach zusammengefügt. Dadurch erhielt man ein Zweiphasenmodell mit einer ersten kalziumabhängigen Triggerphase, der eine kalziumunabhängige Erhaltungsphase folgte. Für diese Erhaltungsphase musste nun eine Erklärung gefunden werden, die klarstellt, weswegen es trotz abnehmenden Kalziumspiegels zur weiteren Kontraktion kommt. Dieses Zweiphasenmodell ist stark vereinfacht, da es den Eindruck erweckt, dass beide Phasen isoliert nebeneinander ablaufen, was sicher nicht der Realität im Ablauf der myogenen Reaktion entspricht. Es basiert auf der Hypothese, dass die Kalziumerhöhung nach Druckanstieg rein mechanisch und demzufolge schneller ist, als die Signalkaskade, die letztendlich die Kalziumsensitivität beeinflusst (Schubert, Kalentchuk et al. 2002). Dagegen sprechen jedoch Befunde zur Sphingosinkinase, die an der Regulation der myogenen Antwort beteiligt ist. In isolierten Arterien des Hamsters steigert die Sphingosinkinase die Kalziumsensitivität über einen RhoA- bzw. Rhokinase-abhängigen Mechanismus (siehe unten). Die Kontraktion der Arterie erfolgt dabei umgehend, ohne Verzögerung (Bolz, Vogel et al. 2003).

Beide Mechanismen, das heißt der kalziumabhängige und die Regulation der Kalziumsensitivität laufen also offensichtlich parallel ab. Nach Fixierung des intrazellulären Ca^{2+} erfolgt nach Druckanstieg sofort eine myogene Reaktion. Da die Kalziumkonzentration unter dieser Bedingung nicht zunehmen kann, muss eine plötzliche Steigerung der Kalziumsensitivität erfolgt sein (Lagaud, Gaudreault et al. 2002). Ebenso folgt aus dieser Beobachtung, dass eine schnelle Erhöhung von Ca^{2+} wohl nicht Auslöser der Sensitivierung sein kann.

Für die glatte Muskelzelle ist es von Vorteil, dass beide Mechanismen nebeneinander existieren. So ist es den Blutgefäßen möglich, ständig auf Druckschwankungen zu reagieren und dabei trotzdem den intrazellulären Kalziumspiegel niedrig zu halten. Auf diese Weise kann es nicht zu Interferenzen mit anderen kalziumabhängigen Mechanismen der Zelle kommen (Schubert, Lidington et al. 2008).

Neben den bisher erwähnten Mechanismen werden eine Reihe weiterer Faktoren diskutiert. Chloridkanäle könnten eine Rolle in der Regulation der myogenen Antwort spielen. Zumindest in einigen Gefäßpräparationen folgten auf Veränderung des transmuralen Drucks zunehmende Chloridströme (Doughty and Langton 2001). Ungünstigerweise lassen sich diese Vor-

gänge schwer nachweisen und begründen, da es bisher nur unspezifische Blocker von Chloridkanälen gibt.

Letztendlich wirken auch spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (Kv) über negative Rückkopplungsmechanismen auf die myogene Reaktion ein. Der durch diese Kanäle fließende Kaliumausstrom erzeugt eine Hyperpolarisation, welche die Druck-induzierte Depolarisation und somit das Ausmaß der Gefäßkontraktion limitieren (Knot and Nelson 1995; Plane, Johnson et al. 2005; Chen, Luykenaar et al. 2006).

1.3.1 Intrazelluläre Signaltransduktionswege

An den oben genannten Vorgängen sind eine Reihe von Signalkaskaden beteiligt, deren genaue Bedeutung aber noch Gegenstand von Untersuchungen ist. So wurde beschrieben, dass es durch Erhöhung des transmuralen Drucks in der Nierenarterie des Hundes zu einem intrazellulären Anstieg von Inositoltrisphosphat (IP₃) und von Diacylglycerin (DAG) (Narayanan, Imig et al. 1994) kommt. Durch IP₃ wird Kalzium aus intrazellulären Speichern freigesetzt. DAG aktiviert die Proteinkinase C. Die Rolle der Proteinkinase C in Bezug auf ihre Mitwirkung bei der myogenen Reaktion wird kontrovers diskutiert. Nach spezifischer Blockade der PKC wurde von einigen Autoren eine verringerte myogene Kontraktion ohne Beeinflussung der druckinduzierten Ca²⁺-Erhöhung beschrieben (Watanabe, Keitoku et al. 1993; Karibe, Watanabe et al. 1997; Miller, Dellsperger et al. 1997; Wesselman, Spaan et al. 2001; Lagaud, Gaudreault et al. 2002).

Die Erforschung der konkreten Beteiligung der PKC wird jedoch von mehreren Faktoren limitiert: es gibt verschiedene Isoformen der Proteinkinase C, keine spezifischen Inhibitoren für diese Isoformen und keine gleichmäßige Verteilung und Expression dieser in verschiedenen Gefäßbetten (Karibe, Watanabe et al. 1997; Wesselman, Spaan et al. 2001; Lagaud, Gaudreault et al. 2002). Die PKC bewirkt durch Interaktion mit spannungsgesteuerten Ca²⁺- (Korzick, Laughlin et al. 2004) und nichtselektiven Kationenkanälen (Earley, Straub et al. 2007) druckabhängig einen intrazellulären Kalziumanstieg. In anderen Gefäßen jedoch beeinflusst die PKC die myogene Reaktion nicht (Schubert, Kalentchuk et al. 2002; Su, Reber et al. 2003). Damit wird die Variabilität der Rolle der Proteinkinase C in verschiedenen Arterien in Bezug auf die myogene Reaktion klar. Wahrscheinlich ist jedoch, dass diese Kinase ebenfalls eine Rolle in der Regulation der Kalziumsensitivität spielt (Schubert, Lidington et al. 2008).

Ein weiteres Signalmolekül, das über die Modulation der Kalziumsensitivität die myogene Reaktion beeinflusst, ist die Rho-Kinase (Pfitzer 2001; Somlyo and Somlyo 2003). Diese Kinase reguliert die Aktivität der Myosinleichtkettenphosphatase und damit die Ca²⁺-Sensitivität

der glatten Gefäßmuskelzellen. Blockade der Rho-Kinase durch spezifische Inhibitoren, wie zum Beispiel Y27632, hebt die myogene Reaktion in Mesenterialgefäßen der Ratte (VanBavel, van der Meulen et al. 2001) und in der *A. gracilis* des Hamsters (Bolz, Vogel et al. 2003) ohne Einfluss auf den druckinduzierten Ca^{2+} -Anstieg auf. In Schwanzgefäßen (Schubert, Kalentchuk et al. 2002) und in der kleinen Cerebralarterie (Gokina, Park et al. 2005) der Ratte dämpft Y27632 die myogene Vasokonstriktion kongruent mit einem leichten Kalziumanstieg. Die Aktivierung der Rhokinase ist meist eng assoziiert mit der Aktivierung von RhoA, allerdings beziehen sich Schlussfolgerungen, die aus Experimenten mit Y27632 gezogen werden, nur auf die Rhokinase. Beide Proteine, die Rhokinase und RhoA, spielen in Bezug auf die myogene Reaktion eine wichtige Rolle, da sie die myogene Vasokonstriktion vermitteln, ohne dabei den Anstieg der Kalziumkonzentration zu beeinflussen (Bolz, Vogel et al. 2003). Um diesen Vorgang näher zu erklären, wurde der Y27632-sensitive, das heißt der Rho-kinase-abhängige, Anteil der myogenen Reaktion bei niedrigem und hohem transmuralen Druck verglichen. Tatsächlich hatte Y27632 bei 80mmHg einen stärkeren Effekt als bei 10mmHg, was den indirekten Beweis für eine druckabhängige Aktivierung der Rho-Kinase in kleinen Arterien erbrachte (Schubert, Kalentchuk et al. 2002).

Einen neuen Ansatz in Bezug auf die Modulation der myogenen Reaktion bilden reaktive Sauerstoffspezies. Bei Tieren ohne funktionierendes NADPH-Redoxsystem gibt es keine myogene Aktivität (Nowicki, Flavahan et al. 2001). Vervollständigt wird dieser Ansatz dadurch, dass Mäuse, denen die Superoxiddismutase fehlt, eine verstärkte myogene Aktivität besitzen. Die Superoxiddismutase ist ein endogenes Antioxidant, welches Superoxid zu Wasserstoffperoxid metabolisiert (Veerareddy, Cooke et al. 2004). Spezifische Inhibitoren der NADPH-Oxidase reduzieren die myogene Antwort, haben aber keinen Einfluss auf den druckinduzierten Ca^{2+} -Anstieg (Keller, Lidington et al. 2006).

1.4 Kaliumkanäle

Vier verschiedene Typen von Kaliumkanälen wurden bisher in glatten Gefäßmuskelzellen identifiziert: spannungsabhängige (Kv-Kanäle), kalziumabhängige, ATP-sensitive und einwärtsgerichtete Kaliumkanäle. Die Expression der verschiedenen Kanäle hängt von der Art des Gefäßbettes ab.

Der spannungsgesteuerte (Kv)-Kanal und der kalziumgesteuerte Kaliumkanal (K_{ca}) kommen wahrscheinlich in allen Gefäßgebieten vor und beeinflussen den Tonus und die myogene Reaktion. Bei Aktivierung führen sie zur Dilatation (Cox 2005).

1.5 Der spannungsgesteuerte Kaliumkanal

Die Öffnung von Kv-Kanälen lässt K^+ verstärkt aus der Zelle austreten, wodurch es zur Hyperpolarisation, zum Schließen von spannungsabhängigen Kalziumkanälen und damit zu geringerem Kalziumeinfluss in die Zelle und zur Dilatation kommt. Kv-Kanal-Blocker verhindern den Ausstrom von Kalium und erzeugen damit eine Depolarisation bzw. Kontraktion. Dadurch steigern sie den myogenen Tonus.

Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle sind aus vier α -Untereinheiten, die aus sechs die Membran durchspannenden (S1-S6) Domänen bestehen, und akzessorischen β -Untereinheiten aufgebaut. Die Carboxy- und die Aminogruppe der alpha-Untereinheiten sind intrazellulär gelegen. Die Pore des Kanals wird von S5, S6 und der Schleifendomäne H gebildet, die Domäne S4 ist der Spannungssensor.

Die Zusammensetzung der Kv-Kanäle aus α - und β -Untereinheiten ist sehr unterschiedlich. Die Untereinheiten selber werden durch eine Vielzahl von Genen codiert.

Im glatten Gefäßmuskel sind bisher 5 Familien der Kv-Kanäle gefunden worden: Kv1-4 und 7, die sich wiederum in viele verschiedene Unterfamilien gliedern lassen. Der Hauptanteil der Kv-Kanäle in der Arterienwand besteht aus Vertretern der Kv1- und der Kv2-Familie, dabei spricht jede Untereinheit unterschiedlich auf Kaliumkanal blockierende Substanzen an (Cox 2005).

1.5.1 Blocker spannungsgesteuerter Kaliumkanäle

In Bezug auf die Wirkung der klassischen Kaliumkanalblocker werden die Kv-Kanäle in drei Gruppen eingeteilt: 1. schnellinaktivierende, 4-Aminopyridine-sensitive, 2. langsam inaktivierende, Tetraethylammonium-insensitive und 3. nichtinaktivierende, Tetraethylammonium-sensitive-Kanäle. Der Kv1.1-Kanal und alle Mitglieder der Kv3-Familie weisen eine hohe Sensitivität gegenüber Tetraethylammonium (TEA) auf, während die Kv4-Gruppe und andere Mitglieder der Kv1-Kanäle nahezu nicht auf diese Substanz ansprechen (Cox 2005). Allerdings hemmt TEA auch andere Kaliumkanäle, insbesondere BK_{Ca} Kanäle (Nelson and Quayle 1995).

1.5.1.1 4-Aminopyridin (4-AP)

Ein viel verwendeter Kaliumkanalblocker ist 4-Aminopyridin (4-AP), das eine Blockierung der Poren der Kaliumkanäle bewirkt. Es verhindert das Öffnen des Kanals und löst so eine Depolarisation und einen Ca^{2+} -Einstrom aus. Die intravenöse Injektion von 4-AP bewirkt bei anästhesierten Ratten eine Blutdruckerhöhung und einen höheren peripheren Widerstand auf-

grund einer Konstriktion der Arterien. 4-AP blockiert alle Familien der Kv1-4-Kanäle, allerdings in unterschiedlich hohen Konzentrationen. Um die verschiedenen Gruppen zu unterscheiden, ist es jedoch notwendig, spezifischere Kaliumkanalblocker zu benutzen. Eine Schwierigkeit besteht darin, dass sich viele Substanzen in ihrem Ansprechen auf einzelne Kanalfamilien überschneiden (Cox 2005). Es ist damit von klinischer Relevanz für die Therapie von Gefäßerkrankungen wie Bluthochdruck, Arteriosklerose und Diabetes mellitus, mehr über den molekularen Aufbau und die funktionelle Rolle der verschiedenen Kv-Kanaltypen zu erfahren.

1.5.1.2 BDS I („blood pressure depressing substance“)

BDS-I ist eine Substanz, die von einigen Autoren (Diochot, Schweitz et al. 1998; Cox 2005; Miguel-Velado, Moreno-Dominguez et al. 2005; Yeung, Thompson et al. 2005) als spezifischer Blocker des Kv3.4-Kanals beschrieben wurde. Die Arbeit von Yeung et al. widerlegte 2005 diese Annahme, indem sie eine Wirkung dieser Substanz auch auf Kv3.1- und Kv3.2-Kanäle nachwies (Yeung, Thompson et al. 2005).

BDS-I ist ein Toxin, das aus der Seeanemone „*Anemonia sulcata*“ entnommen wird. Es besteht aus 43 Aminosäuren, die durch 3 Disulfidbrücken verbunden sind. Das Molekulargewicht beträgt 4715kD.



Abb. 1.1: *Anemonia sulcata* im Roten Meer

BDS-I hat nur einen geringen Effekt an TTX-sensitiven Natriumkanälen und keinen Effekt an Kalziumkanälen. Den Kv3.1-, Kv3.2- und Kv3.4-Kanal blockiert die Substanz schnell, direkt und reversibel (Diochot, Schweitz et al. 1998). BDS-I ist ein „gating modifier“, der über die Beeinflussung der spannungssensitiven Kanaldomänen die Öffnungswahrscheinlichkeit der

Kanäle verringert und ihre Aktivierung verlangsamt. Selbst bei maximaler Blockade durch das Toxin verbleibt noch ein Reststrom von Kaliumionen, wodurch bestätigt wird, dass es sich nicht um einen Poren-Blocker, sondern um einen Modulator des Schaltverhaltens der Kanäle handelt. Durch Applikation von 500nM BDS-I werden annähernd 50% der durch Kv3.4-Kanäle fließenden Ströme blockiert (IC_{50} für Kv3.1 = 220nM BDS-I). Eine ähnliche Wirkung wird für den Kv3.2-Kanal beobachtet. Bei +40mV blockieren 500nM BDS-I 45% von Kv3.1 und 48% von Kv 3.2. Die Wirkung der Substanz kann durch Auswaschen komplett aufgehoben werden, allerdings erwiesen sich Konzentrationen von über 3 μ M als zytotoxisch. BDS-I wirkt nur, wenn es von extrazellulär appliziert wird (Yeung, Thompson et al. 2005).

1.6 Aufgabenstellung

Vor längerer Zeit schon wurde eine blutdrucksenkende Wirkung von BDS-I beschrieben (Bress, Doppelfeld et al. 1985). Eine solche Reaktion resultiert oft aus dem Absinken des peripheren Widerstandes durch Dilatation von Arterien. Eine mögliche Erklärung für die blutdrucksenkende Wirkung von BDS-I wäre damit ein vasodilatierender Effekt der Substanz. Ein solcher Effekt erscheint zunächst unlogisch, da aus der Blockade von Kaliumkanälen eher eine Vasokonstriktion resultieren müsste. Tatsächlich stellen die Kv3-Kanäle jedoch eher eine Minderheit unter den Kaliumkanälen dar, die in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert sind (Tamaro, Smith et al. 2004; Cox 2005). Der Effekt von BDS-I auf andere Kv-Kanal Untereinheiten wurden bisher jedoch kaum studiert. Die Wirkung von BDS-I auf intakte Gefäße ist bisher gänzlich unerforscht.

Neuere Untersuchungen an isolierten glatten Gefäßmuskelzellen haben gezeigt, dass BDS-I Kv-Ströme stimuliert (Gagov & Schubert, unveröffentlichte Befunde). BDS-I reduziert zwar den Spitzenstrom der Kv-Ströme, allerdings verschiebt BDS-I die Potentialabhängigkeit der Inaktivierung des Kv-Stroms deutlich zu positiveren Membranpotentialen. In der Summe ergeben die beiden genannten Effekte bei physiologischen Membranpotentialen eine Stimulation des Kv-Stroms. Welche Rolle dieser Mechanismus bei der Regulation der Kontraktilität kleiner Arterien spielt, ist jedoch unbekannt. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Hypothese untersucht, dass BDS-I durch Stimulation von Kv-Strömen kleine Arterien relaxiert und damit die myogene Reaktion beeinflusst.

Dabei wurden folgende Teilhypothesen betrachtet:

- Untersuchung des Kontraktionsverhaltens kleiner Arterien in Abhängigkeit von äußeren Bedingungen wie dem Applikationsverfahren für die zu testenden Substanzen oder die Art der Einstellung eines konstanten pH-Wertes.

- Untersuchung der Wirkung von BDS-I und 4-AP auf den Durchmesser kleiner Arterien und auf die myogene Reaktion.
- Untersuchung der Wirkungsweise von BDS-I.

2 Material und Methoden

2.1 Tiermodell

In der vorliegenden Dissertation wurden normotensive, männliche Wistar-Kyoto-Ratten verwendet, die zwischen 16 und 25 Wochen alt waren und deren Gewicht 350g bis 400g betrug. Jedem Tier standen immer Wasser und Futter in ausreichender Menge in einem 30cm x 50cm großen Käfig zur Verfügung, wobei nie mehr als zwei Ratten gemeinsam gehalten wurden.

Nach Betäubung und anschließender Durchtrennung der Halswirbelsäule erfolgte der sofortige Todeseintritt; anschließend wurde die Organentnahme vorgenommen.

2.2 Untersuchungsobjekt

In dieser Arbeit wurden die Arteria cerebri posterior und die kleine Arteria caudalis (Anschutz and Schubert 2005) der Ratte verwendet. Die Arteria cerebri posterior ist ein nach cranial oberhalb der Pons abgehender Zweig der Arteria basilaris und hat vollrelaxiert einen Durchmesser von etwa 300µm. Die zwei kleinen Schwanzarterien liegen unterhalb der großen A. caudalis mit Durchmessern im vollrelaxierten Zustand zwischen 250 bis 320µm; beide verlaufen parallel im ventralen Gefäßkanal des Rattenschwanzes.

2.3 Gefäßpräparation

Nach Todeseintritt und Ablösen des Fells vom Schädel erfolgten das vorsichtige Öffnen der Schädeldecke und die Entnahme des Gehirns sowie das Entfernen der Meningen unter einem Stereomikroskop. Zur Präparation der Cerebralarterie wurde das Gehirn in ein Gefäß mit gekühlter physiologischer Lösung (145mM NaCl; 4,5mM KCl; 1,2mM NaH₂PO₄; 1,0mM MgSO₄; 0,1mM CaCl₂; 0,025mM (Na)EDTA und 5mM HEPES) bei 4°C und einem pH-Wert von 7,3 gelegt. Zur Präparation wurden zwei Pinzetten (Dumont Nr.5) und eine Irisschere benutzt.

Zur Entfernung der Meningea wurde diese oberhalb der A. cerebri posterior leicht angehoben und dann, ohne das Gefäß zu berühren, durchtrennt. Anschließend musste die Arterie entlang ihres Verlaufs sorgfältig nach Abzweigungen durchmustert werden. Für die Versuche konnte nur ein vollständig intaktes Gefäßstück ohne Abgänge Verwendung finden, welches erlaubt, die Experimente ohne luminalen Fluss durchzuführen. Über dünnes Bindegewebe ist die Cerebralarterie an der Oberfläche des Gehirns befestigt, welches möglichst ohne Berührung des Gefäßes, um seine kontraktile Eigenschaften nicht zu beeinflussen, entfernt werden musste. Außerdem hätte zusätzliches Gewebe beim späteren Ausmessen des Durchmessers die Messwerte verfälschen können.

Zur Präparation der *A. caudalis* wurde der proximale Teil des Rattenschwanzes, nach dem Entfernen des Fells, in einer gekühlten Kammer fixiert. Zunächst ist nach einem Längsschnitt das subkutane Bindegewebe mit der darunter laufenden großen Schwanzarterie entfernt worden. Es wurden zwei große Venen und zwei kleine, parallel verlaufende Arterien sowie eine zentral liegende kleine Vene sichtbar. Die Venen wurden zur besseren Sicht entfernt. Anschließend erfolgte nach Freipräparation die Entnahme einer der kleinen Arterien. Dabei musste, wie bei den anderen Gefäßen, auf seitliche Abgänge geachtet werden. Nach der vollständigen Freipräparation wurden die Arterien distal und proximal mit der Schere abgesetzt und dann mit Hilfe einer Pinzette in die mit Versuchslösung (120mM NaCl; 4,5mM KCl; 1,2mM NaH₂PO₄; 1,0mM MgSO₄; 1,6mM CaCl₂; 0,025mM (Na)EDTA; 5,5mM Glukose; 26mM NaHCO₃ und 5mM Hepes, pH-Wert 7,3) gefüllte Messkammer gelegt.

In einer Reihe von Versuchen wurde bicarbonatfreie Lösung verwendet. In dieser Lösung wurde Bicarbonat nicht zugesetzt und die Menge an NaCl entsprechend erhöht, um den Gesamtgehalt an Natrium konstant zu halten. Die Herstellung der Lösung mit 42mM KCl erfolgte durch isomolaren Ersatz von NaCl durch KCl.

2.4 Fixierung der Arterien in der Messkammer

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Messung der kontraktiven Eigenschaften der kleinen Arterien in Anwendung gebracht. Bei der Versuchsanordnung unter isometrischen Bedingungen wurde das Gefäß über zwei parallel verlaufende feine Drähte fixiert und die Wandspannung gemessen. Zur isobaren Bestimmung von Durchmesseränderungen wurden die Arterien auf zwei Kanülen befestigt und mittels einer Videokamera mit einem speziellen Computerprogramm der Durchmesser bestimmt.

2.4.1 Isobare Versuchsanordnung

Die Messkammer für diese Versuche enthält zwei in je einer Metallklammer fixierte Glaspipetten, deren dünn ausgezogene, nach vorn offene Spitzen einander gegenüber stehen. Für die Herstellung der Pipetten wurden mit Hilfe eines Ziehgerätes Borosilikatkapillaren von 2mm Durchmesser in der Mitte erhitzt, langgezogen und durchtrennt. Um das Blutgefäß später nicht zu verletzen, wurden die scharfen ausgezogenen Enden der Pipetten mit Hilfe eines Heizwendeldrahts abgerundet. Der Durchmesser der Pipettenspitze betrug etwa 180µm.

Die Arterien wurden nach der Überführung in die Messkammer mit Hilfe einer Kunststoffpipette vorsichtig mit Versuchslösung umspült, um Blutreste zu entfernen und um die eventuell beim Umsetzen aus der Präparier- in die Versuchslösung verklebten Gefäßenden zu lösen.

Mit den Pinzetten wurde dann das Gefäß auf die Glaspipetten aufgezogen und mit chirurgischem Nahtmaterial (Prolene; Ethicon 10-0) fixiert.

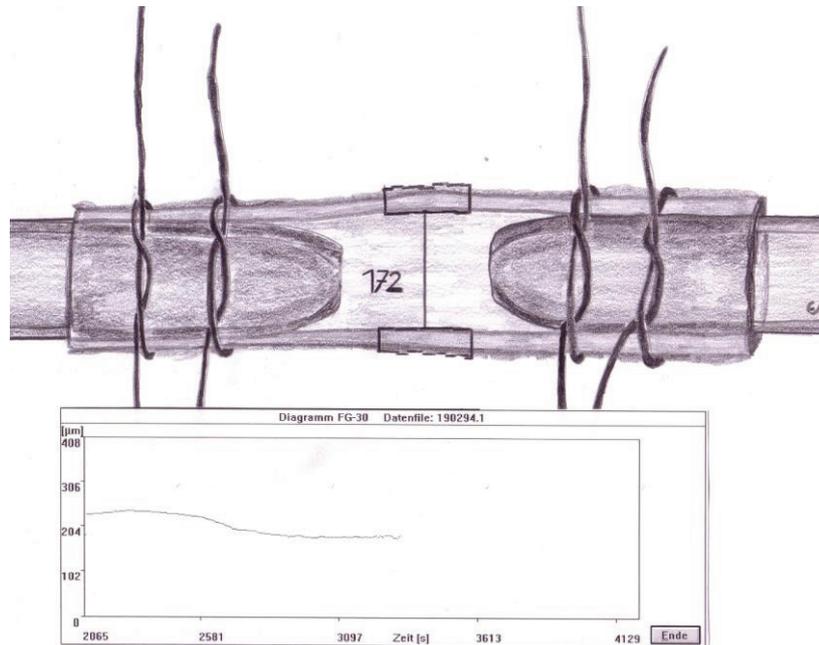


Abb. 2.1: kantiliertes Gefäßsegment und graphische Darstellung der Änderungen des Innendurchmessers auf dem Monitor

Anschließend wurde die Messkammer auf einen Mikroskoptisch gesetzt, der an eine Kamera angeschlossen war, so dass das Blutgefäß auf einem Monitor sichtbar wurde. Da sich die Arterienwände kontrastreicher als das Lumen und die Umgebung darstellen, konnte ein spezielles Messprogramm den Durchmesser bestimmen. Für die vorgelegte Arbeit war der innere Durchmesser entscheidend, der mit einer Frequenz von 0,5 Hz gemessen wurde.

2.4.2 Isometrische Versuchsanordnung

Die Messkammer für diese Versuche enthält zwei parallel verlaufende Drähte. Die Drähte wurden längs durch das Lumen der Arterie gefädelt. Um dabei die empfindliche Wand nicht zu beschädigen, wurde das Gefäß mit einer Pipette mit Versuchslösung durchspült und somit erweitert. Danach mussten die Drähte mit dem Gefäß in der mit physiologischer Lösung gefüllten Kammer fixiert werden. Über einen Draht wurde das Gefäß mit einem Kraftaufnehmer verbunden, der die Wandspannung misst und über den anderen konnte mit Hilfe einer Mikrometerschraube der Abstand der beiden Drähte reguliert werden.

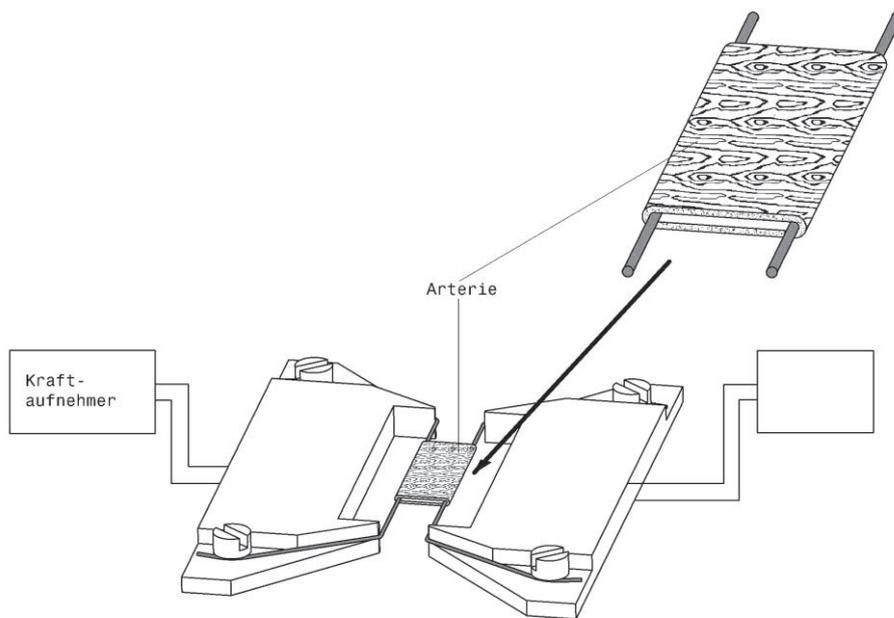


Abb.2.2: auf zwei Drähten aufgespanntes Gefäßsegment

2.5 Versuchsablauf

2.5.1 Isobare Versuchsanordnung

Die Arterie ist so eingespannt worden, dass ein Ende auf eine mit einem Gummistopfen abgedichtete Pipette aufgezogen war, der einen Durchfluss der im Lumen befindlichen Lösung verhinderte. Das zweite Ende des Gefäßes wurde über die Pipette mit einem Schlauchsystem verbunden, das komplett mit der Versuchslösung gefüllt war. Da das Flüssigkeitsreservoir, an welches das Schlauchsystem angeschlossen war, an einer höhenregulierbaren Vorrichtung angebracht wurde, konnte durch Verstellen der Höhe der Druck im Gefäß variiert werden.

Die Versuchslösung, die das Blutgefäß in der Messkammer umspülte, konnte über ein Pumpensystem kontinuierlich ausgetauscht und somit Substanzen zugefügt bzw. ausgewaschen werden. Die Pumpgeschwindigkeit betrug dabei 1,5ml/min bei einem Volumen der Kammer von 1,5 ml. Bei den Versuchen sollte das Gefäß nur von außen mit Flüssigkeit umspült werden, im Inneren des Gefäßes aber kein Durchfluss stattfinden. Um den letzten Umstand zu prüfen, wurde peripher im Schlauchsystem eine Glaskapillare eingefügt, die eine Luftblase enthielt.

Anhand der Bewegung dieser Blase konnte die Dichtigkeit der Arterie geprüft werden. Bei Wanderung der Luft erfolgte der Versuchsabbruch.

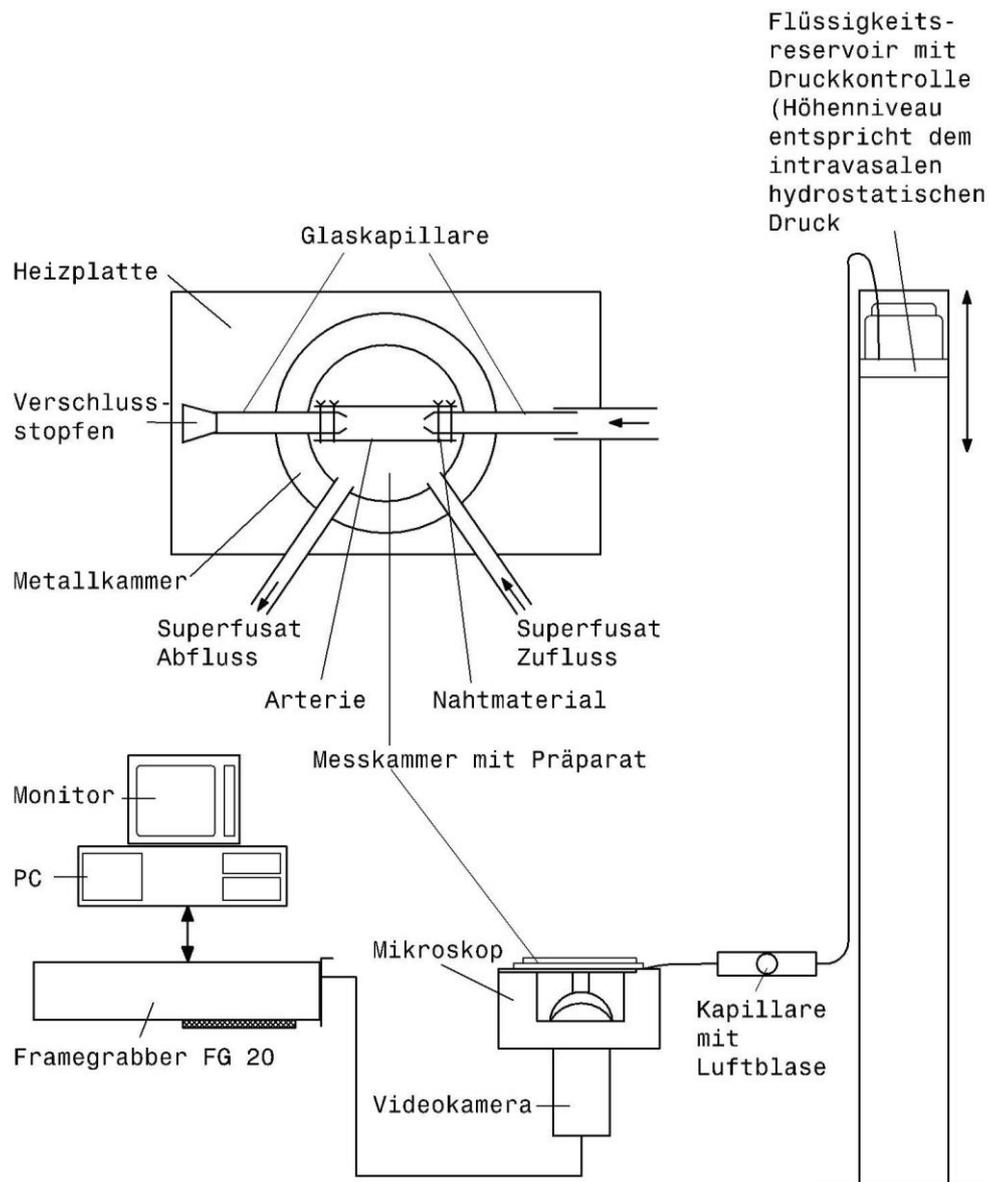


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der isobaren Versuchsanordnung

Zu Beginn des Versuchs wurde das Blutgefäß einem Druck von 80mmHg ausgesetzt. Unter dieser Belastung füllte sich die kleine Arterie und ihre Ausdehnung nahm longitudinal und radial zu. Um aussagekräftige Messwerte zu erzielen, musste das Gefäß über eine Mikrometerschraube longitudinal gespannt werden, so dass eine Schlingelung ausgeschlossen wurde. Die dabei eingestellte Länge entsprach in etwa der vor der Entnahme aus dem Versuchstier. Um mit dem konkreten Versuch beginnen zu können, musste die Arterie zunächst für mindestens 45 Minuten in der Kammer bei 37°C verbleiben. Die Erwärmung erfolgte einerseits über eine auf 37°C erhitzte Metallplatte, in die die Messkammer mit der physiologischen Lösung und der darin enthaltenen Arterie eingelassen war und andererseits über ein Schlauchsystem,

welches an der Oberfläche der Platte befestigt wurde und somit die Perfusionsflüssigkeit beim Durchfluss erwärmte. Während der Aufwärmung dilatierte das Gefäß zunächst; nach etwa 30 Minuten kontrahierte es. Dieser Vorgang zeigte die Entwicklung eines spontanen myogenen Tonus an. Voraussetzung für die Fortführung des Versuchs war hierbei eine Kontraktion um 15% des bei der anfänglichen Dilatation gemessenen Maximaldurchmessers.

Anschließend wurde zunächst die Kontraktilität der Arterienmuskulatur über eine Zugabe von $10^{-7} - 10^{-6}$ M Serotonin bzw. Noradrenalin festgestellt. Nach etwa 30minütigem Auswaschen wurde die Endothelfunktion mit 10^{-6} M Acetylcholin getestet, wobei bei Intaktheit des Endothels eine vollständige Dilatation erfolgen musste. Anschließend begann wieder ein Waschvorgang, um in der Folge die myogene Antwort über ein Drucksprungschema zu testen. Dabei wurde zunächst der Druck auf 10mmHg für 10 Minuten reduziert, dann folgte die schrittweise Erhöhung auf 40mmHg, 80mmHg und 120mmHg für je 5 Minuten. Bei intakter Autoregulation, das heißt bei zunehmender Kontraktion der Arterie mit steigendem Druck, konnte der weitere Versuchsablauf folgen.

Die verwendeten Gefäße besaßen unterschiedliche Durchmesser. Zum besseren Vergleich der Gefäßreaktionen wurde deshalb der normalisierte Durchmesser verwendet, das heißt alle Durchmesserwerte wurden im Verhältnis zum maximal dilatierten Durchmesser des Gefäßes bei 80mmHg dargestellt:

$$[\text{normalisierter Durchmesser} = \text{dia}_{\text{akt}}/\text{dia}_{\text{max80mmHg}}],$$

wobei dia_{akt} der aktuelle Durchmesser und $\text{dia}_{\text{max80mmHg}}$ der maximal dilatierten Durchmesser des Gefäßes bei 80mmHg liegt.

Um kontraktile Reaktionen bei unterschiedlichen Drücken vergleichen zu können, wurde der myogene Tonus verwendet. Dieser stellt den Gefäßdurchmesser zu einem bestimmten Zeitpunkt (dia_{akt}) bezogen auf den maximalen Durchmesser (dia_{max}) bei vollständiger Dilatation in kalziumfreier Versuchslösung bei gleichem Druck dar. Mathematisch ergibt sich folgende Formel:

$$[\text{Myogener Tonus} = 1 - \text{dia}_{\text{akt}}/\text{dia}_{\text{max}}]$$

Um die Stärke der myogenen Antwort zu ermitteln, bzw. vergleichen zu können, wurde der myogene Index benutzt. Dieser beschreibt die Steilheit des Zusammenhangs zwischen Druck und Durchmesser; hier bei der Änderung des Durchmessers von 40 auf 80mmHg und von 80 auf 120mmHg. Ist der myogene Index positiv, dehnten sich die Arterien bei Druckanstieg auf. Ist der Index negativ, erfolgte bei Druckanstieg eine aktive Kontraktion. Mathematisch ergeben sich folgende Formeln:

$$[\text{Myogener Index}_{40 \rightarrow 80} = (\text{dia}_{80} / \text{dia}_{40} - 1) / \Delta P_{40 \rightarrow 80}]$$

$$[\text{Myogener Index}_{80 \rightarrow 120} = (\text{dia}_{120} / \text{dia}_{80} - 1) / \Delta P_{80 \rightarrow 120}]$$

Die Abkürzungen in den Formeln bedeuten: dia_{40} = Durchmesser bei 40mmHg, dia_{80} = Durchmesser bei 80mmHg, dia_{120} = Durchmesser bei 120mmHg, ΔP = jeweilige Druckänderung.

2.5.2 Isometrische Versuchsanordnung

Die Messkammer mit den Gefäßen wurde mit einer Steuereinheit und einem Computer verbunden, mit dem die Veränderungen der Wandspannung dargestellt wurden. Dann folgte die Erwärmung der Versuchslösung auf 37°C über einen in die Messkammer eingebauten Temperaturregelkreis.

Anschließend wurde das Gefäß leicht in radialer Richtung gespannt, um in vivo Bedingungen nachzustellen. Zum Spannen ist einer der Drähte mit einer Mikrometerschraube verbunden, mit der man den Abstand der Drähte verstellen kann. Diese Prozedur wird Normalisierung genannt und ist wichtig, da sich viele Gefäßreaktionen nach der Größe der Vorspannung richten. Bei der Normalisierung wird das Gefäß auf einen Durchmesser eingestellt, der 90% des Durchmessers bei einem Druck von 100mmHg entspricht. Außerdem kann man aufgrund dieser Prozedur später die Ergebnisse der verschiedenen Arterien besser vergleichen.

Weiterhin wurde das Gefäß auf Funktionalität getestet. Bei Applikation von 10^{-5} M Serotonin bzw. Noradrenalin kam es zur Kontraktion. Dann folgten weitere Gaben der gleichen Substanzen in Konzentrationen von 10^{-5} M und 10^{-7} M, bis reproduzierbare Kontraktionsreaktionen beobachtet wurden. Um die Arterien auf funktionierendes Endothel zu testen, wurde Acetylcholin in einer Konzentration von 10^{-5} M gegeben. Bei Intaktheit des Endothels kam es zur Dilatation. Nach erfolgreicher Testung der Funktionalität erfolgte der konkrete Versuch.

Die verwendeten Gefäße besaßen unterschiedliche Längen und damit unterschiedliche maximale Wandspannungen. Zum besseren Vergleich der Gefäßreaktionen wurde deshalb die normalisierte Wandspannung verwendet, das heißt alle Werte der aktuellen Wandspannung sind im Verhältnis zur maximalen Wandspannung des Gefäßes dargestellt worden, die am Anfang des Versuches bestimmt wurde.

$$[\text{normalisierte Wandspannung} = \text{Wandspannung}_{\text{akt}} / \text{Wandspannung}_{\text{max}}]$$

2.6 *Reaktive*

Die Versuche erfolgten unter Verwendung folgender Substanzen:

| | |
|-------------|---|
| von Sigma | -Acetylcholin |
| | -Serotonin |
| | -Noradrenalin |
| | - 4-Aminopyridin |
| von Alexis | - DEA-NO |
| von Merck: | -Salze für die physiologischen Lösungen |
| von Alomone | -BDS-I |

2.7 *Statistik*

Alle Daten sind als Mittelwert±Standardfehler (SE) angegeben. Es wurde jeweils nur eine Arterie pro Versuchstier verwendet, daher entspricht n der Anzahl der Tiere und der Gefäße. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm SPSS 15.0 für Windows. Die verwendeten Tests waren: t-Test, repeated measures ANOVA und one-way ANOVA. Die Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0,05$ wurde zur Ermittlung der Signifikanzgrenze zugrundegelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Reaktivitätsprüfung der Gefäße

Die Bestimmung der Rolle von Kaliumkanälen bei der myogenen Reaktion kleiner Arterien sollte mit Hilfe von Kaliumkanalblockern erfolgen. Da diese zum Teil extrem teuer sind, war es notwendig, die Untersuchungen in Messkammern mit besonders kleinem Volumen und ohne ständige Perfusion der Messkammer durchzuführen. Die zuletzt genannte Bedingung bedeutet, dass eine Versuchslösung mit Bicarbonat zur Konstanthaltung des pH-Wertes, wie sie in vielen Studien an kleinen Arterien benutzt wird, nicht verwendet werden konnte, da aus dem kleinen Volumen CO₂ schnell entweicht und sich damit der pH der Lösung schnell verändert. Eine Begasung der Lösung mit Carbogen, wie in solchen Fällen üblich, war auch nicht möglich, da die Gasblasen eine verlässliche optische Bestimmung des Gefäßdurchmessers unmöglich machen. Deshalb mussten hier Versuchslösungen verwendet werden, die Puffer-substanzen wie z.B. HEPES zur Konstanthaltung des pH beinhalten. In einer ersten Versuchsserie wurde deshalb getestet, inwieweit die kontraktile Eigenschaften der untersuchten Gefäße von der Verwendung von Bicarbonat- bzw. HEPES-gepufferten Lösungen abhängen. Diese Versuche wurden an isometrischen Gefäßpräparaten durchgeführt, deren Messprinzip die Verwendung beider Lösungen erlauben. Da die Reaktionen beider untersuchten Gefäße, der A. caudalis und der A. cerebri posterior sich nicht unterschieden, konnten die Daten zusammengefasst werden. Es wurden zum einen Lösung mit und ohne Bicarbonat (Abb. 3.1; Abb. 3.2; Abb. 3.3; Abb. 3.6) und zum anderen bicarbonatfreie Lösung mit und ohne Begasung durch Druckluft (Abb. 3.4, Abb. 3.5.) verglichen.

Die Fähigkeit der Gefäße zur Kontraktion wurde bei der A. cerebri posterior mit Serotonin bzw. bei der A. caudalis mit Noradrenalin getestet; diese Reaktion war unabhängig vom pH-Puffer in der verwendeten Versuchslösung (n=5; p=0,43) (Abb. 3.1).

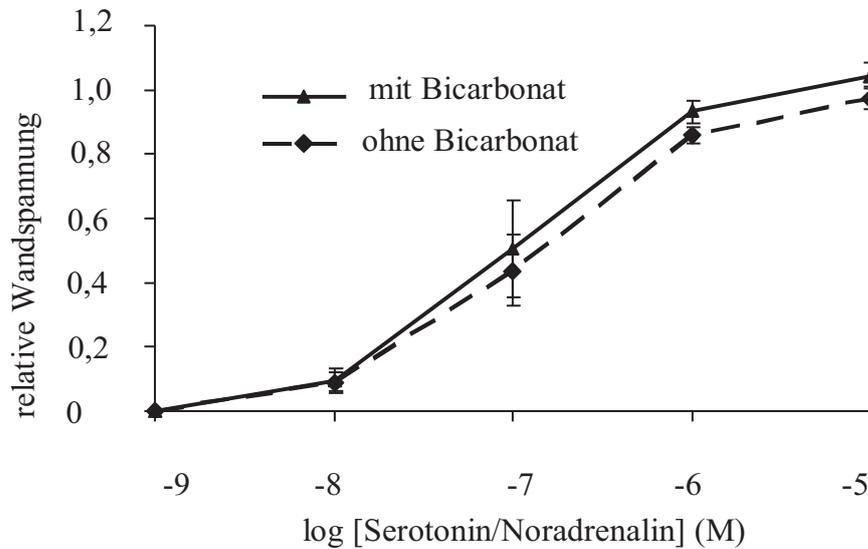


Abbildung 3.1: Relative Wandspannung (0 = Wandspannung durch Vorkontraktion) der kleinen Arterien unter Einfluss von Serotonin bzw. Noradrenalin in bicarbonathaltiger und -freier Lösung.

Die Fähigkeit der Gefäße zur endothelvermittelten Dilatation wurde mit Acetylcholin getestet. Diese Reaktion war unabhängig vom pH-Puffer in der verwendeten Versuchslösung (n=4; p=0.85) (Abb. 3.2).

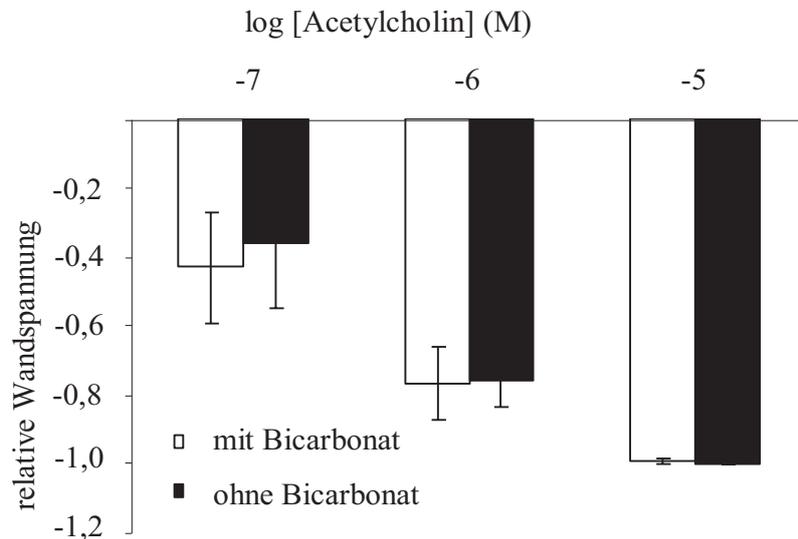


Abb. 3.2: Relative Wandspannung der kleinen Arterien unter Einfluss von Acetylcholin in bicarbonathaltiger und -freier Lösung.

Die Fähigkeit zur Dilatation der glatten Muskelzellen wurde mit dem Stickstoffmonoxid-donator DEA-NO nachgewiesen. Diese Reaktion zeigte sich unabhängig vom pH-Puffer in der verwendeten Versuchslösung ($n=5$; $p=0.43$) (Abb. 3.3).

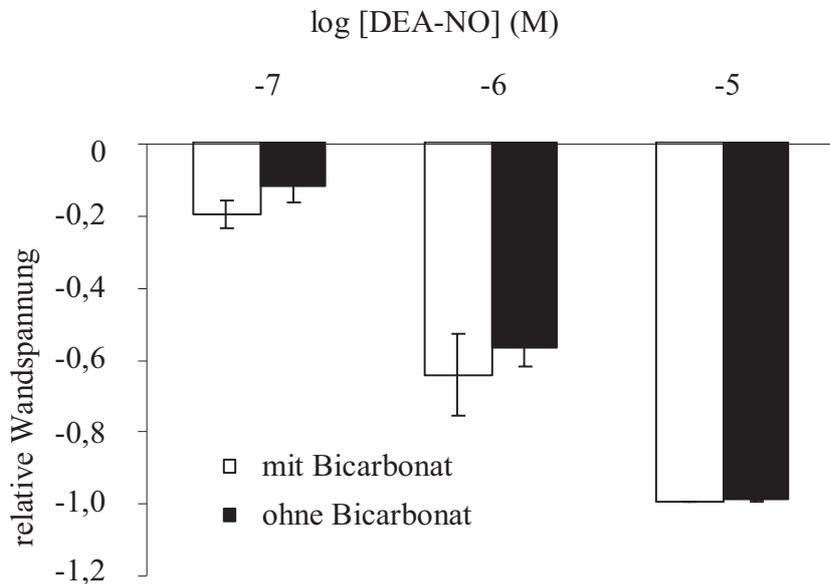


Abb. 3.3: Relative Wandspannung der kleinen Arterien unter Einfluss von DEA-NO in bicarbonathaltiger und –freier Lösung.

Um die Reaktion der kleinen Arterien auf Kaliumkanalblocker möglichst genau und reproduzierbar untersuchen zu können, mussten die Blocker homogen in der Versuchslösung verteilt werden, um punktuelle Konzentrationsunterschiede zu vermeiden. Bei Begasung der Lösungen mit Carbogen wird dies durch die Gasblasen bewirkt. Da Gasblasen jedoch eine verlässliche optische Bestimmung des Gefäßdurchmessers isobarer Gefäßpräparate unmöglich machen, musste auf Begasung verzichtet werden. Deshalb wurde in den weiteren Versuchen die Durchmischung der Versuchslösung mit den zu applizierenden Substanzen durch vorsichtiges Pipettieren mit einer Pipette vorgenommen. Um dieses Vorgehen zu validieren, wurde das Durchmischen mit einer Pipette mit dem Durchmischen mit Gasblasen verglichen. Hierbei wurde Druckluft verwendet, da in bicarbonatfreier Lösung gearbeitet wurde.

Der Test der kontraktilen Reaktion der Gefäße erfolgte mittels Serotonin oder Noradrenalin. Die Reaktion war unabhängig vom Mischverfahren ($n=5$; $p=0.56$) (Abb. 3.4).

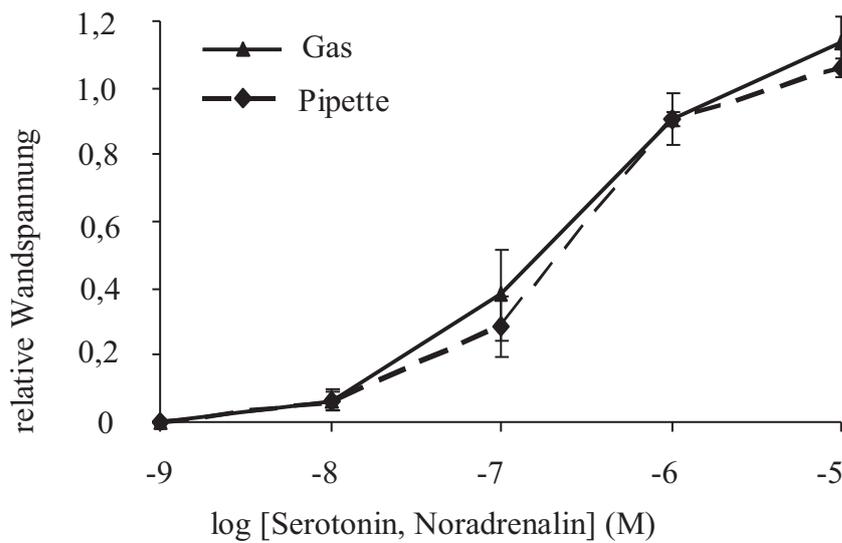


Abb. 3.4: Normalisierte Wandspannung der kleinen Arterien unter Einfluss von Serotonin bzw. Noradrenalin beim Durchmischen mittels Gasblasen oder mittels Pipette.

Für beide Methoden wurde die Reaktion der Gefäße auf Applikation des Stickstoffmonoxid-dilatators DEA-NO getestet. Die Reaktion der Arterien war unabhängig von der Wahl des Mischverfahrens ($n=5$; $p=0.71$) (Abb. 3.5).

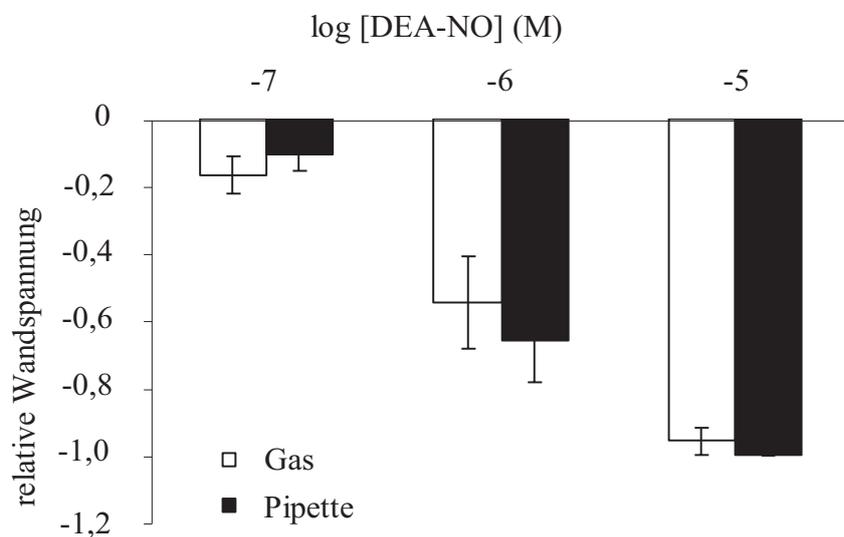


Abb. 3.5: Relative Wandspannung der kleinen Arterien unter Einfluss von DEA-NO beim Durchmischen mittels Gasblasen oder mittels Pipette.

Durch die in Abb. 3.1 – 3.5 dargestellten Ergebnisse machte deutlich, dass die kontraktile Eigenschaften der Gefäße weder von der Art des pH-Puffers noch von der Art der Durchmischung abhängig sind.

In einem weiteren Versuch wurde getestet, ob im Besonderen die zu untersuchende Gefäßreaktion, die myogene Reaktion, vom pH-Puffer abhängig ist. Dieser und alle weiteren Versuche zur Klärung der speziellen Fragestellung dieser Arbeit wurden nur noch an der A. cerebri posterior durchgeführt. Das Ausmaß der myogenen Kontraktion lässt sich aus dem Vergleich mit den Durchmesserwerten in Kalzium-freier Lösung, das heißt bei rein passiver Reaktion der Gefäße auf Druckänderungen, ablesen (siehe Abb. 3.6). Die myogene Reaktion dieser kleinen Arterie war in bicarbonathaltiger und bicarbonatfreier Lösung nicht unterschiedlich ($n=7$; $p=0.75$) (Abb. 3.6).

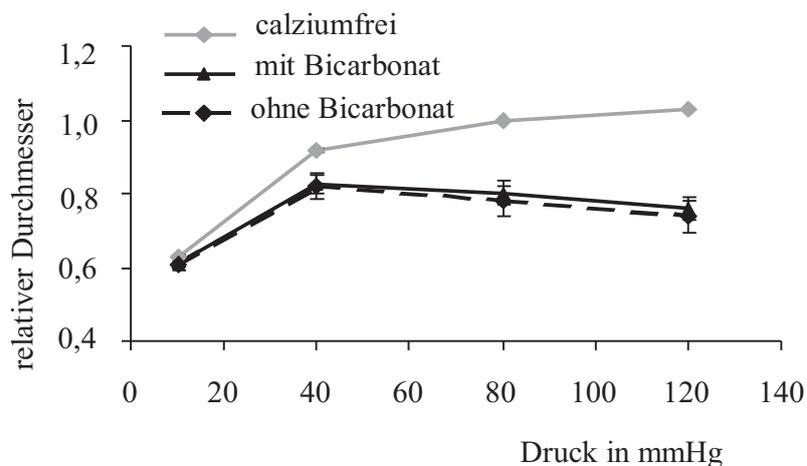


Abb. 3.6: Normalisierter Durchmesser der A.cerebri post. nach Drucksprüngen von 10mmHg, auf 40, 80 und 120 mmHg in An- und Abwesenheit von Bicarbonat-haltiger Lösung.

In der Lösung mit und ohne Bicarbonat setzte die myogene Reaktion bei Drücken ab 40mmHg ein und erreichte ihren größten Wert bei 120mmHg. Wie in den vorangegangenen Versuchsserien war auch hier kein Einfluss des pH-Puffers zu beobachten. Deshalb konnte in den nachfolgenden Versuchen bicarbonatfreie Lösung verwendet werden.

3.2 Die Wirkung von 4-Aminopyridin und BDS-I auf den myogenen Tonus

Um die Bedeutung von Kv-Kanälen für die myogenen Eigenschaften kleiner Arterien zu untersuchen, sollten zwei Blocker dieser Kanäle, 4-Aminopyridin (4-AP) und BDS-I, eingesetzt werden.

4-AP ist ein spezifischer Blocker von Kv-Kanälen, der jedoch nicht zwischen den verschiedenen Kv-Kanal-Untereinheiten unterscheiden kann. Zunächst wurde die Wirkung von 4-AP auf den spontanen myogenen Tonus der kleinen Arterien getestet. Steigende Konzentrationen von 4-AP wurden den Arterien zugefügt. Dabei trat eine zunehmende Kontraktion der Gefäße ein ($n=5$; $p<0.05$) (Abb.3.7).

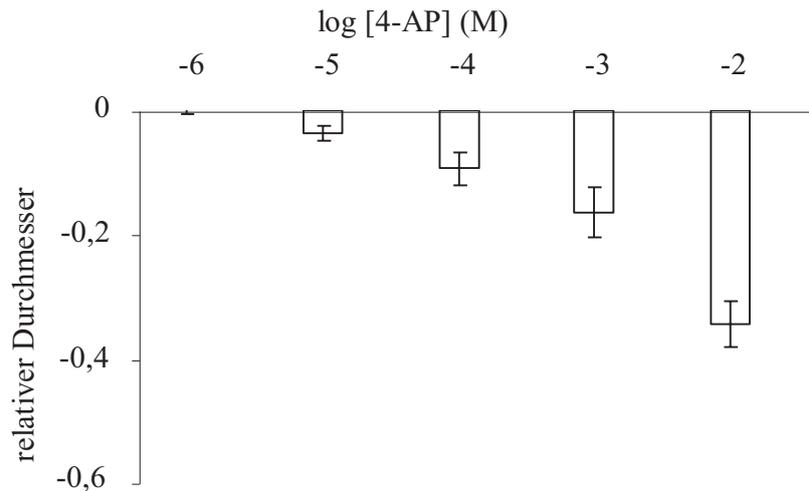


Abb. 3.7: Durchmesseränderung der A.cerebri post. unter Wirkung von 4-Aminopyridin.

BDS-I ist in der Literatur als Kv-Kanalblocker mit spezifischer Wirkung auf Kv3-Kanal-Untereinheiten beschrieben. Auch er wurde in steigender Konzentration zu den Arterien gegeben. Erwartungsgemäß hätte BDS-I als Kaliumkanalblocker eine Kontraktion wie 4-AP erzeugen müssen. Im Gegensatz dazu dilatierten die Blutgefäße nach Zugabe von BDS-I ($n=6$; $p<0.01$) (Abb.3.8).

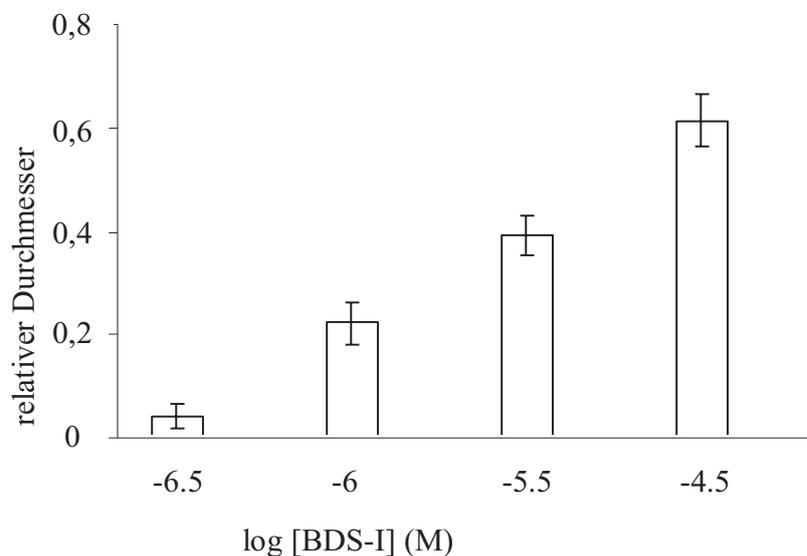


Abb. 3.8: Durchmesseränderung der A.cerebri post. unter Wirkung von BDS-I.

Aus diesen Versuchen ergibt sich die Folgerung, dass 4-AP-sensitive Kaliumkanäle den spontanen myogenen Tonus der A. cerebri posterior mitbestimmen, BDS-I jedoch nicht als Kaliumkanalblocker an dieser Arterie wirkt.

3.3 Mechanismus der Wirkungsweise von BDS-I

Um zu ergründen, ob die Wirkung von BDS-I überhaupt von Kaliumkanälen vermittelt wird, wurde der Effekt von BDS-I auf Gefäße nach Vorkontraktion mit 42mM KCl untersucht. Bei einer solch hohen KCl-Konzentration verschiebt sich das Kaliumgleichgewichtspotential so weit in positive Richtung, dass es fast mit dem aktuellen Membranpotential übereinstimmt. Damit ist die treibende Kraft für Kaliumionen nur noch minimal, so dass Aktivitätsänderungen der Kaliumkanäle keinen Einfluss mehr auf den Kontraktionszustand der Gefäße ausüben. Sollte bei Vorkontraktion mit KCl im Vergleich zu einer Vorkontraktion mit z.B. Serotonin, bei der die treibende Kraft für die Kaliumionen erhalten bleibt, eine Dilatation nach Zugabe einer bestimmten Substanz beobachtet werden, so ist das ein deutlicher Hinweis gegen die Beteiligung von Kaliumkanälen an der Wirkung dieser Substanz.

Diese Versuche wurden an isometrischen Präparaten der Gefäße durchgeführt, da der bei isobaren Präparaten entstehende spontane myogene Tonus keine reine KCl-induzierte Kontraktion zulässt. BDS-I wurde auch in diesen Versuchen in steigenden Konzentrationen appliziert. BDS-I relaxiert die Gefäße nach Vorkontraktion mit einer submaximalen Konzentration von Serotonin ($n=5$; $p<0.05$) (Abb.3.9). Die BDS-induzierte Relaxation ist jedoch abwesend nach Vorkontraktion mit einer Lösung, die 42 mM KCl enthält ($n=4$; $p=0.55$) (Abb. 3.9).

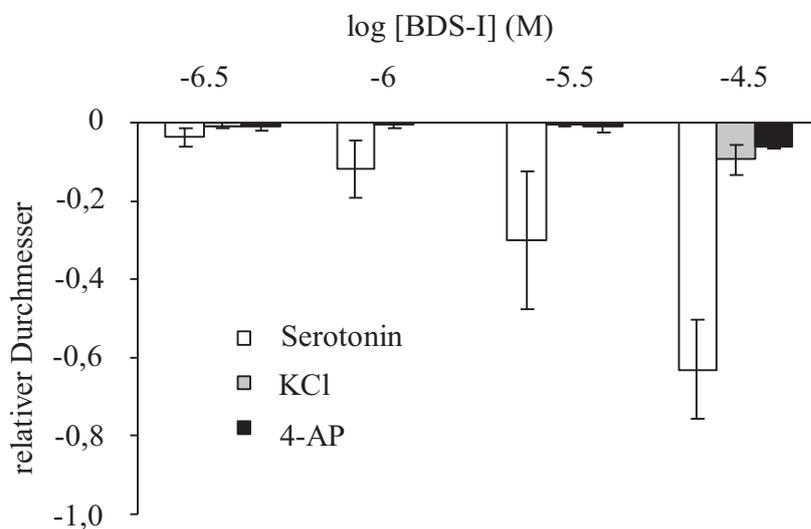


Abb.3.9: Normalisierte Wandspannung der A.cerebri post. bei Zugabe von BDS-I in Abhängigkeit von der Vorkontraktion mit Serotonin, 42mM KCl bzw. 4-Aminopyridin.

Um zu bestimmen, ob die relaxierende Wirkung von BDS-I von Kv-Kanälen vermittelt wird, wurden die Gefäße mit einer Lösung vorkontrahiert, die Serotonin zusammen mit 10 mM 4-AP enthält. Die BDS-induzierte Relaxation ist jedoch abwesend nach Vorkontraktion mit dem unspezifischem Kaliumkanalblocker 4-Aminopyridin ($n=5$; $p=0.69$) (Abb. 3.9). Die Größe

der Vorkontraktion durch Serotonin, KCl bzw. Serotonin zusammen mit 4-AP war in diesen Versuchen nicht unterschiedlich.

Diese Befunde zeigen, dass die relaxierende Wirkung von BDS-I durch eine Aktivierung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen vermittelt wird.

3.4 Die Wirkung von BDS-I auf die myogene Reaktion

Zur Bestimmung des Einflusses einer Aktivierung von Kv-Kanälen auf die myogene Reaktion wurde diese in Abwesenheit und in Anwesenheit von 0,3 – 1 μ M BDS-I untersucht. Die myogene Reaktion der Gefäße war in Anwesenheit von BDS-I deutlich schwächer als in seiner Abwesenheit (n=9; p<0.001) (Abb. 3.10).

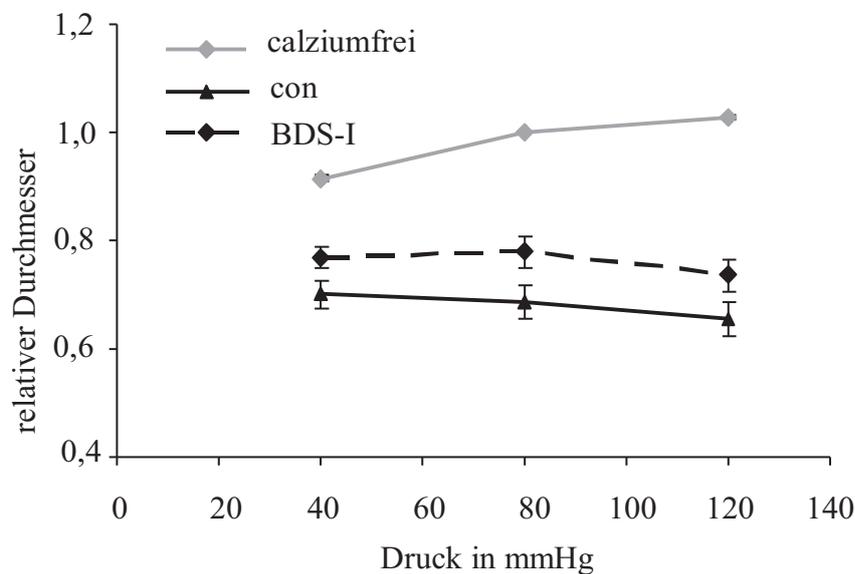


Abb.3.10: Normalisierter Durchmesser der A.cerebri post. in Abhängigkeit des transmuralen Drucks in Anwesenheit und Abwesenheit (con) von BDS-I.

Die Wirkung von BDS-I wurde besonders offensichtlich bei der Betrachtung des myogenen Tonus, der in Anwesenheit von BDS-I deutlich schwächer als in seiner Abwesenheit ausfiel (n=9; p<0.001) (Abb. 3.11).

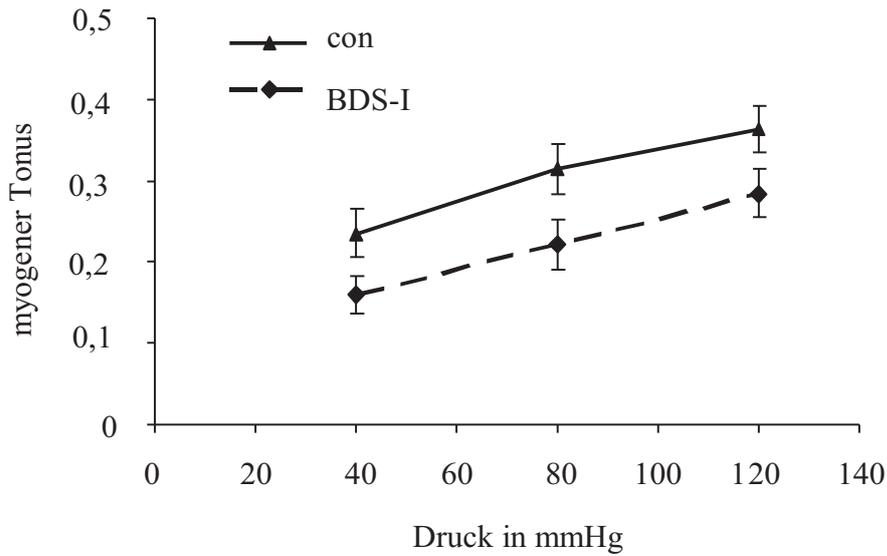


Abb. 3.11: Myogener Tonus der A. cerebri post. in Abhängigkeit des transmuralen Drucks in Anwesenheit und Abwesenheit (con) von BDS-I.

Die myogene Reaktion, das heißt das Ausmaß der kontraktiven Reaktion nach einem Druckanstieg, ausgedrückt als myogener Index, war jedoch in Anwesenheit von BDS-I nur im Druckbereich zwischen 40 und 80 mmHg verändert ($n=9$, $p<0.05$); nicht jedoch im Druckbereich zwischen 80 und 120 mmHg ($n=9$; $p=0.39$) (Abb. 3.12).

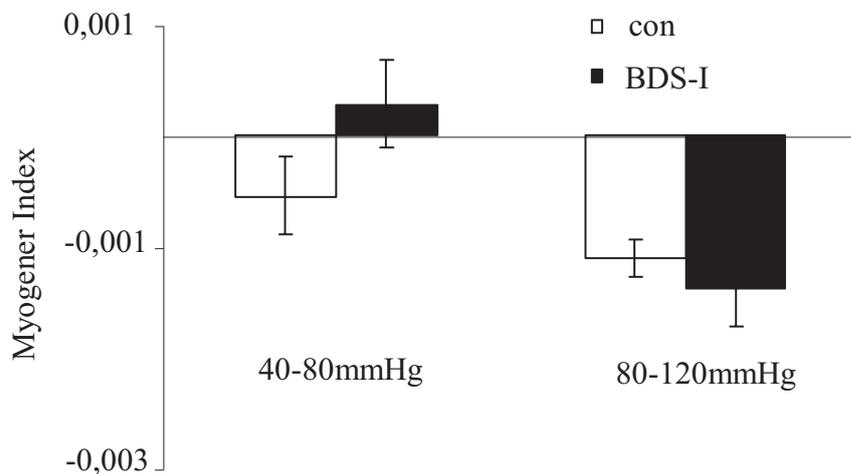


Abb. 3.12: Myogener Index unter Einfluss von BDS-I bei Drucksprüngen zwischen 40 und 80 mmHg und zwischen 80 und 120 mmHg.

Diese Daten dokumentieren, dass eine Aktivierung von Kv-Kanälen die myogenen Eigenschaften der A. cerebri posterior beeinflussen.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Versuchslösungen

Da geringe Änderungen im pH-Wert beträchtlichen Einfluss auf den Durchmesser kleiner Arterien haben, wird bei Untersuchungen zur Funktion solcher Gefäße ein pH-Puffer verwendet. Unter in-vivo Bedingungen dominiert das Natriumbicarbonat-Puffersystem, daher wird NaHCO_3 auch in vielen Untersuchungen als pH-Puffer benutzt. Dabei bilden Wasserstoff und Bicarbonat mit dem in der Lösung enthaltenen CO_2 ein Gleichgewicht. Das Kohlendioxid verlässt die Versuchskammer mit dem Blutgefäß jedoch in die umgebende Luft. Um das oben genannte Gleichgewicht aufrechtzuerhalten, wird die Lösung meist mit einem Gasgemisch aus 5% CO_2 und 95% O_2 (Carbogen) begast. Das Problem dabei ist, dass die Gasblasen die Lösungsoberfläche in permanente Bewegung versetzen und sich manchmal im Laufe des Versuches an der Arterie anlagern, was die optische Messung des Gefäßdurchmessers in Versuchen an isobaren Gefäßpräparaten beeinträchtigt, beziehungsweise unmöglich macht. Um diesen Effekt zu vermeiden, wurde in dieser Arbeit eine Versuchslösung ohne Bicarbonat verwendet, der pH wurde mittels HEPES gepuffert. Es konnte jedoch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl das Kontraktions- als auch das Relaxationsverhalten der hier untersuchten Gefäße unabhängig von der Verwendung Bicarbonat-haltiger und Bicarbonat-freier Lösung ist.

Bei der Zugabe von zu testenden Substanzen in die Messkammer werden diese üblicherweise in 100- bis 1000-fach höherer Konzentration als die Zielkonzentration appliziert, um eine Verdünnung der Versuchslösung bzw. Eigeneffekte der Lösungsmittel zu vermeiden. Damit muss sichergestellt werden, dass es nach der Zugabe der Substanzen zu ihrer homogenen Verteilung in der Messkammer kommt. In Versuchen, in denen der pH-Wert durch Begasung eingestellt wird, erfolgt diese Durchmischung mit Hilfe der sich durch die Lösung bewegenden Gasblasen. Das war aber in den hier beschriebenen Versuchen, wie oben dargelegt, nicht möglich. Es wurde daher ein anderes Verfahren benutzt: das Mischen mittels einer Pipette. Durch einen Vergleich dieses Verfahrens mit der Mischung durch Gasblasen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl das Kontraktions- als auch das Relaxationsverhalten der hier untersuchten Gefäße unabhängig vom verwendeten Mischverfahren ist.

Die verwendeten Substanzen wurden über eine Pipette direkt der Versuchslösung zugegeben. Das Problem bestand dabei in einer möglichst gleichmäßigen Durchmischung der Lösung mit dem applizierten Stoff, so dass das Blutgefäß möglichst schnell und homogen umspült wurde. Eine Möglichkeit war die ständige Zufuhr von Gasblasen über einen kleinen Schlauch in die

Messkammer. Diese Variante bot den Vorteil der schnellen Durchmischung, allerdings wurde die optisch-rechnerische Darstellung dadurch beeinflusst. Es befanden sich infolge dessen mehr Gasbläschen in der Messkammer, die sich um die Arterie herum anlagerten und bis zu ihrer Entfernung zur ungenauen Bestimmung des Durchmessers führten. Eine weitere Möglichkeit bestand im Durchmischen mittels der Pipette, die gleichzeitig zur Applikation der Substanz verwendet wurde. Nach Zugabe des Stoffes wurde dreimal ein Teil der Versuchslösung aufgenommen und vorsichtig ein- und auspipettiert. Der Vorteil dieser Methode lag darin, dass sich keine Gasblasen bildeten. Von Nachteil waren die Dauer der Mischphase und die schwierigere Umsetzung ohne mechanische Beeinflussung der Gefäße. Die Arterie durfte beim Pipettieren nicht berührt werden. Kontakt mit der Messkammer hätte auch zu Fehlmessungen geführt. Die Methode der Wahl war jedoch letztendlich das Mischen mittels Pipette, da nur so der störende Einfluss der Gasblasen ausgeschlossen werden konnte.

4.1.2 Präparation der Gefäße

Die korrekte Präparation der Arterien ist die wichtigste Voraussetzung für den Erfolg der Experimente, da nur so die kontraktile Eigenschaften der glatten Muskelzellen und intakte Endothelzellen erhalten bleiben. Direktes Berühren der Gefäße mit den Präparationsinstrumenten oder Dehnung der Gefäße in longitudinaler Richtung musste möglichst ausgeschlossen werden. Eine schonende Präparation wurde außerdem durch das Arbeiten in gekühlter und kalziumarmer Lösung erleichtert, da die Arterien unter diesen Bedingungen einen größeren Durchmesser besitzen und sich dadurch leichter auf die Drähte bzw. die Glaspipetten aufspannen ließen. Um die Intaktheit der Gefäße festzustellen, wurden folgende Kriterien aufgestellt: bei einem Druck von 80mmHg musste sich ein spontaner Tonus ausbilden, der aus einer Kontraktion von mindestens 15%, bezogen auf den Maximaldurchmesser, bestand. Nach Gabe von 10^{-7} M Noradrenalin bzw. Serotonin sollten die Gefäße um 25% kontrahieren und nach Applikation von 10^{-6} M Acetylcholin vollständig dilatieren. Um bei der Untersuchung der Rolle von Kv Kanälen für die myogene Reaktivität kleiner Arterien mögliche Einflüsse eines aktivierten Endothels auszuschließen, wurden die Versuche ohne luminalen Fluss durchgeführt. Um diese Bedingung zu gewährleisten, durften sich im präparierten Gefäßstück keine Abgänge befinden. Dieser Umstand wurde mit Hilfe einer Luftblase kontrolliert, die sich in dem Schlauch befand, der die Arterie mit der Flasche zur Druckregulierung verband. Jedes oben genannte, nicht erfüllte Kriterium führte zum Abbruch des Versuches.

Es ist bekannt, dass unter physiologischen Bedingungen durch einen luminalen Fluss endothelabhängige und -unabhängige Reaktionen ausgelöst werden. Ebenso unterliegt eine Arterie

in vivo keinem statischen, sondern pulsatilem Druck (Schubert and Mulvany 1999). So wurde entdeckt, dass pulsatile Druck im Gegensatz zu statischem Druck eine endothelunabhängige Dilatation in Koronararterien des Schweins auslöst (Goto, VanBavel et al. 1996). Diese Umstände wurden jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt, um klare experimentelle Bedingungen zu haben. Sie bedeuten aber eine Einschränkung der direkten Übertragbarkeit der vorgestellten Befunde auf in vivo Bedingungen, was in weiterführenden Versuchen im Detail zu klären ist.

4.1.3 Isobarer und isometrischer Versuchsaufbau

Wie im Abschnitt „Material und Methoden“ beschrieben, wird bei der isometrischen Methode ein Gefäßsegment auf zwei Drähten befestigt und die Wandspannung gemessen. Beim isobaren Versuchsaufbau wird die Arterie auf zwei Glaspipetten gezogen, mittels Nahtmaterial befestigt und mit physiologischer Lösung umspült. Die Ergebnisse beider Methoden können sich quantitativ unterscheiden. So ist die Depolarisation in isometrischen Präparaten nach Applikation von 10^{-5} M Noradrenalin 2,6 mal stärker als in isobaren (Schubert, Wesselman et al. 1996). Das Membranpotential ist unter isobaren Bedingungen ohne Applikation vasoaktiver Substanzen höher als unter isometrischen. Eine Erklärung dafür könnte die größere Wandspannung sein, die beim isobaren Versuchsaufbau vorherrscht (Buus, VanBavel et al. 1994). Durch diese liegt auch die Schwelle für den noradrenalinbedingten Kalziumeinstrom durch spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle niedriger, und es kommt eher zur Kontraktion (VanBavel and Mulvany 1994). Gefäßsegmente, die auf zwei Kanülen aufgespannt werden, kommen eher dem physiologischen in-vivo-Zustand nahe. Das liegt zum einen daran, dass die Gefäßwand im Querschnitt zirkulär ist und nicht wie beim isometrischen Aufbau in zwei Schichten flach aufeinander liegt. Zum anderen können Arterien, die isometrisch auf zwei Drähten aufgespannt sind, ihren Durchmesser nicht in dem Maße ändern wie unter isobaren Bedingungen. Weiterhin ist die Wahrscheinlichkeit, ein intaktes Endothel zu erhalten, höher, wenn die Gefäße nur an den Enden auf Pipetten aufgefädelt werden, als wenn zwei Drähte komplett durch das ganze Lumen geschoben werden. Kanülierte Arterien stehen unter dem Einfluss des transmuralen Drucks, eines physiologischen Stimulus, und können so einen spontanen Tonus erzeugen (Halpern, Osol et al. 1984). Es existieren eine Reihe weiterer Unterschiede zwischen beiden Modellen. Isometrisch auf Drähten aufgespannte Arterien beantworten nur unphysiologisch hohe Veränderungen in der Gefäßweite mit starker Kontraktion, während isobare Präparationen schon aufgrund kleinster Durchmesseränderungen kontrahieren (Davis and Hill 1999). Ein technisches Problem der isobaren Gefäßpräparation ist die

Schwierigkeit der korrekten Bestimmung des inneren Gefäßdurchmessers. Das Bild der Arterie wird über ein Mikroskop mit Kamera auf einen Computerbildschirm übertragen. Die Gefäßwand wird über Kontrastunterschiede zwischen Gefäßlumen und -wand bestimmt. Hier liegt eine mögliche Fehlerquelle: Luftblasen und Unreinheiten in der Gefäßpräparation können den Kontrast verwischen und somit zu Fehlern in der Messung führen. Durch die online Darstellung der Gefäße auf dem Monitor ist aber eine ständige Kontrolle dieser Fehlerquellen gegeben.

4.2 Die Wirkung von 4-Aminopyridin und BDS-I auf den myogenen Tonus

4.2.1 4-Aminopyridin

In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass die A.cerebri posterior unter Einfluss von steigenden Konzentrationen von 4-Aminopyridin (4-AP) zunehmend kontrahiert (siehe Abb. 3.7). Daten aus der Literatur bestätigen diesen Effekt (Knot and Nelson 1995; Plane, Johnson et al. 2005; Chen, Luykenaar et al. 2006; Straub, Girouard et al. 2009). Diese Wirkung von 4-AP ist eine logische Konsequenz seines bekannten Wirkmechanismus: 4-AP bewirkt eine Blockierung der Poren der spannungsabhängigen Kaliumkanäle. Es verhindert den Durchfluss der Kaliumionen und löst so eine Depolarisation, einen Ca^{2+} -Einstrom und damit eine Kontraktion aus. Diese an einzelnen Gefäßen beobachteten Effekte sind kreislaurelevant; die intravenöse Injektion von 4-AP bewirkt in der anästhesierten Ratte eine Blutdruckerhöhung und einen höheren peripheren Widerstand aufgrund einer Konstriktion der Arterien (Cox 2005).

4.2.2 BDS-I

Bei der Applikation von steigenden Konzentrationen von BDS-I kam es zu einer zunehmenden Dilatation der Arterien (siehe Abb.3.8). Dieser Effekt war unerwartet, da BDS-I als Kaliumkanalblocker bekannt ist. Von einer Reihe von Autoren (Diochot, Schweitz et al. 1998; Cox 2005; Miguel-Velado, Moreno-Dominguez et al. 2005; Yeung, Thompson et al. 2005) wurde BDS-I als spezifischer Blocker des Kv3.4-Kanals, bzw. von Yeung et al. 2005 ebenso als Blocker von Kv3.1- und Kv3.2-Kanälen (Yeung, Thompson et al. 2005) beschrieben.

Die Wirkungsweise von BDS-I als Kaliumkanalblocker besteht in einer Modifikation der spannungssensitiven Kanaldomänen. Die Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle wird dabei verringert und ihre Aktivierung verlangsamt (Yeung, Thompson et al. 2005). Über diesen Mechanismus müsste BDS-I eine Blockade der Kaliumkanäle, eine Depolarisation der Membran und Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen, den Einstrom von Kalziumionen und eine Kontraktion der Arterien bewirken. Da die Applikation von BDS-I jedoch eine Dilatation der

Gefäße erzeugte, kann diese Substanz nicht nur eine Blockade von Kaliumkanälen bewirken, sondern ein anderer Mechanismus muss im Vordergrund stehen.

4.3 Mechanismus der gefäßdilatierenden Wirkung von BDS-I

Um zu ergründen, ob die gefäßdilatierende Wirkung von BDS-I überhaupt von Kaliumkanälen vermittelt wird, wurde der Effekt von BDS-I auf die Gefäße nach Vorkontraktion mit KCl mit dem Effekt von BDS-I nach Vorkontraktion mit Serotonin verglichen (siehe Abb.3.9). Bei Zugabe von 42mM KCl zur extrazellulären Lösung verschiebt sich das Kaliumgleichgewichtspotential soweit in positive Richtung, dass es fast mit dem aktuellen Membranpotential übereinstimmt. Damit ist die treibende Kraft für Kaliumionen so minimal, dass selbst im Fall von Aktivitätsänderungen der Kaliumkanäle kaum Änderungen des Kaliumionenflusses auftreten und damit auch das Membranpotential und folglich der Kontraktionszustand der Gefäße unverändert bleibt. Das heißt im Detail: es wurde untersucht, ob es bei Zugabe von BDS-I zu einem mit KCl vorkontrahiertem Gefäß zu einer Dilatation kommt, wie es bei Applikation von BDS-I zu mit Serotonin vorkontrahierten Gefäßen beobachtet wurde oder ob diese Dilatation in mit KCl vorkontrahierten Gefäßen ausbleibt. Erfolgt eine Dilatation, wäre gezeigt, dass BDS-I auch über Kaliumkanal-unabhängige Mechanismen wirkt. Bleibt jedoch die Dilatation in der kaliumreichen Lösung aus, ist eine Beteiligung von Kaliumkanälen an der vasodilatierenden Wirkung von BDS-I sehr wahrscheinlich.

In dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass BDS-I mit Serotonin vorkontrahierte Gefäße deutlich dilatiert. Bei einer Vorkontraktion mit KCl blieb der vasodilatierende Effekt dann aber aus, was ein starker Hinweis für die Wirkungsweise von BDS-I über Kaliumkanäle ist. In glatten Gefäßmuskelzellen sind eine Reihe von Kaliumkanälen exprimiert: Kalzium-abhängige Kaliumkanäle, ATP-sensitive Kaliumkanäle, einwärtsgerichtete Kaliumkanäle und spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kv-Kanäle) (Nelson and Quayle 1995). Da für BDS-I eine Interaktion mit Kv3-Kanälen bekannt ist (Diochot, Schweitz et al. 1998; Yeung, Thompson et al. 2005), fokussierten wir uns auf die Frage, ob Kv-Kanäle an der gefäßdilatierenden Wirkung von BDS-I beteiligt sein könnten. Dazu wurden die Gefäße mit 4-AP, einem spezifischen Hemmer von Kv-Kanälen, zusammen mit Serotonin so vorkontrahiert, dass ein Kontraktionsniveau erreicht wurde, welches dem mit Serotonin allein erzeugten vergleichbar war. Unter Vorkontraktion mit Serotonin und 4-Aminopyridin erfolgte keine Dilatation. Da 4-AP zur spezifischen Blockade von Kv-Kanälen führt, hätte eine Substanz, die nicht über Kv-Kanäle dilatierend auf glatte Gefäßmuskeln wirkt, zur Relaxation führen müssen. Mit diesem

Versuch wurde gezeigt, dass BDS-I über die Aktivierung von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen eine Gefäßdilatation erzeugt.

Insofern stehen diese Ergebnisse, zumindest in Bezug darauf, dass BDS-I über Kv-Kanäle wirkt, im Einklang mit Daten aus der Literatur (Diochot, Schweitz et al. 1998; Cox 2005; Miguel-Velado, Moreno-Dominguez et al. 2005; Yeung, Thompson et al. 2005). Allerdings muss der Mechanismus, der zur Dilatation führt, weiter diskutiert werden. Die von BDS-I erzeugte Vasodilatation erscheint zunächst unlogisch, da die in der Literatur beschriebene Blockade der Kv3-Kanäle zu einer Vasokonstriktion führen müsste. Wie in der Einleitung genauer beschrieben, wirkt BDS-I hauptsächlich auf Kv3-Kanäle, die jedoch eine Minderheit unter den in glatten Gefäßmuskelzellen exprimierten Kv-Untereinheiten darstellen. Es gibt nur wenige Studien zum Effekt von BDS-I auf andere Kv-Untereinheiten (Diochot, Schweitz et al. 1998). Allerdings wurden diese Untersuchungen unter Bedingungen durchgeführt, bei denen eine Aktivierung der Kv-Untereinheiten kaum zu beobachten gewesen wäre. Insofern ist es auf der Basis der bisher veröffentlichten Daten unklar, ob BDS-I über eine aktivierende Wirkung an anderen Kv-Kanälen zur Dilatation führen kann. Dieser Frage wurde in der vorgelegten Arbeit nicht nachgegangen, da dazu ausführliche elektrophysiologische Untersuchungen an isolierten Gefäßmuskelzellen zur direkten Messung von Kaliumströmen notwendig gewesen wären. Erste Pilotversuche haben jedoch gezeigt, dass BDS-I in der Tat Kv-Ströme in isolierten glatten Gefäßmuskeln stimulieren kann (Gagov & Schubert, unveröffentlichte Befunde). BDS-I reduziert zwar ein wenig den Spitzenstrom der Kv-Ströme, allerdings verschiebt BDS-I die Potentialabhängigkeit der Inaktivierung des Kv-Stroms deutlich zu positiveren Membranpotentialen. Das heißt, BDS-I verringert die Inaktivierung der Kv-Ströme bei physiologischen Membranpotentialen und könnte somit zur Dilatation der Gefäße führen. Erst die Durchführung umfangreicherer elektrophysiologischer Versuche wird jedoch diese Frage abschließend klären können.

4.4 Wirkung von BDS-I auf die myogene Reaktion

In einer weiteren Versuchsserie wurde gefunden, dass die myogene Reaktion in Anwesenheit von BDS-I deutlich schwächer ausfällt (siehe Abb.3.10) als in seiner Abwesenheit. Gleichzeitig reduziert BDS-I den myogenen Tonus (siehe Abb.3.11). In Abwesenheit von BDS-I limitieren die Kv-Kanäle das Ausmaß der myogenen Reaktion (Knot and Nelson 1995; Plane, Johnson et al. 2005; Chen, Luykenaar et al. 2006). Bei Aktivierung führen sie zur Dilatation der Gefäße (Cox 2005). Wird die Potentialabhängigkeit der Inaktivierung zu positiveren Membranpotentialen hin verschoben, wie durch BDS-I bewirkt, werden Kv-Kanäle zwar

nicht aktiviert, sondern die Inaktivierung vermindert, was jedoch letztendlich zum gleichen Ergebnis, zu einem größeren Kaliumausstrom und damit zur Dilatation führt. Jedoch bleibt die myogene Reaktion in Anwesenheit von BDS-I nicht vollkommen aus, sondern wird nur abgeschwächt. Dadurch wird ersichtlich, dass die Kv-Kanäle, die von BDS-I beeinflusst werden, die myogene Reaktion modulieren. Eine ganze Reihe anderer Mechanismen sind weiterhin aktiv, die, wie in der Einleitung beschrieben, die myogene Reaktion auslösen und trotz des Einflusses von BDS-I, wenn auch schwächer ausgeprägt, erhalten.

Die detaillierte Analyse der Daten dieser Arbeit zeigte, dass die myogene Reaktion im Druckbereich zwischen 40 und 80mmHg deutlich von BDS-I beeinflusst wird. Im Druckbereich zwischen 80 und 120mmHg ist sie dagegen nicht verändert (siehe Abb. 3.12). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass bei höheren Drücken, das heißt ab 80mmHg, die Wirkung der Kv-Ströme auf die myogene Reaktion weniger stark ausgeprägt ist. Kv-Ströme sind bei stärker negativen Membranpotentialen, wie sie bei niedrigen Drücken unter 40mmHg in den glatten Muskelzellen kleiner Arterien vorliegen (Schubert and Mulvany 1999), nicht aktiv. Wird der transmurale Druck auf über 40mmHg erhöht, führt die damit verbundene Depolarisation zu einer Aktivierung der Kv-Kanäle, ab einem bestimmten Schwellenpotential nimmt der Strom stark zu. Das bedeutet, dass der Kaliumstrom im Bereich niedriger Drücke von 40 auf 80mmHg deutlich zunimmt und damit der Einfluss der Kv-Kanäle auf die myogene Reaktion bei Erhöhung des transmuralen Drucks wächst. In dem Druckbereich, in welchem Kv-Strömen eine höhere Bedeutung zukommt, nimmt auch der Einfluss von BDS-I zu.

Bei Aktivierung der Kv-Kanäle, in der vorgelegten Arbeit durch BDS-I, ist die Wirkung von BDS-I bei niedrigem Druck im Bereich von 40mmHg, d.h. mehr hyperpolarisiertem Membranpotential, relativ klein. Bei höherem Druck im Bereich von 80mmHg ist der Effekt von BDS-I ausgeprägter. Daraus ergibt sich, dass die myogene Reaktion unter BDS-I bei niedrigem Druck zwischen 40 und 80mmHg abgeschwächt ist. Bei weiterer Erhöhung des transmuralen Drucks, in dieser Arbeit auf 120mmHg, nimmt bei der damit verbundenen Depolarisation der Kv-Strom dann nur noch gemäßigt zu. Dadurch bleibt der Einfluss der Kv-Kanäle auf die myogene Reaktion relativ konstant. Damit erklärt sich, dass BDS-I im Druckbereich zwischen 80 und 120mmHg die myogene Reaktion nicht mehr verändert.

Die hier beschriebene komplexe Wirkung von BDS-I auf die myogene Reaktion ist funktionell wichtig. Die myogene Reaktion im Organismus bewirkt, dass der Blutfluss bei Veränderung des systemischen Blutdrucks mehr oder weniger konstant bleibt. Wenn sich nur der systemische Blutdruck ändert, aber nicht die Aktivität des betroffenen Organs, wie zum Beispiel Niere oder Gehirn, gibt es keinen Grund für eine Veränderung des Blutflusses dorthin, was

durch die myogene Reaktion auch bewirkt wird. Allerdings könnte bei sehr niedrigem Blutdruck, das heißt am unteren Ende des physiologischen Bereichs, die Durchblutung in essentiellen Organen gefährdet sein. Dann ist es sinnvoll, durch lokale Regulation eine Dilatation der vorgeschalteten Arterien und damit eine Perfusionssteigerung zu erreichen, die durch die myogene Reaktion nicht zu stark verhindert werden sollte. In dieser Situation ist also eine abgeschwächte myogene Reaktion notwendig. Wird der Druck im physiologischen Bereich zwischen 80 und 120mmHg höher, besteht jedoch die Gefahr der Hyperperfusion mit nachfolgender Ödembildung. Das führt besonders im Gehirn aufgrund der starren räumlichen Begrenzung durch den knöchernen Schädel zur Beeinträchtigung des Gewebes und damit zu schwerwiegenden Problemen. Vor diesen negativen Folgen schützt die myogene Reaktion, die besonders in diesem Druckbereich stark wirksam ist. Die myogene Reaktion sollte dabei auch nach Gefäßdilatation, wie z.B. durch BDS-I, voll wirksam bleiben, was in der vorliegenden Arbeit auch beobachtet wurde.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese überprüft, dass BDS-I durch Stimulation von Kv-Strömen kleine Arterien relaxiert und damit die myogene Reaktion beeinflusst.

Die Untersuchungen erfolgten an isometrischen und isobaren Gefäßpräparationen. BDS-I erzeugte eine Dilatation der Arterien. In der Literatur galt BDS-I bisher als Kv-Kanalblockierende Substanz. Der Mechanismus der gefäßdilatierenden Wirkung besteht wohl darin, dass BDS-I Kv-Ströme stimuliert, indem es die Potentialabhängigkeit der Inaktivierung des Kv-Stroms zu deutlich positiveren Membranpotentialen hin verschiebt. Es verhindert gewissermaßen deren Inaktivierung.

Um sicher zu stellen, dass die Wirkung von BDS-I wirklich über spannungsgesteuerte Kaliumkanäle vermittelt wird, wurden Kv-Kanäle mit einem unspezifischen Kv-Kanalblocker, 4-AP, geblockt. In einem weiteren Versuch wurden Kaliumströme durch eine hohe extrazelluläre KCl-Konzentrationen ausgeschaltet. Bei diesen Experimenten blieb der dilatierende Effekt von BDS-I aus. Das heißt, BDS-I wirkt ausschließlich über die Stimulation von Kv-Strömen dilatierend auf die Arterien.

Weiterhin wurde die Wirkung von BDS-I auf die myogene Reaktion getestet. Im Druckbereich zwischen 40 und 80mmHg schwächt BDS-I die myogene Reaktion deutlich ab, während sich bei Drücken über 80mmHg keine Veränderung zeigt. Das bedeutet, dass in niedrigen Druckbereichen zwischen 40 und 80mmHg der Einfluss von Kv-Strömen auf die myogene Reaktion eine größere Rolle spielt, als bei Drücken zwischen 80 und 120mmHg. Bei einem Druck von 40mmHg ist die Wirkung von BDS-I geringer, nimmt aber dann bei 80mmHg zu. Zwischen 80 und 120mmHg bleibt der Einfluss der Kv-Kanäle auf die myogene Reaktion relativ konstant. Somit wird in diesem Druckbereich die myogene Reaktion durch BDS-I nicht mehr verändert.

Die funktionelle Bedeutung der myogenen Reaktion liegt darin, den Blutfluss auch bei Veränderungen des systemischen Blutdrucks konstant zu halten. Bei Blutdrucksteigerung sollte die Perfusion von nachgeschalteten Organen, wie Niere und Gehirn, bei unveränderter Aktivität konstant bleiben. Auf der anderen Seite ist eine gesteigerte und damit konstante Durchblutung bei niedrigem systemischem Blutdruck sinnvoll, was durch die Abschwächung der myogenen Reaktion erreicht wird. Bei niedrigem Druck bewirken kleine, kurzzeitige Druckerhöhungen keine reaktive Gefäßkonstriktion. Das ist sinnvoll, da sonst die Durchblutung bei niedrigem Druck durch kleine Schwankungen noch mehr gesenkt werden würde. Bei hohem Druck ist die myogene Reaktion stabiler. Durch BDS-I wurde keine weitere Gefäßdilatation erreicht, wodurch nachgeschaltete Organe vor Hyperperfusion geschützt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Anschütz, S. and R. Schubert (2005).** "Modulation of the myogenic response by neurogenic influences in rat small arteries." Br J Pharmacol **146**(2): 226-33.
- Bolz, S. S., L. Vogel, et al. (2003).** "Sphingosine kinase modulates microvascular tone and myogenic responses through activation of RhoA/Rho kinase." Circulation **108**(3): 342-7.
- Brayden, J. E. and M. T. Nelson (1992).** "Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels." Science **256**(5056): 532-5.
- Brenner, R., G. J. Perez, et al. (2000).** "Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel." Nature **407**(6806): 870-6.
- Buus, N. H., E. VanBavel, et al. (1994).** "Differences in sensitivity of rat mesenteric small arteries to agonists when studied as ring preparations or as cannulated preparations." Br J Pharmacol **112**(2): 579-87.
- Chen, T. T., K. D. Luykenaar, et al. (2006).** "Key role of Kv1 channels in vasoregulation." Circ Res **99**(1): 53-60.
- Cox, R. H. (2005).** "Molecular determinants of voltage-gated potassium currents in vascular smooth muscle." Cell Biochem Biophys **42**(2): 167-95.
- Davis, M. J. and M. A. Hill (1999).** "Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response." Physiol Rev **79**(2): 387-423.
- Diochot, S., H. Schweitz, et al. (1998).** "Sea anemone peptides with a specific blocking activity against the fast inactivating potassium channel Kv3.4." J Biol Chem **273**(12): 6744-9.
- Dopico, A. M., M. T. Kirber, et al. (1994).** "Membrane stretch directly activates large conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in mesenteric artery smooth muscle cells." Am J Hypertens **7**(1): 82-9.
- Doughty, J. M. and P. D. Langton (2001).** "Measurement of chloride flux associated with the myogenic response in rat cerebral arteries." J Physiol **534**(Pt 3): 753-61.
- Earley, S., S. V. Straub, et al. (2007).** "Protein kinase C regulates vascular myogenic tone through activation of TRPM4." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(6): H2613-22.
- Frisbee, J. C., R. J. Roman, et al. (2001).** "20-HETE contributes to myogenic activation of skeletal muscle resistance arteries in Brown Norway and Sprague-Dawley rats." Microcirculation **8**(1): 45-55.

- Frisbee, J. C., R. J. Roman, et al. (2001).** "20-HETE modulates myogenic response of skeletal muscle resistance arteries from hypertensive Dahl-SS rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **280**(3): H1066-74.
- Gebremedhin, D., A. R. Lange, et al. (2000).** "Production of 20-HETE and its role in auto-regulation of cerebral blood flow." Circ Res **87**(1): 60-5.
- Gokina, N. I., K. M. Park, et al. (2005).** "Effects of Rho kinase inhibition on cerebral artery myogenic tone and reactivity." J Appl Physiol **98**(5): 1940-8.
- Goto, M., E. VanBavel, et al. (1996).** "Vasodilatory effect of pulsatile pressure on coronary resistance vessels." Circ Res **79**(5): 1039-45.
- Halpern, W., G. Osol, et al. (1984).** "Mechanical behavior of pressurized in vitro prearteriolar vessels determined with a video system." Ann Biomed Eng **12**(5): 463-79.
- Jaggari, J. H. (2001).** "Intravascular pressure regulates local and global Ca(2+) signaling in cerebral artery smooth muscle cells." Am J Physiol Cell Physiol **281**(2): C439-48.
- Jaggari, J. H., V. A. Porter, et al. (2000).** "Calcium sparks in smooth muscle." Am J Physiol Cell Physiol **278**(2): C235-56.
- Karibe, A., J. Watanabe, et al. (1997).** "Role of cytosolic Ca²⁺ and protein kinase C in developing myogenic contraction in isolated rat small arteries." Am J Physiol **272**(3 Pt 2): H1165-72.
- Kauser, K., J. E. Clark, et al. (1991).** "Inhibitors of cytochrome P-450 attenuate the myogenic response of dog renal arcuate arteries." Circ Res **68**(4): 1154-63.
- Keller, M., D. Lidington, et al. (2006).** "Sphingosine kinase functionally links elevated transmural pressure and increased reactive oxygen species formation in resistance arteries." Faseb J **20**(6): 702-4.
- Kirber, M. T., R. W. Ordway, et al. (1992).** "Both membrane stretch and fatty acids directly activate large conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in vascular smooth muscle cells." FEBS Lett **297**(1-2): 24-8.
- Knot, H. J. and M. T. Nelson (1995).** "Regulation of membrane potential and diameter by voltage-dependent K⁺ channels in rabbit myogenic cerebral arteries." Am J Physiol **269**(1 Pt 2): H348-55.
- Knot, H. J. and M. T. Nelson (1998).** "Regulation of arterial diameter and wall [Ca²⁺] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure." J Physiol **508** (Pt 1): 199-209.

- Knot, H. J., N. B. Standen, et al. (1998).** "Ryanodine receptors regulate arterial diameter and wall $[Ca^{2+}]$ in cerebral arteries of rat via Ca^{2+} -dependent K^+ channels." J Physiol **508** (Pt 1): 211-21.
- Korzick, D. H., M. H. Laughlin, et al. (2004).** "Alterations in PKC signaling underlie enhanced myogenic tone in exercise-trained porcine coronary resistance arteries." J Appl Physiol **96**(4): 1425-32.
- Lagaud, G., N. Gaudreault, et al. (2002).** "Pressure-dependent myogenic constriction of cerebral arteries occurs independently of voltage-dependent activation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(6): H2187-95.
- Lange, A., D. Gebremedhin, et al. (1997).** "20-Hydroxyeicosatetraenoic acid-induced vasoconstriction and inhibition of potassium current in cerebral vascular smooth muscle is dependent on activation of protein kinase C." J Biol Chem **272**(43): 27345-52.
- McCarron, J. G., C. A. Crichton, et al. (1997).** "Myogenic contraction by modulation of voltage-dependent calcium currents in isolated rat cerebral arteries." J Physiol **498** (Pt 2): 371-9.
- Miguel-Velado, E., A. Moreno-Dominguez, et al. (2005).** "Contribution of K_v channels to phenotypic remodeling of human uterine artery smooth muscle cells." Circ Res **97**(12): 1280-7.
- Miller, F. J., Jr., K. C. Dellsperger, et al. (1997).** "Myogenic constriction of human coronary arterioles." Am J Physiol **273**(1 Pt 2): H257-64.
- Narayanan, J., M. Imig, et al. (1994).** "Pressurization of isolated renal arteries increases inositol trisphosphate and diacylglycerol." Am J Physiol **266**(5 Pt 2): H1840-5.
- Nelson, M. T. and J. M. Quayle (1995).** "Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle." Am J Physiol **268**(4 Pt 1): C799-822.
- Nowicki, P. T., S. Flavahan, et al. (2001).** "Redox signaling of the arteriolar myogenic response." Circ Res **89**(2): 114-6.
- Pfitzer, G. (2001).** "Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle." J Appl Physiol **91**(1): 497-503.
- Plane, F., R. Johnson, et al. (2005).** "Heteromultimeric K_v1 channels contribute to myogenic control of arterial diameter." Circ Res **96**(2): 216-24.
- Ratz, P. H., K. M. Berg, et al. (2005).** "Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus." Am J Physiol Cell Physiol **288**(4): C769-83.

- Schubert, R., V. U. Kalentchuk, et al. (2002).** "Rho kinase inhibition partly weakens myogenic reactivity in rat small arteries by changing calcium sensitivity." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(6): H2288-95.
- Schubert, R., D. Lidington, et al. (2008).** "The emerging role of Ca²⁺ sensitivity regulation in promoting myogenic vasoconstriction." Cardiovasc Res **77**(1): 8-18.
- Schubert, R. and M. J. Mulvany (1999).** "The myogenic response: established facts and attractive hypotheses." Clin Sci (Lond) **96**(4): 313-26.
- Schubert, R., J. P. Wesselman, et al. (1996).** "Noradrenaline-induced depolarization is smaller in isobaric compared to isometric preparations of rat mesenteric small arteries." Pflugers Arch **431**(5): 794-6.
- Silbernagl, S. und R. Klinke.** Lehrbuch der Physiologie. 3.Auflage. Stuttgart; New York: Thieme, 2001.
- Somlyo, A. P. and A. V. Somlyo (2003).** "Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase." Physiol Rev **83**(4): 1325-58.
- Straub, S. V., H. Girouard, et al. (2009).** "Regulation of intracerebral arteriolar tone by K(v) channels: effects of glucose and PKC." Am J Physiol Cell Physiol **297**(3): C788-96.
- Su, B. Y., K. M. Reber, et al. (2003).** "Development of the myogenic response in postnatal intestine: role of PKC." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **284**(3): G445-52.
- Tammaro, P., A. L. Smith, et al. (2004).** "Pharmacological evidence for a key role of voltage-gated K⁺ channels in the function of rat aortic smooth muscle cells." Br J Pharmacol **143**(2): 303-17.
- VanBavel, E. and M. J. Mulvany (1994).** "Role of wall tension in the vasoconstrictor response of cannulated rat mesenteric small arteries." J Physiol **477 (Pt 1)**: 103-15.
- VanBavel, E., E. T. van der Meulen, et al. (2001).** "Role of Rho-associated protein kinase in tone and calcium sensitivity of cannulated rat mesenteric small arteries." Exp Physiol **86**(5): 585-92.
- Veerareddy, S., C. L. Cooke, et al. (2004).** "Gender differences in myogenic tone in superoxide dismutase knockout mouse: animal model of oxidative stress." Am J Physiol Heart Circ Physiol **287**(1): H40-5.
- Watanabe, J., M. Keitoku, et al. (1993).** "alpha-Adrenergic augmentation of myogenic response in rat arterioles: role of protein kinase C." Am J Physiol **264**(2 Pt 2): H547-52.

- Welsh, D. G., M. T. Nelson, et al. (2000).** "Swelling-activated cation channels mediate depolarization of rat cerebrovascular smooth muscle by hyposmolarity and intravascular pressure." J Physiol **527 Pt 1**: 139-48.
- Wesselman, J. P., J. A. Spaan, et al. (2001).** "Role of protein kinase C in myogenic calcium-contraction coupling of rat cannulated mesenteric small arteries." Clin Exp Pharmacol Physiol **28**(10): 848-55.
- Wesselman, J. P., E. VanBavel, et al. (1996).** "Voltage-operated calcium channels are essential for the myogenic responsiveness of cannulated rat mesenteric small arteries." J Vasc Res **33**(1): 32-41.
- Yeung, S. Y., D. Thompson, et al. (2005).** "Modulation of Kv3 subfamily potassium currents by the sea anemone toxin BDS: significance for CNS and biophysical studies." J Neurosci **25**(38): 8735-45.
- Zhang, F., M. H. Wang, et al. (2004).** "Transfection of CYP4A1 cDNA decreases diameter and increases responsiveness of gracilis muscle arterioles to constrictor stimuli." Am J Physiol Heart Circ Physiol **287**(3): H1089-95.
- Zou, H., P. H. Ratz, et al. (1995).** "Role of myosin phosphorylation and $[Ca^{2+}]_i$ in myogenic reactivity and arteriolar tone." Am J Physiol **269**(5 Pt 2): H1590-6.
- Zou, H., P. H. Ratz, et al. (2000).** "Temporal aspects of Ca^{2+} and myosin phosphorylation during myogenic and norepinephrine-induced arteriolar constriction." J Vasc Res **37**(6): 556-67.

7 Thesen

- Blutgefäße unterliegen einer myogenen Autoregulation, um nachgeschaltete Organe konstant mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. Dabei wird der Blutfluss an einzelnen Organen, wie zum Beispiel an Niere und Gehirn, auch bei größeren Schwankungen des systemischen Blutdrucks konstant gehalten. Diese Autoregulation erfolgt durch Kontraktion und Dilatation kleiner Arterien in Antwort auf Änderungen des Blutdrucks.
- Die auf Druckerhöhung folgende Kontraktion und auf Drucksenkung folgende Dilatation nennt man myogene Reaktion.
- In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass spannungsgesteuerte Kaliumkanäle an der myogenen Reaktion beteiligt sind. Demzufolge können Substanzen, die auf Kaliumkanäle wirken, wie z.B. BDS-I, die myogene Reaktion beeinflussen.
- In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese geprüft, dass BDS-I durch Stimulation von Kv-Strömen kleine Arterien relaxiert und damit die myogene Reaktion beeinflusst.
- Der innere Gefäßdurchmesser bzw. dessen Veränderungen wurden in vitro an isobaren Präparaten der A.cerebri posterior gemessen.
- Durch unspezifische Blockade von Kv-Kanälen mit 4-AP kommt es zur Kontraktion der Gefäße.
- Bei Zugabe von BDS-I erfolgte eine Dilatation und Abschwächung der myogenen Reaktion im Bereich zwischen 40 und 80mmHg.
- Nach unspezifischer Blockade der Kv-Kanäle mit 4-AP und KCl bleibt der vasodilatierende Effekt von BDS-I aus.
- Daraus ergibt sich, dass BDS-I über spannungsgesteuerte Kaliumkanäle zur Dilatation führt und dass Kv-Kanäle an der Regulation der myogenen Reaktion beteiligt sind.
- Der dilatierende Effekt von BDS erklärt sich aller Wahrscheinlichkeit nach aus einer Verschiebung der Potentialabhängigkeit der Inaktivierung des Kv-Stroms zu deutlich positiveren Membranpotentialen.
- In niedrigen Druckbereichen (40-80mmHg) schwächt BDS-I die myogene Reaktion ab, während es in höheren Druckbereichen (80-120mmHg) nicht zu einer Änderung kommt.
- Im Druckbereich unter 40mmHg herrschen stärker negative Membranpotentiale vor, wodurch die Kv-Ströme nicht aktiv sind. Zwischen 40 und 80mmHg nimmt der Ka-

liumstrom zu und somit wächst der Einfluss der Kaliumströme auf die myogene Reaktion.

- Bei Erhöhung des transmuralen Drucks auf 120mmHg bleibt der Einfluss der K_v -Kanäle auf die myogene Reaktion relativ konstant und somit wird diese durch BDS-I nicht mehr verändert.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig, ohne fremde Hilfe oder andere als in der Arbeit angegebene Hilfsmittel angefertigt habe.

Schwerin, 08.06. 2010

Esther Uhlig

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich als erstes für die hervorragende Anleitung während der Durchführung der Experimente und die außergewöhnlich engagierte Betreuung beim Verfassen dieser Arbeit bei Prof. Dr. med. Schubert bedanken.

Desweiteren danke ich den Mitarbeitern des Institutes für Physiologie, besonders den Medizinisch-Technischen-Assistentinnen, die mir stets motivierend zur Seite standen. Ohne sie wäre die praktische Durchführung der Versuche nicht möglich gewesen.

Ebenfalls danke ich Frau Dr. med. Uhlig, Herrn Dr. phil. Becker und Frau Blumberg für ihre Korrekturlesungen, Frau Grossmann und Herrn Kopplow für ihren Rat bei technischen Problemen.

Meiner Familie gebührt außerdem für ihre unendliche Geduld mit mir ein besonderes Dankeschön.