Aus dem Institut für Physiologie an der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. R. Köhling

„Myogene Autoregulation kleiner Arterien durch pulsatile Drücke“

Inauguraldissertation

zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
André Budrowitz
geboren am 10.06.1980 in Schwerin

Rostock, 28.11.2010
Dekan: Prof. Dr. med. E. Ch. Reisinger

urn:nbn:de:gbv:28-diss2011-0122-8

Dekan: Prof. Dr. med. E. Ch. Reisinger

1.	Gutachter:	Prof. Dr. med. Rudolf Schubert, Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg
2.	Gutachter:	Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Maik Gollasch, Charité - Universitätsmedizin Berlin
3.	Gutachter:	PD Dr. med. Timo Kirschstein, Medizinische Fakultät Universität Rostock

Tag der Verteidigung: 19.07.2011

1 Einleitung

		Seite
1.1	Die Autoregulation des Blutflusses	1
1.2	Die myogene Reaktion	2
1.2.1	Der glatte Gefäßmuskel	3
1.2.2	Die Membrandepolarisation	4
1.2.2.1	Nichtselektive Kationenkanäle	4
1.2.2.2	Spannungsabhängige Kalziumkanäle	6
1.2.2.3	Kalziumabhängige Kaliumkanäle	6
1.2.2.4	Chloridkanäle	7
1.2.3	Intrazelluläre Signaltransduktionswege	8
1.2.3.1	Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration	8
1.2.3.2	Myosin-Leichtketten-Kinase (MLC-K)	10
1.2.3.3	Tyrosinkinase	10
1.2.3.4	Proteinkinase C (PKC)	11
1.2.3.5	RhoA/Rho-Kinase	12
1.2.3.6	Aktin-Zytoskelett	13
1.2.3.7	Cytochrom P_{450}-abhängiger Metabolismus der Arachidonsäure; 20-HETE	13
1.3	Aufgabenstellung	14

2 Material und Methoden

2.1	Untersuchungsmodelle	16
2.2	Material	16
2.3	Methoden	16
2.3.1	Die Präparation der kleinen Arterien	16
2.3.2	Einspannen des Präparates in die Messkammer	19
2.3.3	Durchführung der Messung	19
2.3.4	Messung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration mit Fura-2-AM	21
2.3.5	Versuchsablauf	21
2.4	Chemikalien	25
2.5	Statistik	25

3 Ergebnisse

3.1	Wirkung pulsatilen Drucks auf den Durchmesser kleiner Arterien	27
3.2	Abhängigkeit der intrazellulären Kalziumkonzentration vom pulsatilen Druck (A. caudalis)	32
3.3	Frequenzabhängige Modulation der myogenen Reaktion der A. gracilis	37
3.4	Abhängigkeit der intrazellulären Kalziumkonzentration vom pulsatilen Druck (A. gracilis)	39
3.5	Modulation der Kalziumsensitivität durch partielle Rho-Kinase-Inhibition	41

4 Diskussion

4.1	Diskussion der Methodik	42
4.1.1	Wahl des isobaren Präparats als Untersuchungsmodell	42
4.1.2	Güte der Präparate – Ausschlusskriterien	43
4.1.3	Erfassung der Messwerte	44
4.2	Der konstante und pulsatile Druck	45
4.3	Frequenzabhängige Modulation der myogenen Reaktion	46
4.4	Intrazelluläres Kalzium und Kalziumsensitivität	47
4.5	Extrazelluläre Modulation der myogenen Reaktion	49
4.6	Physiologische und pathophysiologische Bedeutung	50

5 Zusammenfassung 51

6 Thesen 53

7 Quellenverzeichnis 55

Abkürzungen I

Danksagung II

Lebenslauf III

Selbständigkeitserklärung IV

1 Einleitung

1.1 Autoregulation des Blutflusses

In vielen Organen ist die Aufrechterhaltung eines relativ konstanten Blutflusses, besonders während großer Änderungen des Perfusionsdrucks, maßgeblich entscheidend für deren optimale Leistungsfähigkeit. Bei der Regulation von Blutdruck und Blutfluss kommt kleinen Arterien und Arteriolen eine große Bedeutung zu, da diese ihren Durchmesser und damit die Organperfusion über verschiedene Mechanismen verändern können. In vivo sind eine Vielzahl von konstringierend und dilatierend wirkenden Faktoren an der Steuerung des Kontraktionszustands kleiner Arterien beteiligt. Hierzu gehören der Blutfluss, die Innervation beziehungsweise die Transmitter des vegetativen Nervensystems, humorale und endotheliale Faktoren und aus dem umgebenden Gewebe stammende Metabolite sowie der pulsierende Blutdruck. Liegen durch Änderung des Perfusionsdrucks oder erhöhte Stoffwechselleistung versorgter Gebiete veränderte Bedingungen vor, kann über verschiedene Mechanismen eine Stabilisierung des Blutflusses erfolgen. Dazu gehören eine systemische Regulation über den Tonus der sympathischen Innervation oder über vasoaktive Hormone, aber auch lokale autoregulatorische Faktoren wie die metabolische Kontrolle und die myogene Aktivität. Metabolische Einflüsse auf die Gefäßweite sind zum Beispiel Verschiebungen von Ionenkonzentrationen oder veränderte Partialdrücke, wobei eine gering verminderte extrazelluläre Kaliumkonzentration, ein alkalisches Milieu, ein verringerter CO_2-Partialdruck (pCO_2) oder ein erhöhter Sauerstoffpartialdruck (pO_2) konstringierend wirken, gegensinnige Veränderungen dagegen dilatierend.

Die myogene Aktivität der Gefäße wird durch ihren basalen Tonus, ihre spontane vasomotorische Aktivität sowie die myogene Reaktion bestimmt. Letztere äußert sich in einer Gefäßmuskelreaktion auf veränderte Druckverhältnisse mit konsekutiver Änderung des Gefäßdurchmessers und damit einer Anpassung des Blutflusses. Bezieht man demnach die myogene Reaktion auf das Gefäßsystem, so ist sie als autoregulatorischer Mechanismus im eigentlichen Sinne zu sehen.

1.2 Die myogene Reaktion

Unter der myogenen Reaktion, die nach ihrem Erstbeschreiber auch als Bayliss-Effekt bezeichnet wird, versteht man die reaktive Kontraktion von Gefäßen auf eine Erhöhung des transmuralen Drucks, beziehungsweise ihre Dilatation als Reaktion auf eine Drucksenkung, in deren Folge die Perfusion des jeweiligen Versorgungsgebietes weitgehend konstant gehalten werden kann *[Bayliss 1902]*. Die Erhöhung der Wandspannung wird als der zur myogenen Reaktion führende Reiz angesehen *[Johnson 1989; Schubert und Mulvany 1999; Carlson und Secomb 2004; Azzawi und Austin 2005]*. Der eigentliche Sensor, der diese Änderung aufnimmt, ist jedoch noch unbekannt *[Davis und Hill 1999]*.

Das Phänomen der myogenen Reaktion kann bei einer Vielzahl von Gefäßen in unterschiedlich starker Ausprägung beobachtet werden. So zeigte sich, dass im Vergleich zur relativ schwachen myogenen Reaktion kleiner Venen, die myogene Antwort kleiner Arterien und Arteriolen sehr viel stärker ausgeprägt ist *[Berczi et al. 1992; Kuo et al. 1993; Dörnyei et al. 1996]*. Weiterhin variiert der Grad ihrer Ausprägung in Abhängigkeit vom betrachteten Gefäßbett. So fand sich eine schwächere myogene Reaktion in subendokardialen Arterien des Schweins im Vergleich zu subepikardialen Arterien *[Kuo et al. 1988]*. Ebenso konnte für Hirnarterien verschiedener Spezies eine ausgeprägtere myogene Reaktion gezeigt werden als für Mesenterialarterien vergleichbarere Größe *[Osol et al. 1991; Coombes et al. 2000]*.

Außerdem besteht ein Zusammenhang zwischen der Stärke der myogenen Reaktion und dem Gefäßdurchmesser. Während kleine (<50 µm) und große (>1000 µm) Arterien beziehungsweise Arteriolen eine vergleichsweise schwache Reaktion zeigten, konnte bei Gefäßen mittleren Durchmessers die stärkste myogene Reaktion beobachtet werden *[Davis 1993; Thorin-Trescases et al. 1997; Golding et al. 1998]*.

Über die Beteiligung der unterschiedlichen zellulären Komponenten der Gefäßwand an der myogenen Reaktion liegt eine Vielzahl von Untersuchungen vor. Dabei lässt sich die Gefäßwand klassischerweise auf drei hauptsächliche Zellverbände mit Einfluss auf den Kontraktionszustandes der Gefäße reduzieren: die glatte Gefäßmuskulatur, das Endothel und die in der Adventitia liegenden Nervenendigungen.

Nach Blockade der freien Nervenendigungen und der aus ihnen freigesetzten Transmitter als auch deren Rezeptoren durch unterschiedliche Substanzen sowie deren Kombination wie zum Beispiel Tetrodotoxin, Phentolamin, Phenoxybenzamin, Propranolol und Atropin oder 6-Hydroxydopamin *[Harder 1984; Osol und Halpern 1985; Berczi et al. 1992; Schubert und Anschütz 2005]* war die myogenen Reaktion unverändert. Diese Befunde sprechen damit

gegen die Teilnahme nicht stimulierter freier Nervenendigungen an der Ausbildung der myogenen Reaktion.

Bezüglich der Beteiligung des Endothels an der Entwicklung der myogenen Reaktion finden sich in der Literatur widersprüchliche Resultate, wobei sich jedoch eine Abhängigkeit von der jeweils angewendeten Methode für die Entfernung des Endothels zeigte. Erfolgt die Endothelentfernung durch chemische Substanzen, so ist eine signifikante Veränderung der myogenen Reaktion zu beobachten, nach vorsichtiger mechanischer Entfernung ist eine solche Veränderung jedoch nicht mehr nachweisbar. Bei Verwendung adäquater Methoden zur Entfernung des Endothels konnte gezeigt werden, dass das nicht stimulierte Endothel nicht an der Ausbildung der myogenen Reaktion beteiligt ist *[McCarron et el. 1989; Kuo et al. 1991; Falcone et al. 1991; Meininger und Davis 1992; Sun et al. 1994; Sipkema et al. 1997; Garcia und Bund 1998]*. Im Gegensatz dazu wurde bei Hirnarterien der Ratte mit intaktem Endothel eine schwächere Ausprägung der myogenen Antwort im Vergleich zu denen ohne Endothel festgestellt, was jedoch auf die dilatierende Wirkung von aus dem intakten Endothel konstitutiv freigesetzten NO (Stickoxid) zurückgeführt wurde *[Zimmermann et al. 1997]*. In Anbetracht dieser Ergebnisse und aufgrund verschiedener, im Rahmen der myogenen Reaktion beobachteter, in den glatten Muskelzellen ablaufender druckinduzierter Mechanismen wie zum Beispiel der Membrandepolarisation sowie dem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und anderer intrazellulärer Botenstoffe, geht man davon aus, dass die myogene Reaktion ausschließlich durch die glatten Muskelzellen bedingt wird *[Schubert und Mulvany 1999]*.

1.2.1 Der glatte Gefäßmuskel

Man unterscheidet nach funktionellen und strukturellen Gesichtspunkten zwei Typen der glatten Muskulatur, den Single-Unit-Typ und den Multi-Unit-Typ *[Schmidt et al. 2005, S. 136-137]*.

Der Single-Unit-Typ ist durch eine eigene Automatie und somit durch eine spontane myogene rhythmische Aktivität gekennzeichnet *[Noack et al. 1992]*. Zwischen den einzelnen Muskelzellen besteht eine elektrische Kopplung über so genannte gap junctions, so dass die Gesamtheit der miteinander verbundenen Myozyten eine funktionelle Einheit bildet. Vegetative Nerven wirken dabei allenfalls modulierend. Glatte Muskeln vom Multi-Unit-Typ

werden direkt als einzelne Zellen oder als kleine funktionelle Einheit von vegetativen Nerven innerviert, eine eigene spontane Aktivität ist nur schwach ausgeprägt.
Die Ausbildung von Mischformen zwischen diesen Haupttypen lässt sich auf die große Vielfalt glattmuskulärer Funktionsabläufe in unterschiedlichen Organsystemen zurückführen *[Golenhofen 1997, S. 123 ff.]*. Speziell der glatte Gefäßmuskel, an dem in dieser Arbeit die myogene Reaktion untersucht werden soll, zeichnet sich durch Charakteristika beider Typen aus: einerseits findet man die Ausbildung eines spontanen myogenen Tonus, andererseits wird der Muskeltonus durch nervale Einflüsse überlagert. Es liegen also sowohl myogene als auch neurogene Komponenten des Gefäßmuskeltonus vor.

1.2.2 Die Membrandepolarisation

Es wurde durch eine Vielzahl von fundierten Untersuchungen an Gefäßen unterschiedlicher Gefäßgebiete gezeigt, dass als Reaktion auf eine Erhöhung des transmuralen Drucks die oben beschriebenen vasomotorischen Phänomene der myogenen Reaktion von einer Membrandepolarisation der glatten Muskelzellen begleitet wurden *[z. B. Harder 1984; Daut et al. 1994; Wesselmann et al. 1997; Knot und Nelson 1998; Jaggar 1998; Gokina und Osol 2002; Hill und Kotecha 2005]*.
In Untersuchungen an isolierten glatten Muskelzellen mit der patch-clamp-Methode wurde die Existenz von nichtselektiven, für Na^+-, K^+- und Ca^{2+}-Ionen durchlässigen Kationenkanälen nachgewiesen, deren Aktivität durch Dehnung gesteigert werden kann *[Davis et al. 1992; Wu und Davis 2001]*. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch andere Kanäle, wie zum Beispiel spannungsabhängige Kalziumkanäle und kalziumaktivierte Kaliumkanäle, durch Dehnung aktivierbar sind *[Kirber et al. 1992; Dopico et al. 1994; McCarron et al. 1997]*. Auf diese Ergebnisse stützen sich verschiedene, in den folgenden Abschnitten beschriebene Hypothesen zum Mechanismus der im Rahmen der myogenen Antwort beobachteten druckinduzierten Membrandepolarisation.

1.2.2.1 Nichtselektive Kationenkanäle

Liegt eine Aktivitätssteigerung nichtselektiver Kationenkanäle vor, so hat dies eine Vergrößerung des Einwärtsstroms positiv geladener Ionen zur Folge. Somit wird eine Depolarisation der Plasmamembran bewirkt *[Welsh et al. 2000]*.

Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass Mitglieder von Ionenkanälen der TRP-Superfamilie („transient receptor potential“) in glatten Muskelzellen, die teilweise stark in ihren funktionellen Eigenschaften wie Permeabilität, Selektivität und Aktivierungsmechanismen differieren, an der Einstellung des Membranpotentials und auch an der Kalziumhomöostase beteiligt sind. Die meisten TRP-Kanäle sind mehr oder minder permeabel für Kalziumionen. Eine Ausnahme bilden TRPM4 und TRPM5, welche lediglich monovalente Kationen leiten und somit für Kalzium impermeabel sind, jedoch offenbar durch einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration aktiviert werden *[Nilius et al. 2003; Launay et al. 2002 und 2004]*.

In Untersuchungen an Hirnarterien der Ratte, bei denen die Expression des TRPC6- bzw. TRPM4-Kanals, nichtselektiver Kationenkanäle, durch Oligodeoxynukleotide vermindert wurde, konnte gezeigt werden, dass sich durch diese Maßnahme die Ionenströme an isolierten Myozyten verminderten, was durch eine verringerte Ausbildung des myogenen Tonus sowie eine abgeschwächte druckinduzierte Membrandepolarisation begleitet war *[Welsh et al. 2002; Earley et al. 2004 und 2007]*. Gegen ihre Beteiligung spricht jedoch der Widerspruch zwischen dem Befund, dass extrazelluläre Na^+-Ionen für die Ausbildung der myogenen Reaktion nicht essentiell sind *[Nelson et al. 1997; Watanabe et al. 1996]* und dem Ergebnis, dass Na^+-Ionen die Hauptträger des Kationeneinwärtsstroms durch nichtselektive Kationenkanäle sind *[Setoguchi et al. 1997]*.

Eine Rolle in der druckinduzierten Membrandepolarisation wird auch Ionenkanälen zugeschrieben, die durchlässig für Li^+-Ionen, Protonen und vor allem für Na^+-Ionen sind, den Degenerin/epithelialen Natriumkanälen (DEG/ENaC). Eine Expression dieser Kanäle wurde für diverse Spezies und Zelltypen, so auch für glatte Gefäßmuskelzellen nachgewiesen *[Mano et al. 1999; Kellenberger et al. 2002; Drummond et al. 2004]*. In Untersuchungen an Nierenarterien der Ratte, bei denen die Aktivität von ENaC durch Amilorid und Benzamil geblockt wurde, konnte gezeigt werden, dass die druckinduzierte Vasokonstriktion glatter Gefäßmuskelzellen vermindert beziehungsweise aufgehoben wurde, jedoch nicht die Vasokonstriktion per se *[Jernigan et al. 2005 und 2006; Drummond et al. 2008]*. Eine anteilige Rolle als transformierender Sensor in der druckinduzierten Kontraktionskaskade steht somit für diese Kanäle zur Diskussion.

Die Bedeutung nichtselektiver Kationenkanäle für die Ausbildung der myogenen Reaktion ist auf Grund der zum Teil widersprüchlichen Befunde jedoch noch nicht abschließend geklärt.

1.2.2.2 Spannungsabhängige Kalziumkanäle

Die Aktivierung dieser Kanäle kann ebenfalls zu einer Depolarisation der Plasmamembran durch einen Einstrom positiver Ladungen führen. Bei einer vollständigen Blockade spannungsabhängiger Kalziumkanäle in Hirnarterien von Ratten und Kaninchen zeigte sich jedoch, dass zwar die myogene Reaktion verhindert werden konnte, es aber dennoch zu einer Membrandepolarisation kam *[Knot und Nelson 1995; Knot und Nelson 1998]*. Eine ursächliche Beteiligung spannungsabhängiger Kalziumkanäle an der druckinduzierten Membrandepolarisation wurde damit zumindest an den untersuchten Gefäßen ausgeschlossen. Auf ihre essentielle Bedeutung für die Ausbildung der myogenen Reaktion, belegt in den genannten Arbeiten, wird in Kapitel 1.2.3 näher eingegangen.

1.2.2.3 Kalziumabhängige Kaliumkanäle

Bei kalziumabhängigen Kaliumkanälen handelt es sich um ligandgesteuerte und spannungsgesteuerte Kanäle, deren Aktivität sich durch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Ionenkonzentration erhöht. Zudem können sie auch durch eine Membrandehnung aktiviert werden. Unter physiologischen Bedingungen führt die Aktivierung dieser Kanäle durch einen gesteigerten Kaliumausstrom zu einer Hyperpolarisation, was als hemmender Einfluss auf die myogene Reaktion zu betrachten ist. Als gesicherter Fakt gilt der Kalziumanstieg in den glatten Muskelzellen während der myogenen Reaktion. Entsprechend wurde angenommen, dass die physiologische Bedeutung dieser Kanäle im Rahmen der myogenen Reaktion eine Hyperpolarisation und damit das Schließen von spannungsabhängigen Kalziumkanälen ist. Diese Situation könnte als negativer Feedbackmechanismus gesehen werden, womit den kalziumabhängigen Kaliumkanälen eine wesentliche Bedeutung bei der Kontrolle des Kalziumeinstroms zukommt *[Brayden und Nelson 1992; Knot et al. 1998; Brenner et al. 2000]*. Widersprüchliche Resultate erbrachten jedoch Untersuchungen an Rattenarterien mit verschiedenen Hemmern dieser Kanäle: Iberiotoxin in Hirnarterien verstärkte sowohl die myogene Reaktion als auch die begleitende Membrandepolarisation signifikant *[Knot et al. 1998]*, während Charybdotoxin an Mesenterialarterien einen gegenteiligen Effekt zeigte *[Wesselmann et al. 1997]*.

Tetraethylammonium dagegen veränderte die myogene Reaktion kleiner Skelettmuskelarterien nicht *[Watanabe et al. 1996]*.

Jüngste Untersuchungen glatter Muskelzellen von Hirn- und Cremasteraterien der Ratte zeigten eine signifikant geringere Leitfähigkeit von kalziumabhängigen Kaliumkanälen in Cremasterarterien. Weiterhin wurde in Cremasterarterien eine kleinere Menge der für die Beta-1-Untereinheit kodierenden mRNA, eine kleinere Gesamtproteinmenge der kalziumabhängigen Kaliumkanäle sowie ein verringerter Quotient der Beta-1 zur Alpha-1-Untereinheit kalziumabhängiger Kaliumkanäle festgestellt. Diese Befunde können eine Erklärung für die Beobachtung sein, dass in Cremasterarterien die druckinduzierte Depolarisation in Anwesenheit von Iberiotoxin abgeschwächt ist und liefern starke Hinweise für die Vermutung, dass kalziumabhängige Kaliumkanäle in verschiedenen Gefäßen auf unterschiedliche Art und Weise an der myogenen Reaktion beteiligt sind *[Yang und Hill 2009]*.

Eine endgültige Beurteilung der Rolle dieser Kanäle für die Ausbildung der myogenen Reaktion lassen die beschriebenen gegensätzlichen Resultate damit bisher nicht zu.

1.2.2.4 Chloridkanäle

Unter physiologischen Bedingungen hat eine erhöhte Leitfähigkeit von Chloridkanälen glatter Gefäßmuskelzellen eine Verschiebung negativer Ladungen aus der Zelle heraus und somit eine Depolarisation der Plasmamembran zur Folge. Die Ergebnisse folgender Untersuchungen an kleinen Hirnarterien der Ratte wurden als Hinweis auf die Beteiligung von Chloridkanälen an der myogenen Reaktion gedeutet: zum einen wurde gezeigt, dass verschiedene Chloridkanalblocker keinen Effekt auf den Gefäßdurchmesser und das Membranpotential bei einem Druck von 20 mmHg hatten, jedoch bei höheren Drücken (80 mmHg) sich sowohl das Membranpotential als auch der Gefäßdurchmesser veränderten *[Nelson et al. 1997]*. Zum anderen konnte während der Ausbildung des druckabhängigen myogenen Tonus ein Chloridionen-Ausstrom gemessen werden, der nach Applikation von Chloridkanalblockern (Tamoxifen) sistierte *[Doughty und Langton 2001]*. Auch eine Beteiligung von volumenregulierten Chloridkanälen in glatten Muskelzellen von Gefäßen wird diskutiert *[Yamazaki et al. 1998]*. In Organpräparaten hydronephrotischer Nieren hingegen konnte in afferenten Arteriolen die Unabhängigkeit der myogenen Reaktion von Chloridkanälen gezeigt werden *[Takenaka et al. 1996]*. Eine endgültige Aussage über die Beteiligung von

Chloridkanälen an der Ausbildung der myogenen Reaktion konnte bisher allerdings noch nicht erfolgen, da zur Zeit kein spezifischer Blocker dieser Kanäle zur Verfügung steht *[Schubert und Mulvany 1999]*.

1.2.3 Intrazelluläre Signaltransduktionswege

1.2.3.1 Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration

Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration in glatten Muskelzellen als Folge der Erhöhung des transmuralen Drucks in Gefäßen gilt als gesichert. Dies wurde für Gefäße aus unterschiedlichen Gefäßgebieten nachgewiesen *[z. B. Karibe et al. 1997; D´Angelo et al. 1997; Coats et al. 2001; Jaggar 1998; Wu und Davis 2001; Gokina und Osol 2002]*. Eine Untersuchung mit einem speziellen Protokoll an Hirnarterien der Ratte belegte die Bedeutung des Anstiegs der intrazellulären Konzentration der Ca^{2+}-Ionen für die myogene Reaktion. In den Gefäßen wurde die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration nach Permeabilisierung der Gefäße mittels Ca^{2+}-Puffer konstant gehalten und darauf folgend war im Bereich zwischen 0 und 80 mmHg keine myogene Reaktion mehr auszulösen *[McCarron et al. 1997]*.
Zur Bedeutung des Einstroms extrazellulären Kalziums für die myogene Reaktion liegt eine Vielzahl von Untersuchungen vor. Dabei stellte sich heraus, dass nach Entfernung des extrazellulären Kalziums in Gefäßen aus unterschiedlichen Gefäßgebieten keine myogene Reaktion mehr auszulösen war *[z. B. Hill und Meininger 1994; Wellmann et al. 1996; Reber und Nowicki 1998]*. Diesen Befunden zur Folge gilt es als gesichert, dass das extrazelluläre Kalzium für die myogene Reaktion notwendig ist.
In Anbetracht der oben dargestellten, die myogene Reaktion begleitenden Membrandepolarisation, wurde vermutet, Kalzium gelange über spannungsgesteuerte Kalziumkanäle, welche entweder durch Depolarisation oder direkte Zellmembrandehnung aktiviert werden, in die Zelle *[Davis und Meininger 1992]*. Dementsprechend wurde nach spezifischer Blockade der potenzialgesteuerten Kalziumkanäle keine Ausbildung einer myogenen Reaktion mehr beobachtet *[z. B. Watanabe et al. 1994; Knot und Nelson 1995; Wesselmann et al. 1996; McCarron et al. 1997; Jeppesen und Bek 2003; Hill und Kotecha 2005]*. Außerdem wurde gezeigt, dass dabei ein deutlich verminderter Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration vorliegt *[Karibe et al. 1997; VanBavel et al. 1998; Knot und Nelson 1998]*. Im Gegensatz dazu erzeugte Bay K 8644, ein spezifischer Öffner dieser Kanäle, eine Steigerung der vorher nur schwach ausgeprägten myogenen Reaktion von Mesenterialarterien

der Ratte im Bereich von 20 bis 100 mmHg *[Wesselmann et al. 1996]*. Im Hinblick auf diese Befunde stellen potenzialgesteuerte Kalziumkanäle demzufolge den bedeutendsten Einstromweg für Ca^{2+}-Ionen im Rahmen der myogenen Reaktion dar.

Untersuchungen an Nierenarterien des Hundes zeigten eine Erhöhung der Inositoltrisphosphat (IP_3)-Konzentration nach Anhebung des transmuralen Drucks im Bereich von 60 bis 120 mmHg *[Narayanan et al. 1994]*. Die Erhöhung von Inositoltrisphosphat (IP_3) bewirkt die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern und einen damit verbundenen Anstieg der Kalziumkonzentration in der Zelle, welches einen weiteren Mechanismus zur Unterstützung der myogenen Reaktion darstellt.

In verschiedenen Untersuchungen an Mesenterialarterien der Ratte ohne myogene Aktivität *[Karibe et al. 1997]* sowie an mit Cytochalasin D oder Latrunculin A vorbehandelten Gefäßen *[Gokina und Osol 2002]* bzw. nach Applikation von MLC-Kinasehemmern *[Zou et al. 1995]* konnte gezeigt werden, dass unter diesen Umständen nach Druckerhöhung ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Ionenkonzentration ohne nachfolgende myogene Reaktion erfolgte. Dies belegt, dass die Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration allein nicht ausreichend ist, um eine myogene Reaktion zu erzeugen. Weiterhin stellte sich in diversen anderen Untersuchungen heraus, dass kein proportionaler Zusammenhang zwischen der Höhe des Drucksprungs, der Höhe des Kalziumanstiegs und der Stärke der myogenen Reaktion besteht *[D'Angelo et al. 1997; VanBavel et al. 1998]*. Das weist auf eine Modulationsmöglichkeit der myogenen Reaktion über eine Veränderung der Ca^{2+}-Sensitivität des kontraktilen Apparates hin, was in aktuellen Untersuchungen an Hirnarterien der Ratte Bestätigung fand. Es konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer verstärkten druckabhängigen Gefäßreaktion durch Proteinkinase C- und Rho-Kinase-Aktivation ohne weiteren Ca^{2+}-Anstieg kommt *[Lagaud et al. 2002]*. Der Rho-Kinase-Signalweg trägt bekanntermaßen zur Modulation der Ca^{2+}-Sensitivität und somit zur Kontraktionsphase der glatten Muskulatur bei *[Somlyo, A. P. und Somlyo, A. V. 2000; Bolz et al. 2003]*. Nach Anwendung von Rho-Kinase-Inhibitoren wie Y27632 oder HA-1077 an verschiedenen Arterien der Ratte zeigte sich eine dosisabhängige Abschwächung der myogenen Antwort *[Schubert et al. 2002; Okamoto und Nakayama 2004; Gokina und Osol 2005; Jarajapu und Knot 2005, Schubert und Bolz 2008]*.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die myogene Reaktion mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration einhergeht, wobei der Ca^{2+}-Einstrom in die Zelle hauptsächlich durch potentialgesteuerte Kalziumkanäle vermittelt wird. Die Beteiligung weiterer Mechanismen zur Ausbildung der myogenen Reaktion ist jedoch anzunehmen, da der

zuvor beschriebene intrazelluläre Ca^{2+}-Anstieg zwar notwendig, aber allein dafür nicht ausreichend ist.

1.2.3.2 Myosin-Leichtketten-Kinase (MLC-K)

Die Bindung von intrazellulärem Kalzium unter Ausbildung eines Kalzium-Calmodulin-Komplexes mit konsekutiver Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase (MLC-K) spiegelt den klassischen Signaltransduktionsweg der Kontraktion von glatten Muskelzellen wieder. Die Myosin-Leichtketten-Kinase wiederum katalysiert die ATP-abhängige Phosphorylierung des Myosins (LC_{20}), was so zur Muskelkontraktion führt *[Stephens et al. 1992; Golenhofen 1997, Seite 131; Schmidt et al. 2000]*. In Kremasterarteriolen der Ratte konnte gezeigt werden, dass druckabhängig ein Anstieg phosphorylierter Myosin-Leichtketten zu verzeichnen war, und zudem Hemmer der MLC-Kinase die myogene Reaktion inhibieren *[Zou et al. 1995; Zou et al. 2000]*. Ein solcher Befund wurde kürzlich auch an Hirnarterien der Ratte erhoben und zusätzlich gezeigt, dass es dabei zu einem druckabhängigen, Rho-Kinase vermittelten Anstieg der Phosphorylierung der Untereinheit 1 der Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP) kommt. Diese Ergebnisse sind als direkter Hinweis auf die Modulation der Kalziumsensitivität unter Einbeziehung der Rho-Kinase-abhängigen Phosphorylierung von MYPT1 im Rahmen der myogenen Reaktion zu werten *[Johnson et al. 2009]*.

1.2.3.3 Tyrosinkinase

In Hinsicht auf die Beteiligung weiterer intrazellulärer Signalwege an der myogenen Reaktion zeigten Untersuchungen an Hirnarterien der Ratte, dass die myogene Reaktion durch verschiedene Tyrosinkinase-Hemmer vermindert, während sie durch Tyrosinphosphatase-Hemmer verstärkt wurde. Damit wurde eine Beteiligung der Tyrosinkinase an der myogenen Reaktion vermutet *[Masumoto et al. 1997]*. Andere Untersuchungen hingegen zeigten zwar die erwartete Tonuserhöhung unter Tyrosinphosphatse-Hemmern bzw. die Tonusverminderung unter Tyrosinkinase-Hemmern, jedoch blieb die myogene Reaktion, d.h. die akute Reaktion auf eine Druckänderung, erhalten. Hierzu zeigten weiterführende Untersuchungen, dass sowohl die basale intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration unverändert blieb als auch der Anstieg der druckinduzierten intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration keiner

signifikanten Veränderung unterlag *[Spurrell et al. 2000]*. Weiterhin stellte sich heraus, dass die Phosphotyrosinbildung nach einer Druckerhöhung im Verlauf einer Stunde kontinuierlich zunahm, in den ersten Minuten jedoch nicht signifikant anstieg, was im Sinne einer Beteiligung Tyrosinkinase-abhängiger Mechanismen an Langzeitreaktionen nicht jedoch an Kurzzeitreaktionen des Gefäßmuskels auf erhöhten transmuralen Druck, d.h. der myogenen Reaktion, gedeutet wurde *[Murphy et al. 2002]*. Zusammenfassend ist daher nicht von einer Beteiligung der Tyrosinkinase an der akuten myogenen Reaktion auszugehen.

1.2.3.4 Proteinkinase C (PKC)

Eine G-proteinvermittelte Aktivierung der Phospholipase C induziert die Spaltung von membranständigem Phosphatidylinosindiphosphat (PIP_2) in Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG). DAG wiederum aktiviert die Proteinkinase C, welche verschiedene Funktionsproteine phophoryliert und damit deren Aktivität verändert *[Schmidt et al. 2005, Seite 137 ff.]*.

Ein Anstieg des transmuralen Drucks führte bei Untersuchungen an Nierenarterien des Hundes zu einer Konzentrationserhöhung sowohl des Diacylglycerins als auch des Inositoltrisphopsphates (IP_3) *[Narayanan et al. 1994]*. Durch Applikation von Hemmern der Proteinkinase C *[Watanabe et al. 1993; Karibe et al. 1997; Miller et al. 1997; Massett et al. 2002; Johnson et al. 2009]* und auch der Phospholipase C *[Lagaud et al. 2002]* wurde eine Hemmung bzw. eine signifikante Reduktion der myogenen Reaktion an unterschiedlichen Gefäßbetten beobachtet. Außerdem zeigten Untersuchungen an isobaren Gefäßpräparationen eine Membrandepolarisation durch PKC-Aktivatoren sowie DAG-Analoga und Untersuchungen mit der patch-clamp-Methode an Hirnarterien der Ratte einen erhöhten Kationeneinwärtsstrom. Beide, Kationeneinwärtsstrom und Membrandepolarisation, konnten durch PKC-Hemmer aufgehoben werden *[Slish 2002, Earley et al. 2007]*. Aktuelle Untersuchungen an Hirnarterien der Ratte zeigen, dass die Proteinkinase-C-Aktivität eine modulierende Wirkung auf die Aktivität von Transient-Receptor-Potential-Kanälen (TRP) insbesondere des TRPM4 hat, welche die myogene Reaktion beeinflussen (siehe auch 1.2.2.1). Nach der Gabe von Oligonukleotiden, welche die Expression von TRPM4 vermindern, kam es zu einer Reduktion TRPM4-typischer Kationenströme als auch herabgesetzter druckinduzierter Depolarisation und Vasokonstriktion. Somit ist TRPM4 als eine molekulare Zielstruktur der Proteinkinase C anzusehen *[Earley et al. 2007]*.

Wie bereits beschrieben ergab die Hemmung der Proteinkinase-C eine Aufhebung bzw. Abschwächung der myogene Rekation von Arterien aus verschiedenen Gefäßbetten, in vielen Fällen jedoch ohne signifikante Auswirkung auf die druckinduzierte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration *[Karibe et al. 1997; Wesselmann et al. 2001; Lagaud et al. 2002],* was auf eine bedeutende Rolle der PKC bei der die myogene Reaktion begleitenden Veränderung der Kalziumsensitivität hinweist. Andererseits zeigten Untersuschungen an Koronararterien von Schweinen unter Anwesenheit verschiedener PKC-Hemmer, wie bereits beschrieben, eine Abschwächung der myogenen Reaktion aber auch eine begleitende Verminderung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Diese ging mit einer signifikanten Abschwächung der Ströme über spannungsgesteuerte Kalziumkanäle einher, was auf eine PKC-vermittelte Regulation von spannungsgesteuerten Kalziumkanälen im Rahmen der myogenen Reaktion hinweist *[Korzick et al. 2004]*.
Eine Beteiligung der Proteinkinase C an den intrazellulären Mechanismen der myogenen Reaktion scheint angesichts dieser Ergebnisse als gesichert und vieles deutet darauf hin, dass die Proteinkinase C sowohl als modulierendes Element der Kalziumsensitivität als auch als regulierender Faktor der Membrandepolarisation sowie des Kalziumseinstroms anzusehen ist.

1.2.3.5 RhoA/Rho-Kinase

Die durch ein G-Protein (RhoA) vermittelte Aktivierung der Rho-Kinase hat eine Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLC-P) und deren Deaktivierung zur Folge. Dies führt konsekutiv zur Erhöhung des Anteils der phosphorylierten Regulationsdomäne der Myosin-Leichtketten und zu einer damit verbundenen Stärkung kontraktiler Reaktionen.
Untersuchungen an Mesenterialarterien der Ratte und der A. gracilis des Hamsters ergaben, dass nach Hemmung der Rho-Kinase durch den Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 die myogene Reaktion aufgehoben wurde, jedoch ohne Auswirkungen auf den druckinduzierten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration *[Sorop und VanBavel et al. 2002; Bolz et al. 2003]*.
In Untersuchungen der A. caudalis und A. cerebralis der Ratte hingegen kam es unter Anwesenheit von Y27632 lediglich zu einer Abschwächung der myogenen Reaktion bei gleichzeitigem Anstieg der druckinduzierten intrazellulären Kalziumkonzentration *[Schubert et al. 2002; Gokina et al. 2005; Schubert und Bolz 2008]*. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Rho-Kinase-Hemmung durch Y27632 bei höheren Drücken stärker ausgeprägt ist als

bei niedrigen Druckniveaus, was auf eine druckinduzierte Aktivierung der Rho-Kinase in kleinen Arterien der Ratte hindeutet. Wie weiter oben beschrieben, konnte kürzlich eine Rho-Kinase-abhängige Phosphorylierung von MYPT1 im Rahmen der myogenen Reaktion gezeigt werden *[Johnson et al. 2009]*.
Zusammenfassend präsentiert sich die RhoA/Rho-Kinase als ein wesentlicher Mechanismus zur Regulierung der MLC-P und der Kalziumsensitivität in glatten Muskelzellen kleiner Arterien bei der myogenen Reaktion.

1.2.3.6 Aktin-Zytoskelett

Derzeitige Untersuchungen belegen, dass dem Aktin-Zytoskelett der glatten Gefäßmuskulatur eine essentielle Bedeutung an der Ausbildung der myogenen Reaktion zukommt. Die Kontraktion glatter Muskelzellen ist von einer Umstrukturierung des Zytoskeletts im Sinne einer Aktinpolymerisation begleitet *[Mehta und Gunst 1999; Cipolla et al. 2002; Gokina und Osol 2002; VanBavel et al. 2006]*. In gesonderten Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass speziell der glatte Gefäßmuskel mit einer Aktinpolymerisation als Antwort auf mechanische Belastung im Sinne einer Erhöhung der Wandspannung reagiert. Cytochalasin D oder Latrunculin A bewirken eine Hemmung der Polymerisation, was die Ausbildung der myogenen Reaktion verhinderte *[Cipolla et al. 2002; Gokina und Osol 2002]*.

1.2.3.7 Cytochrom P_{450}-abhängiger Metabolismus der Arachidonsäure; 20-HETE

Der Cytochrom P_{450} (CYP_{450})-abhängige Metabolismus der Arachidonsäure stellt einen weiteren an der myogenen Reaktion beteiligten intrazellulären Mechanismus dar. Hierbei führt eine durch erhöhte Wandspannung ausgelöste Aktivierung der Phospholipase A_2 (PLA_2) zur konsekutiven Aktivierung des CYP_{450}-abhängigen Metabolismus der Arachidonsäure und dem damit verbundenen Anstieg eines ihrer Hauptstoffwechselprodukte, der 20-HETE *[Gebremedhin et al. 2000; Roman 2002]*. An Nierenarterien des Hundes verringerten verschiedene CYP_{450}-Inhibitoren die Stärke der myogenen Antwort, wohingegen die Applikation von 20-HETE eine Membrandepolarisation und Gefäßkontraktion hervorrief *[Kauser et al. 1991]*. Neben der CYP_{450}-Hemmung zeigt auch die Hemmung der Phospholipase A_2 eine verminderte myogene Reaktion, was eine Beteiligung dieses Mechanismus an der myogene Reaktion bestätigt *[Kauser et al. 1991; Imig et al. 1994]*.

Weiterhin wurde gezeigt, dass 20-HETE kalziumabhängige Kaliumkanäle in isolierten Muskelzellen dieser Gefäße durch eine Modulation der Öffnungswahrscheinlichkeit und der Dauer des geöffneten Zustandes inhibiert *[Ma et al. 1993; Gebremedhin et al. 2000]*. Außerdem wird diskutiert, dass die 20-HETE-induzierte Hemmung der kalziumabhängigen Kaliumkanäle durch die aktivierte Proteinkinase C vermittelt wird *[Lange et al. 1997]*. Weiterführend wurde gezeigt, dass die Autoregulation des Blutflusses in Organpräparaten nach Inhibition der 20-HETE-Bildung vermindert war, nicht jedoch nach Hemmung anderer CYP_{450}-abhängiger Metabolite der Arachidonsäure wie der Epoxyeicosatrienoidsäuren (EETs) *[Zou et al. 1994]*. Zusammenfassend ist zu sagen, dass aktuell keine etablierten kausalen Zusammenhänge zwischen der Aktivität des CYP_{450}-Systems, kalziumabhängigen Kaliumkanälen und der myogenen Reaktion existieren. Eine modulierende Wirkung des Cytochrom P_{450}-abhängigen Metabolismus der Arachidonsäure inklusive der 20-HETE an der Ausbildung der myogenen Reaktion ist jedoch wahrscheinlich.

1.3 Aufgabenstellung

Eine Vielzahl der bisherigen Untersuchungen wurde bei konstantem Druck durchgeführt, der mit nur einem Sprung auf ein neues Niveau verändert wurde. Physiologisch liegt jedoch ein sich ständig ändernder Druck vor, was einer Pulsation entspricht. Pulsierender Druck hat im Vergleich zu konstantem Druck eine eigenständige Wirkung auf kleine Arterien.

Gesichert ist, dass pulsatiler Druck die myogene Reaktion kleiner Arterien auf unterschiedliche Weise modulieren kann *[VanBavel 1998; Seow 2000; Bakker et al. 2004; Loutzenhizer et al. 2006]*. In Untersuchungen an Cremasterarterien in Organkultur konnte gezeigt werden, dass pulsatiler Druck das einwärts gerichtete Remodelling-Verhalten dieser Arterien reduzierte und mit einer Dilatation einherging *[Bakker et al. 2004]*. In Untersuchungen bei denen renale Arterien der Ratte pulsatilen Drücken mit unterschiedlichen Frequenzen ausgesetzt wurden, zeigte sich eine myogene Autoreaktion. Die Ausprägung der myogenen Reaktion war bei diesen Versuchen abhängig von der Höhe des Spitzendrucks bzw. des systolischen Drucks des pulsatilen Drucks *[Loutzenhiser et al. 2004 und 2006]*. Ähnliche Befunde wurden für die A. caudalis der Ratte erhoben *(Burmeister und Schubert, unveröffentlichte Befunde)*. Insgesamt ist über die myogene Reaktion unter pulsatilem Druck jedoch wenig bekannt, insbesondere über die daran beteiligten Mechanismen.

Momentan wird versucht, die sich wechselseitig beeinflussenden Signaltransduktionswege der myogenen Reaktion auch unter Berücksichtigung einer Druckpulsation zu verstehen. Kalzium nimmt hierbei eine Schlüsselrolle in der Signalkaskade der myogenen Reaktion ein *[Knot und Nelson 1995; Knot und Nelson 1998; Hill und Kotecha 2005]*. Hinzu kommen Mechanismen der Modulationen der Kalziumsensitivität. Die Modulation des RhoA/Rho-Kinase-Transduktionsweges und der damit verbundene Aktivierungszustand der Myosin-Leichtketten-Phosphatase *[Somlyo, A. P. und Somlyo, A. V. 2000; MacDonald und Haystead 2001]*, der PKC sowie der CYP_{450}-abhängige Metabolismus der Arachidonsäure und eines ihrer Hauptstoffwechselprodukte, die 20-Hydroxyeicosatetraensäure (20-HETE), einem potenten Vasokonstriktor von glatten Muskelzellen *[McGiff und Quilley 1999; Sun et al. 2000; Fleming 2001; Huang und Kaley 2005]* gehören dazu.

In der vorliegenden Arbeit soll die Hypothese untersucht werden, dass die myogene Reaktion durch pulsatile Drücke moduliert wird und es soll untersucht werden, welche Mechanismen diesem Vorgang zu Grunde liegen.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmodelle

Zu Untersuchungszwecken in vitro wird das komplexe Blutversorgungssystem des intakten Organismus häufig auf Gefäßpräparate reduziert. Bei den Gefäßpräparaten bedeutet dies eine Vereinfachung des Systems auf drei funktionelle Bestandteile: das Endothel, die freien Nervenendigungen und die glatten Muskelzellen. Bei der Untersuchung von Gefäßpräparaten unterscheidet man so genannte isometrische und isobare Präparate d.h. die Messungen werden jeweils unter isometrischen bzw. unter isobaren Versuchsbedingungen durchgeführt. Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden an isobaren Gefäßpräparaten vorgenommen.

2.2 Material

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden normotensive Ratten vom Wistar-Kyoto-Stamm (WKY) eingesetzt, wobei ausschließlich männliche Versuchstiere im Alter von 16-25 Wochen und einem Gewicht von 350-400 g Verwendung fanden. Die Tiere wurden in 30 x 50 cm großen Käfigen bei einer Raumtemperatur von 22°C gehalten, wobei jedem Tier ein permanenter Zugang zu Futter und Wasser gewährleistet wurde. Die Tötung der Versuchstiere erfolgte durch mechanische Betäubung und anschließende Durchtrennung der Halswirbelsäule mit entsprechend sofortigem Todeseintritt.

2.3 Methoden

2.3.1 Die Präparation der kleinen Arterien

In dieser Arbeit fanden zwei kleine Arterien Verwendung, die A. gracilis und die A. caudalis. Nach dem Entfernen des Fells am Unterschenkel wurde dieser im Hüftgelenk abgesetzt und in einer gekühlten Präparierkammer fixiert wo die Entnahme der A. gracilis erfolgte. Die A. gracilis ist ein Abgang der A. femoralis und verläuft zunächst oberflächlich direkt unter der

Muskelfaszie und zieht dann unter dem M. gracilis in die Tiefe. Ihr Durchmesser beträgt bei voller Relaxation zwischen 200 und 300 µm. Für die Isolierung der kleinen Schwanzarterie (A. caudalis) wurde der Rattenschwanz zunächst abgetrennt, die Haut abgezogen und der proximale Anteil des Schwanzes ebenfalls in eine gekühlte Präparierkammer verbracht und dort fixiert. Die paarig angelegte kleine Schwanzarterie verläuft in der Tiefe des zentralen Gefäßkanals parallel zur Hauptarterie des Schwanzes und hat in voll relaxiertem Zustand einen Durchmesser von 250 bis 320 µm.

Die Präparation der kleinen Arterien fand in einer gekühlten Präparierkammer bei einer Temperatur von 4°C und einem pH-Wert von 7,3 in einer physiologischen Salzlösung folgender Zusammensetzung statt: 145 mM NaCl; 4,5 mM KCl; 1,2 mM NaH_2PO_4; 1,0 mM $MgSO_4$; 0,1 mM $CaCl_2$; 0,025 (Na)EDTA und 5 mM HEPES. Als Präparationswerkzeuge dienten zwei feine Pinzetten (Dumont Nr. 5) und eine Irisschere.

Wie schon beschrieben wird die A. gracilis von einer Muskelfaszie bedeckt, welche mit der Pinzette leicht angehoben und mit Hilfe der Schere entfernt wurde. In direkter Nachbarschaft zur Arterie verläuft die V. gracilis, die zusammen mit der Arterie von Fett und Bindegewebe umgeben ist. Üblicherweise wurde der Teil der A. gracilis verwendet, der proximal des M. gracilis verläuft. Gelegentlich war es nötig, auch Anteile des Gefäßes zu verwenden, die unter dem M. gracilis verliefen, da häufig Gefäßabgänge in den proximalen Bereichen zu finden waren. Für die Versuche konnten nur Gefäßabschnitte ohne Abgänge genutzt werden, um einen Fluss im Inneren der Gefäße ausschließen zu können. Für die Gefäßpräparation unter dem Muskel wurde der Muskel in seinem Verlauf ober- und unterhalb des Gefäßes durchtrennt, der zu entfernende Anteil mobilisiert und verworfen. Anschließend wurde die Vene durchtrennt und vorsichtig zusammen mit Fett- und Bindegewebe von der Arterie entfernt.

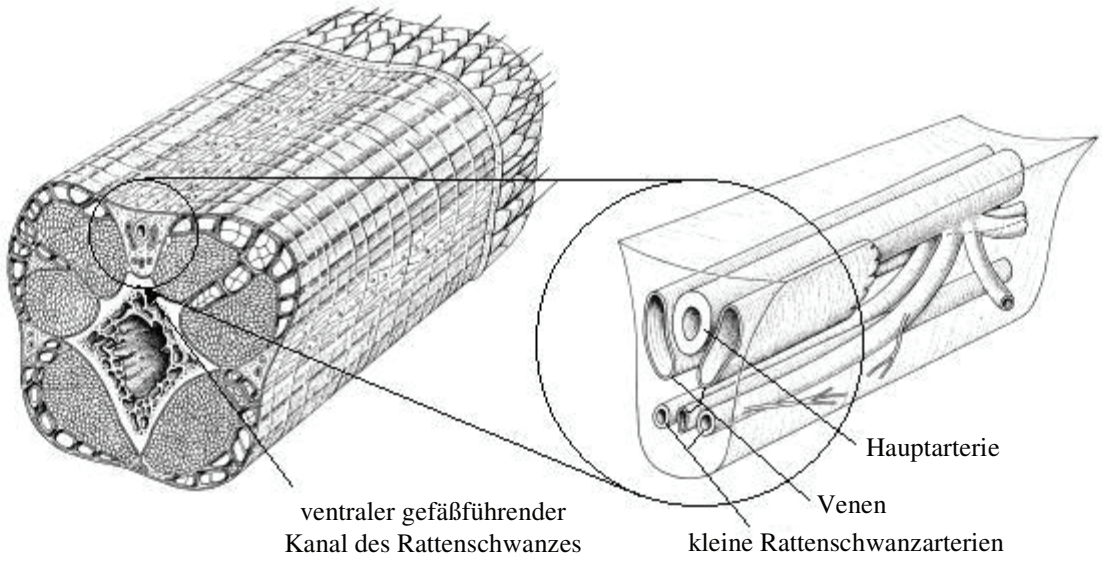

Abbildung 2.1: *Schematische Darstellung des ventralen gefäßführenden Kanals des Schwanzes der Ratte (modifiziert nach Anschütz und Schubert, 2004)*

Die Eröffnung des gefäßführenden Kanals des Rattenschwanzes (siehe Abb. 2.1) erfolgte durch Entfernung des ihn bedeckenden Bindegewebes, so dass darunter die große Schwanzarterie sichtbar wurde. Dieses Gefäß wurde anschließend proximal durchtrennt und nach Anheben durch Schnittsetzung entlang seiner Unterkante mobilisiert und zurückgeklappt. Nach Entfernung der beiden darunterliegenden Venen wurden die beiden kleinen Schwanzarterien sichtbar, zwischen denen sich noch eine weitere Vene befindet, die zur Gewährleistung eines freien Präparationsfeldes vorsichtig herausgetrennt wurde.
Die Entfernung der die Arterie umgebenden Strukturen bedurfte einer äußerst vorsichtigen Präparation, da schon kleinste Berührungen mit den Präparationsinstrumenten, insbesondere Kräfte, die in longitudinaler Richtung wirken, deren kontraktile Eigenschaften beeinträchtigen. Um die Dichtigkeit des Gefäßes im späteren Versuch zu gewährleisten, musste auf Gefäßabgänge geachtet und ein geeigneter Gefäßabschnitt gewählt werden. Die frei liegende Arterie (A. gracilis oder A. caudalis) wurde proximal und distal des freipräparierten Bereichs durchtrennt, wobei die Gefäße sich auf circa 50% der Ausgangslänge in situ verkürzten. Daraufhin konnte sie in die vorbereitete Messkammer überführt werden.

2.3.2 Einspannen des Präparates in die Messkammer

In der Messkammer befand sich eine physiologische Versuchslösung folgender Zusammensetzung: 120 mM NaCl; 4,5 mM KCl; 1,2 mM NaH_2PO_4; 1,0 mM $MgSO_4$; 1,6 mM $CaCl_2$; 0,025 (Na)EDTA; 5,5 mM Glukose; 26 mM $NaHCO_3$ und 5 mM HEPES mit einem pH-Wert von 7,4.

Während des gesamten Einspannvorganges des Gefäßes wurde die Messkammer gekühlt. In der Messkammer befanden sich zwei, durch spezielle Halterungen fixierte, gebogene Glaspipetten, deren fein ausgezogene Spitzen einander gegenüberstehen. Unter Zuhilfenahme eines Ziehgerätes (Narishige) wurden diese Pipetten aus dickwandigen Borosilikatkapillaren (WPI) von 2 mm Durchmesser hergestellt, indem sie in der Mitte erhitzt und auf einen Durchmesser von etwa 180 µm ausgezogen wurden. Der fein ausgezogene Bereich in der Mitte wurde durchtrennt und die dabei entstandenen scharfen Spitzen über einem Heizwendeldraht abgerundet, um das Risiko einer Beschädigung des empfindlichen Gefäßes beim Aufziehen auf die Pipette zu minimieren.

Zunächst wurde das Gefäß auf eine der beiden Pipetten aufgezogen und mit Hilfe zweier ophthalmologischer Fäden (Prolene, Ethicon; 10-0) befestigt. Das bei der Durchtrennung des Gefäßes verklebte freie Ende wurde vorsichtig mit zwei Pinzetten geöffnet. Das Gefäß wurde mit physiologischer Versuchslösung durchspült, um es vom noch enthaltenen Blut zu befreien. Das freie Ende wurde dann auf die zweite Pipette aufgezogen und dort mit zwei weiteren Fäden befestigt. Anschließend wurde die Messkammer mit dem Gefäß auf einen Mikroskoptisch gebracht und dort mit Schrauben fixiert.

2.3.3 Durchführung der Messung

Der zu bestimmende Parameter zur Charakterisierung der kontraktilen Gefäßfunktion war der innere Durchmesser des Gefäßes. Die Messung des Durchmessers erfolgte mit Hilfe der videomikroskopischen Darstellung des Gefäßes, wobei das Gefäß unter Verwendung eines Lichtleiterkabels durchleuchtet und über ein inverses Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) und eine an das Mikroskop montierte Kamera mit Hilfe einer Frame-Grabber Karte auf einem Computermonitor abgebildet wurde. Ein spezielles Messprogramm ermittelte den Durchmesser aufgrund der Kontrastunterschiede an den Gefäßwänden. Die Gefäßwände erschienen dunkler als die umgebende Versuchslösung außen bzw. das Gefäßlumen innen und

wurden als Gefäßgrenzen angesehen (siehe Abb. 2.2). Über einen an die Parameter des Gefäßes angepassten Messalgorithmus erfolgte die Bestimmung der inneren und äußeren Gefäßgrenzen, wobei in der vorliegenden Arbeit der innere Gefäßdurchmesser genutzt wurde. Die Kalibrierung des Systems mit Hilfe eines Mikroskopmikrometers ermöglichte eine Bestimmung des Gefäßdurchmessers in µm. Die Frequenz der Messung des inneren Durchmessers lag je nach Aufzeichnungsgeschwindigkeit bei 1 pro Sekunde oder bei 0,5 pro Sekunde. Mit dem hier beschriebenen System ergab sich bei Benutzung eines 10er Objektivs und eines 3,2-fach Projektivs eine Messgenauigkeit von 2 µm pro Bildschirmpixel.
Die Speicherung der so gewonnenen Daten erfolgte automatisch in einem ASCII-File, das nach Versuchende in Microsoft Excel mit Hilfe eines im Institut dafür erstellten Makros verarbeitet wurde. So konnte eine optimale Darstellung der Daten gewährleistet werden, die anhand eines Ausdrucks dokumentiert wurden.

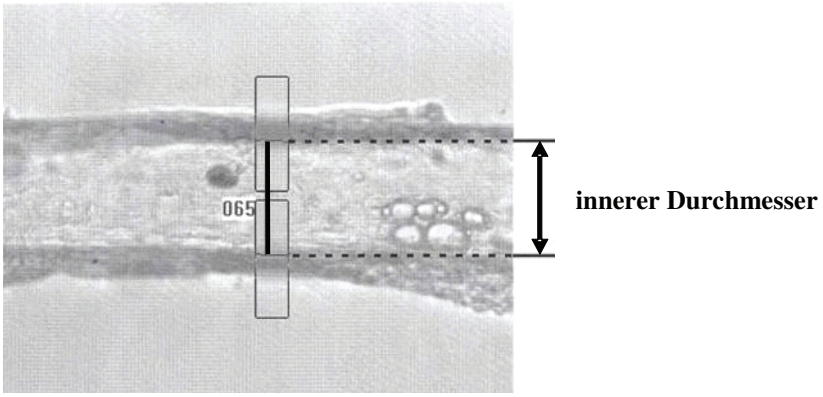

Abbildung 2.2: *Bestimmung des Gefäßinnendurchmessers mittels videomikroskopischer Darstellung.*

2.3.4 Messung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration mit Fura-2

Fura-2 ist ein ratiometrischer fluoreszierender Farbstoff mit den Eigenschaften eines Ca^{2+}-Chelators, der intrazelluläres Kalzium an seine vier Carboxylgruppen bindet. Fura-2 ist sehr selektiv für Kalzium und fast unempfindlich für pH-Schwankungen im physiologischen Bereich. Die Stilbengruppe ist der Chromophor des Fura-2-Moleküls d.h. der Teil, in dem anregbare Elektronen verfügbar sind. Fura-2 wird bei Wellenlängen des Lichts von 340 nm und 380 nm angeregt.
Die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichtes wird bestimmt durch die Konzentration des Fura-2, die Zelldicke, eine Konstante, die die optischen Eigenschaften der Messapparatur zusammenfasst und die Ca^{2+}-Konzentration ($[Ca^{2+}]$). Verwendet man die Ratio, d.h. den Quotienten der Emission nach Anregung bei 340 nm und 380 nm nach Abzug der entsprechenden Hintergrundfluoreszenz, so korreliert dieses Signal ausschließlich mit der Menge des intrazellulären Kalziums. Die Verwendung der Fura-2-Ratio ermöglicht somit die Eliminierung zahlreicher störender Faktoren wie zum Beispiel der Fura-2-Konzentration, von Fokusschwankungen und Raumlichtinterferenzen. Folglich ist Fura-2 für die „quantitative" Bestimmung von Kalziumkonzentrationen über Fluoreszenzemission sehr gut geeignet *[Grynkiewicz 1985]*. Die Änderungen der FURA-2 Ratio in Antwort auf Druckänderungen wurde auf die Änderung der FURA-2 Ratio nach Zugabe von 60 mM KCl normalisiert, um Unterschiede in der Reaktivität individueller Gefäße zu berücksichtigen.
Die Erfassung der Fluoreszenzsignale erfolgte über ein Fluoreszenzmikroskop und einen angeschlossenen Photomultiplier, dessen Signale nach Demultiplexung über einen AD-Wandler in das Programm zur Durchmesserbestimmung integriert wurde.

2.3.5 Versuchsablauf

Nach der Befestigung der Messkammer auf dem Mikroskoptisch (siehe Abb. 2.3) wurde die Kammer kontinuierlich mit Hilfe einer Peristaltikpumpe bei einer Pumprate von 2 ml/min mit Versuchslösung durchspült. In die Zuleitungen zur Messkammer konnten mit Hilfe einer Spritzenpumpe verschiedene Substanzen appliziert werden, die das Gefäß entsprechend immer als Superfusat von der Adventitiaseite her erreichten. Die Pumprate der Spritzenpumpe betrug 20 µl/min, also $^{1}/_{100}$ der Rate der Peristaltikpumpe, welche die Versorgungslösung

bewegte. Alle auf diese Weise applizierten Substanzen erreichten das Gefäß demzufolge mit einer um den Faktor 10^2 verdünnten Konzentration im Vergleich zur Ausgangslösung.

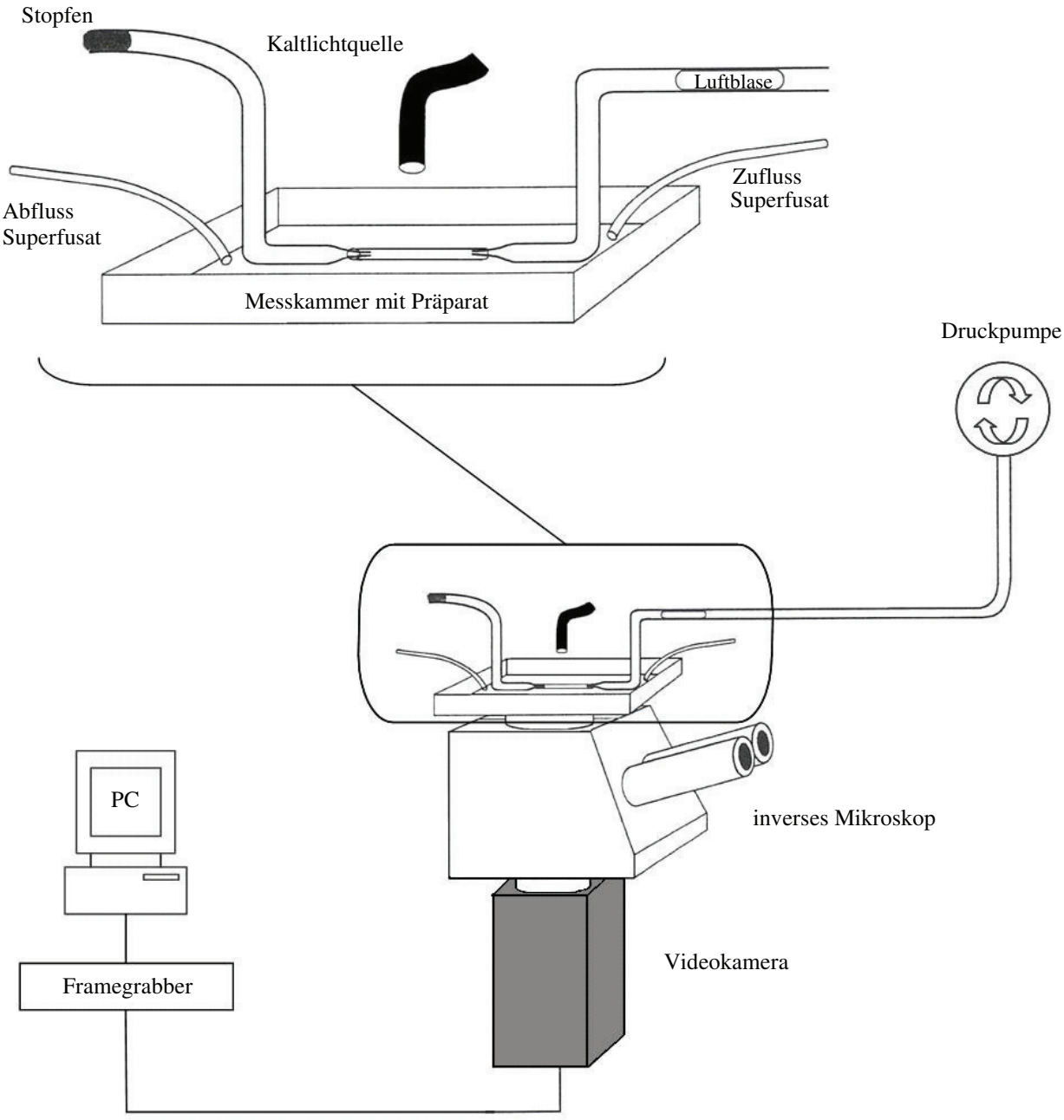

Abbildung 2.3: *Schematische Darstellung des Messaufbaus mit Abbildung der Messkammer mit dem isobaren Gefäßpräparat (modifiziert und geändert nach Anschütz, 2004)*

Die Pipette am proximalen Ende des Gefäßes wurde über ein mit Versuchslösung gefülltes Schlauchsystem mit einer elektronischen Peristaltikpumpe verbunden, mit der der transmurale Druck des Gefäßes verändert werden konnte. Es kam noch eine weitere Möglichkeit der Druckvermittlung auf das Gefäß zur Anwendung. Hierzu wurde die Pipette über ein Schlauchsystem mit einem Flüssigkeitsreservoir in Verbindung gebracht und durch Änderung des Höhenniveaus des Reservoirs eine Variation des transmuralen Druckes erreicht. Durch Kalibrierung der Niveaustufen sowie durch die vor jedem Versuchsbeginn durchgeführte Überprüfung der elektronischen Pumpe wurde es möglich, das Gefäß definierten transmuralen hydrostatischen Drücken auszusetzen. Um einen Fluss der Versuchslösung durch das Gefäß zu verhindern, wurde die Pipette am distalen Ende des Gefäßes mittels eines blinden Schlauchstückes verschlossen. Zur Überprüfung der Strömungsverhältnisse innerhalb des Gefäßes im Versuchsverlauf wurde eine luftgefüllte, waagerecht angebrachte Pipette in das Schlauchsystem eingeführt. Ein Wandern der Luftblase zeigt einen möglicherweise auftretenden Fluss an, was als Abbruchkriterium für das Experiment galt. Ein durch Filtration durch die Gefäßwand verursachter minimaler Fluss, verbunden mit entsprechend geringer Bewegung der Luftblase, wurde toleriert.

Bei Versuchsbeginn wurde das Gefäß einem Druck von 80 mmHg ausgesetzt, wodurch sich dieses sowohl in longitudinaler als auch in radialer Richtung ausdehnte und dadurch einen geschlängelten Verlauf zeigte. Mit Hilfe einer Mikrometerschraube an der Messkammer, welche die Pipette am distalen Ende des Gefäßes bewegte, wurde das Gefäß vorsichtig in longitudinaler Richtung gestreckt, bis es gerade verlief. Das Gefäß nahm dabei wieder die Länge ein, die es in situ, das heißt vor der Verkürzung durch das Durchtrennen, hatte.

Nach der Einstellung des transmuralen Drucks konnte mit der Aufzeichnung des Gefäßdurchmessers begonnen werden. Hierzu wurde das Gefäß circa 20 Minuten unter den jetzt herrschenden Bedingungen belassen. Währenddessen konnte der Temperaturfühler sowie die Elektrode zur pH-Bestimmung in die Messkammer eingebracht werden. Die schrittweise Erhöhung der Temperatur in der Messkammer bis auf konstante 37°C wurde durch einen mit warmem Wasser durchspülten Wärmeaustauscher unter der Messkammer gewährleistet. Im Versuchsverlauf wurde eine Abweichung der Temperatur von 0,5°C in beide Richtungen toleriert. Der tolerierte pH-Bereich betrug 7,4±0,05. Die Konstanthaltung des pH wurde durch tropfenweise Applikation von 1 M HCl bzw. 1 M NaOH in den Vorratsbehälter der Perfusionslösung erreicht, welche mittels eines Magnetrührers durchmischt wurde. Während des Aufwärmvorganges dilatierte das Gefäß in der Regel nahezu vollständig, um dann nach ungefähr 20 Minuten in eine kontraktile Phase überzugehen, welche die Einstellung eines

spontanen myogenen Tonus anzeigte. Zur Stabilisierung des Tonus wurde das Gefäß etwa 60 Minuten unter diesen Bedingungen belassen.

Der myogene Tonus (siehe Formel 1) beschreibt die momentane relative Konstriktion des Gefäßes während des Experimentes, bezogen auf den absolut passiven Zustand in Ca^{2+} freier Versuchslösung bei gleichen Druckverhältnissen und sonst identischen Versuchsverhältnissen. Der myogene Tonus ist mathematisch wie folgt definiert:

$$[\text{Myogener Tonus} = 1 - dia_{akt} / dia_{max}] \quad (1)$$

dia_{max} = maximaler Gefäßdurchmesser in Ca^{2+}-freier Lösung bei gleichem Druck wie zum Zeitpunkt des Experiments, dia_{akt} = aktueller Gefäßdurchmesser zu einem gegebenem Zeitpunkt des Experimentes

Die Entwicklung des beschriebenen spontanen myogenen Tonus des Gefäßes, wobei als Kriterium für ein arbeitsfähiges Gefäß das Erreichen eines Durchmessers von weniger als 85% des bei der initialen Dilatation erreichten Durchmessers galt, war Vorraussetzung für die Fortführung des Experimentes. Am Ende eines jeden Versuchs wurde mittels kalziumfreier Lösung der maximale Gefäßdurchmesser bestimmt. Zur weiteren Überprüfung der Vitalität des Gefäßes wurde am Anfang des Versuchs mit Hilfe der oben beschriebenen Spritzenpumpe durch Gabe von 10^{-7} M Noradrenalin die Kontraktilität der glatten Muskulatur und durch Gabe von 10^{-6} M Acetylcholin die Endothelfunktion getestet. Nach Gabe von 10^{-7} M Noradrenalin wurde eine Kontraktion von mindestens 25% des Ausgangsdurchmessers des Gefäßes, und nach 30 minütigem Auswaschen, nach Gabe von 10^{-6} M Acetylcholin eine maximale Dilatation erwartet. Traten die erwarteten Reaktionen ein und entwickelte sich nach jeweils 30 minütigem Auswaschen der jeweiligen vasoaktiven Substanz wiederum ein spontaner myogener Tonus des Gefäßes, galt dies als bestandener Vitalitätstest und es wurde anschließend mit den Versuchen begonnen. Um die myogene Reaktion zu beurteilen, wurde eine Druckreihe angewandt, welche wie folgt aussah: das Gefäß wurde für 5 Minuten jeweils 40, 80 und 120 mmHg ausgesetzt, nach zehn minütiger Pause Durchführung einer Druckreihe mit oszillierendem Druck mit Mitteldrücken von 40, 80 und 120 mmHg für je 5 Minuten und anschließend Wiederholung der initialen Druckreihe. Erfolgte eine ausreichende myogene Autoregulation und war der myogene Grundtonus stabil, konnte mit dem nächsten Versuchsteil begonnen werden.

Sollte die Bestimmung des intrazellulären Kalziums erfolgen, musste eine erweiterte Vorbereitung des Experiments durchgeführt werden. Es wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM verwendet. Der Azetoxymethylester (AM) verleiht dem Farbstoff die Eigenschaft, die Zellmembran passieren zu können. Intrazellulär erfolgen dann eine durch unspezifische Esterasen vermittelte Spaltung der Esterverbindungen und die Freisetzung des Farbstoffes. Dieser besitzt eine viel geringere Lipidlöslichkeit als die Esterverbindung und kann so kaum in den Extrazellularraum zurückdiffundieren. Nach lichtgeschütztem Auftauen des tiefgefrorenen Fura-2-AM erfolgte das Mischen mit 10 µl DMSO (Dimethylsulfoxid) zur Verbesserung der Löslichkeit der Farbstoffester. Danach wurden 5 µl des Gemisches in Bikarbonat-freie Lösung gebracht und das Gefäß in der Messkammer 60 Minuten mit dieser Lösung lichtgeschützt bei 37°C und physiologischem pH-Wert (7,4) inkubiert. Anschließend erfolgte das 20 minütige Auswaschen der Messkammer mit physiologischer Lösung. Zeigte das Gefäß nach dieser Prozedur weiterhin einen ausreichenden myogenen Tonus, konnte der Versuch gestartet werden.

2.4 Chemikalien

Alle Salze für die oben beschriebenen Versuchs- und Präparationslösungen als auch Acetylcholin und Noradrenalin waren von Sigma. FURA-2-AM war von Molecular Probes und Y-27632 von Calbiochem.

2.3 Statistik

Alle angegebenen Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler (SE) dargestellt. Pro Ratte wurde nur ein Gefäß verwendet, so dass n der Anzahl der Ratten entspricht. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe von SPSS 15.0 für Windows erstellt. Wenn auf Grund unterschiedlicher x-Achsen-Werte der zu vergleichenden Kurven ein üblicher statistischer Test nicht anwendbar war, wurde eine passende Funktion ($y=a*x+b$ bzw. $y=a*x^2+b*x+c$) an die Daten angepasst und anschließend ein statistischer Test der Funktionsparameter durchgeführt. In Abhängigkeit vom Versuchsdesign wurden der T-Test oder eine ANOVA mit Messwiederholung angewendet.

Zur Bestimmung der Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,05$ zugrunde gelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung pulsatilen Drucks auf den Durchmesser kleiner Arterien

Wie in der Einleitung vorgestellt, haben pulsatile Drücke eine eigenständige Wirkung auf den Durchmesser kleiner Arterien. In den dort zitierten Versuchen an der A. caudalis wurde jedoch sowohl die Amplitude als auch der systolische Wert des pulsatilen Drucks geändert. Damit stellt sich die Frage, von welchem dieser beiden Parameter des pulsatilen Drucks die Stärke der beobachteten Kontraktion abhängt. Zur Klärung dieser Frage wurden Versuche durchgeführt, bei denen pulsatile Druckschwankungen von 90 auf 110; 70 auf 110 bzw. 50 auf 110 mmHg gegeben wurden, d.h. der systolische Wert des pulsatilen Drucks wurde fixiert.

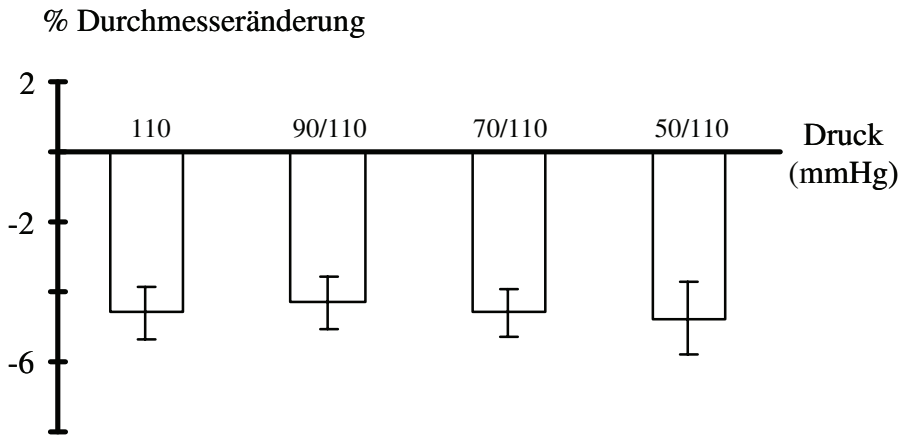

Abbildung 3.1: *Relative Durchmesseränderung der A. caudalis bei konstantem und pulsatilem Druck. Der konstante Druck wurde von 80 auf 110 mmHg in einem Sprung erhöht. Der pulsatile Druck mit einer Frequenz von 1Hz veränderte sich von 90 auf 110, 70 auf 110 bzw. 50 auf. 110 mmHg.*

Unter diesen Bedingungen sind die durch den pulsatilen Druck ausgelösten Kontraktionen gleich groß und stimmen auch mit der bei konstantem Druck durch einen Drucksprung von 80 auf 110 mmHg hervorgerufenen Kontraktion überein (n=8; p=0,80) (Abb. 3.1).

Zur weiteren Charakterisierung der Wirkung des pulsatilen Drucks auf die A. caudalis wurden seine Effekte in einem größeren Druckbereich untersucht. Einerseits wurde konstanter Druck in Sprüngen von 40 über 80 auf 120 mmHg gegeben. Andererseits wurde pulsatiler Druck appliziert, der zwischen 10 und 70, 50 und 110 sowie 90 und 150 mmHg oszillierte, d.h. dessen Mittelwerte dem Wert der Kontrollversuche mit konstantem Druck entsprachen. Im Vergleich zu den bei konstanten Druckwerten erreichten Durchmesserwerten waren hierbei die Gefäßdurchmesser geringer, wenn die Gefäßreaktionen bei pulsatilem Druck auf dessen Mittelwert bezogen werden (n=5; p<0,05) (Abb. 3.2).

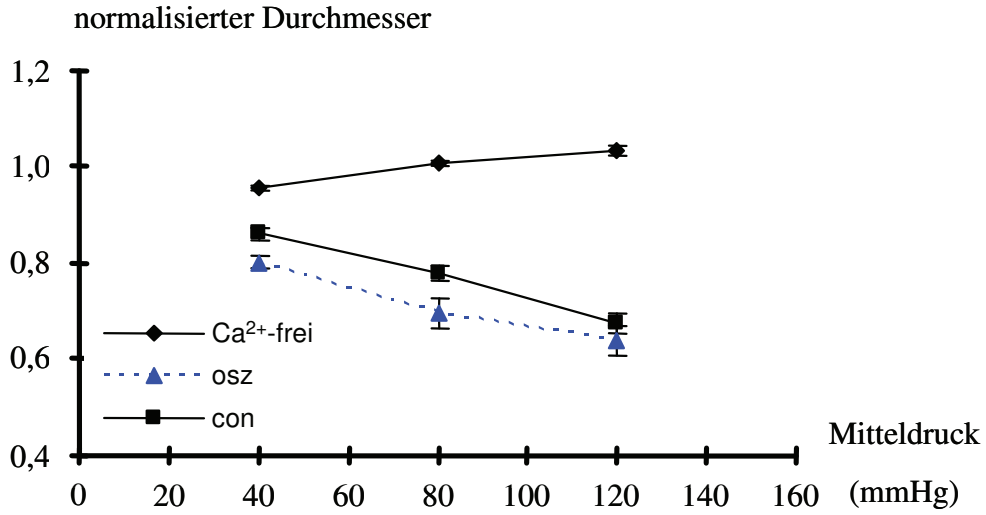

Abbildung 3.2: *Wirkung von pulsatilem Druck mit einer Frequenz von 1Hz auf die A. caudalis. Zum Vergleich mit dem pulsatilen Druck (osz), der in Bezug auf seinen Mittelwert dargestellt ist, sind die Kontrollversuche mit konstantem Druck (con) sowie die passiven Druckeigenschaften (Ca^{2+}-frei) der A. caudalis abgetragen. Der pulsatile Druck oszillierte zwischen 10 und 70, 50 und 110 als auch 90 und 150 mmHg.*

Wenn die dargestellten Daten jedoch so transformiert wurden, dass der pulsatile Druck in Bezug auf seinen systolischen Druckwert dargestellt ist, wobei der pulsatile Druck zwischen 10 und 70, 50 und 110 sowie 90 und 150 mmHg oszillierte, zeigte sich, dass unter diesen Bedingungen die Gefäßreaktionen bei konstantem und pulsatilem Druck gleich waren (n=5; p=0,07 und p=0,27 für die Parameter der linearen Regression) (Abb. 3.3).

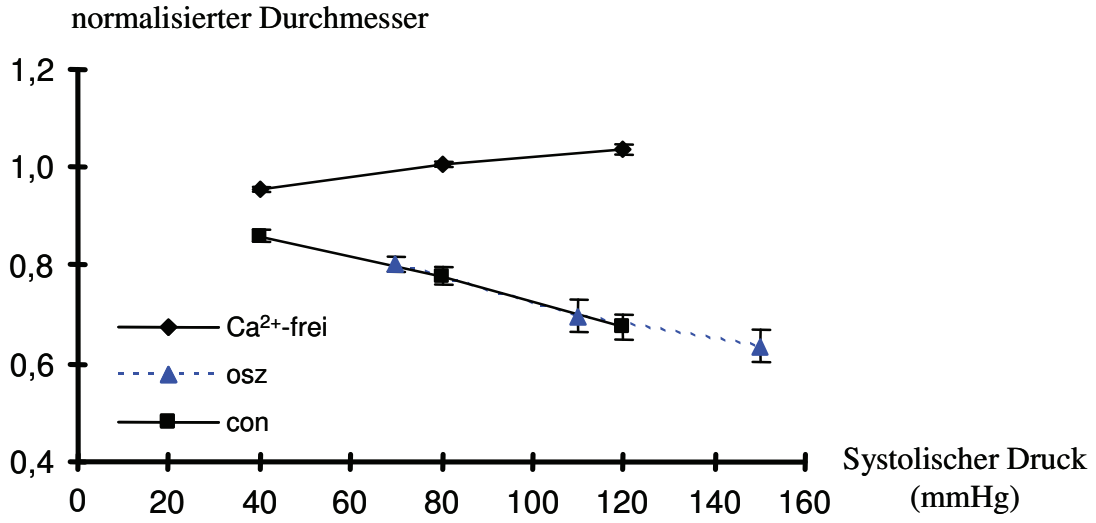

Abbildung 3.3: *Wirkung von pulsatilem Druck mit einer Frequenz von 1Hz auf die A. caudalis. Zum Vergleich mit dem pulsatilen Druck (osz), der in Bezug auf seinen systolischen Wert dargestellt ist, sind die Kontrollversuche mit konstantem Druck (con) sowie die passiven Druckeigenschaften (Ca^{2+}-frei) der A. caudalis abgetragen. Der pulsatile Druck oszillierte zwischen 10 und 70, 50 und 110 als auch 90 und 150 mmHg.*

Weitere Versuche, bei denen der pulsatile Druck zwischen anderen Werten, 20 und 40, 20 und 80 sowie 60 und 120 mmHg oszillierte, bestätigten diese Befunde. Die Gefäßkontraktion bei pulsatilem Druck entsprach der bei konstantem Druck, wenn der pulsatile Druck in Bezug auf seinen systolischen Druckwert dargestellt ist (n=8; p=0,80) (Abb. 3.4).

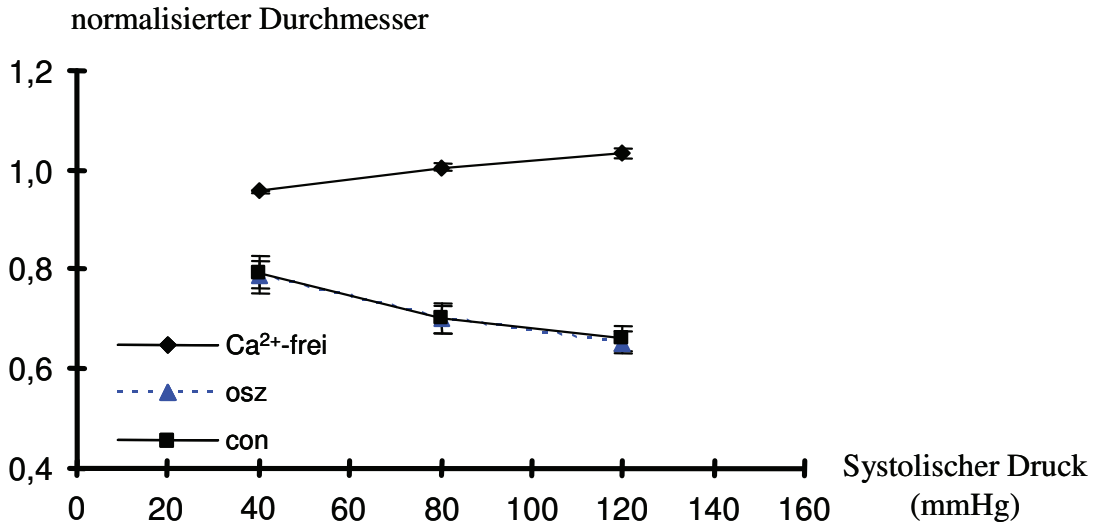

Abbildung 3.4: *Wirkung von pulsatilem Druck mit einer Frequenz von 1Hz auf die A. caudalis. Zum Vergleich mit dem pulsatilen Druck (osz), der in Bezug auf seinen systolischen Wert dargestellt ist, sind die Kontrollversuche mit konstantem Druck (con) sowie die passiven Druckeigenschaften (Ca^{2+}-frei) der A. caudalis abgetragen. Der pulsatile Druck oszillierte zwischen 20 und 40, 20 und 80 als auch 60 und 120 mmHg.*

Zum besseren Verständnis der erhaltenen Daten wurde der Zusammenhang zwischen pulsatilem bzw. konstantem Druck und dem Gefäßtonus bestimmt. Der Gefäßtonus wurde aus den Durchmesserdaten errechnet (siehe Material und Methoden) und drückt den Aktivitätszustand der Gefäße aus. Wie Abbildung 3.5 zu entnehmen ist, gehen ansteigende Druckwerte sowohl bei konstantem als auch bei pulsatilem Druck mit einer Tonuserhöhung der A. caudalis einher. Diese Tonuserhöhung ist bei pulsatilem und konstantem Druck gleich, wenn sich auf die systolischen Werte des pulsatilen Druckes bezogen wurde (n=5; p=0,06 und p=0,87 für die Parameter der linearen Regression).

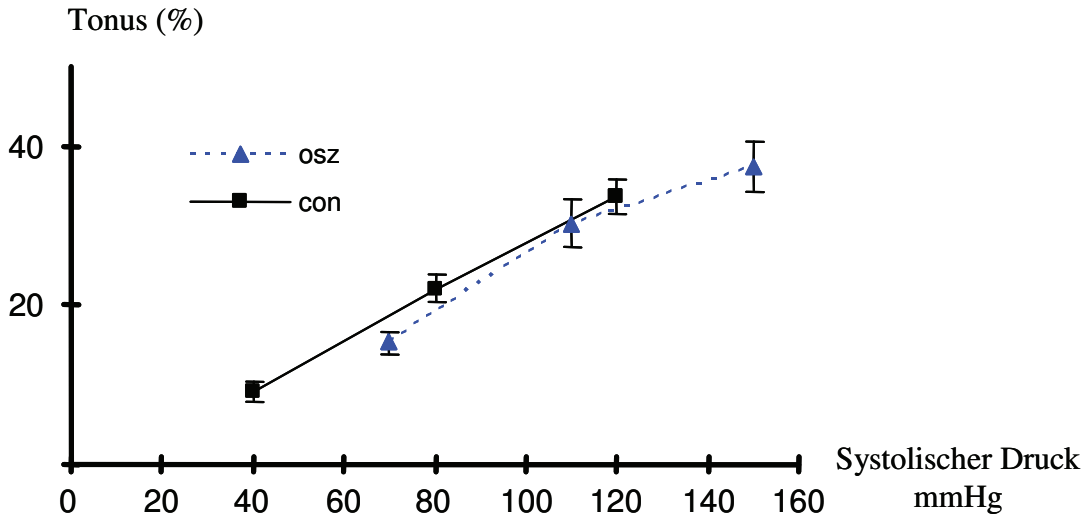

Abbildung 3.5: *Wirkung von pulsatilem Druck mit einer Frequenz von 1Hz auf den Tonus der A. caudalis. Zum Vergleich mit dem pulsatilen Druck (osz), der in Bezug auf seinen systolischen Wert dargestellt ist, sind die Kontrollversuche mit konstantem Druck (con) der A. caudalis abgetragen. Der pulsatile Druck oszillierte zwischen 10 und 70, 50 und 110 als auch 90 und 150 mmHg.*

3.2 Abhängigkeit der intrazellulären Kalziumkonzentration vom pulsatilen Druck (A. caudalis)

Um die Mechanismen besser zu verstehen, die die durch pulsatilen Druck ausgelösten Reaktionen vermitteln, wurde die intrazelluläre Kalziumkonzentration in den glatten Muskelzellen gemessen. In Abbildung 3.6 ist zu sehen, dass auch die intrazelluläre Kalziumkonzentration bei ansteigenden Druckwerten zunimmt. Dabei sind die Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen bei konstantem und pulsatilem Druck gleich, wenn der pulsatile Druck auf seinen systolischen Wert bezogen wird (n=5; p=0,53, p=0,84 und p=0,88 für die Parameter der Regression mit einem Polynom zweiter Ordnung).

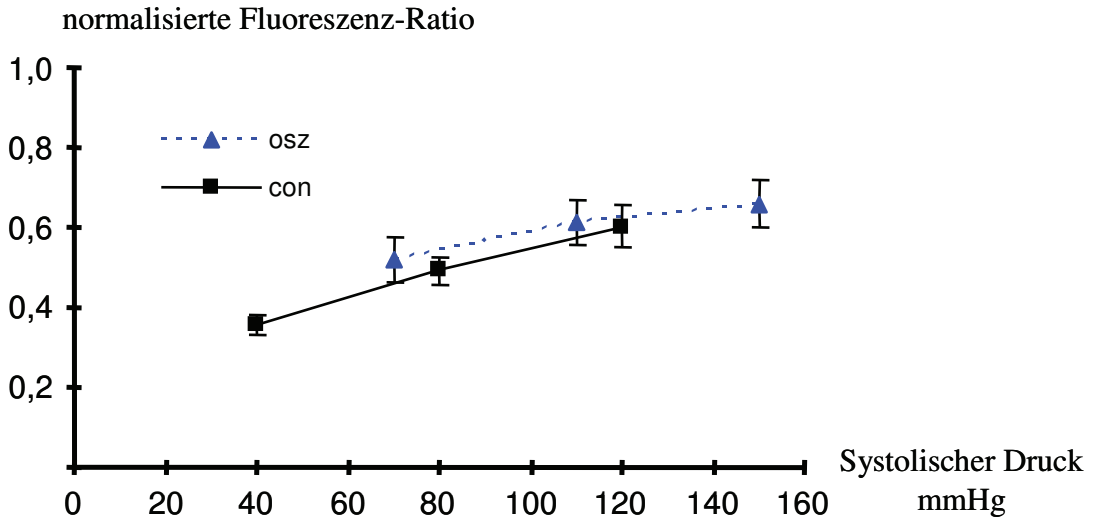

Abbildung 3.6: *Wirkung von pulsatilem Druck auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration der glatten Muskelzellen der A. caudalis bei einer Frequenz von 1Hz. Zum Vergleich mit dem pulsatilen Druck (osz), der in Bezug auf seinen systolischen Wert dargestellt ist, sind die Kontrollversuche mit konstantem Druck (con) der A. caudalis abgetragen. Der pulsatile Druck oszillierte zwischen 10 und 70, 50 und 110 als auch 90 und 150 mmHg.*

Leitet man aus den vorangegangenen Daten den Zusammenhang zwischen der intrazellulären Kalziumkonzentration und dem Tonus der A. caudalis ab, der die Kalziumsensitivität des kontraktilen Apparates anzeigt, stellt man keinen Unterschied zwischen den Reaktionen auf pulsatilen und konstanten Druck fest. So wurde ein Tonus von 25% erreicht bei einem normalisierten Kalzium von 0,51±0,02 bei konstantem und von 0,58±0,05 bei pulsatilem Druck (n=5; p=0,12) (Abb. 3.7).

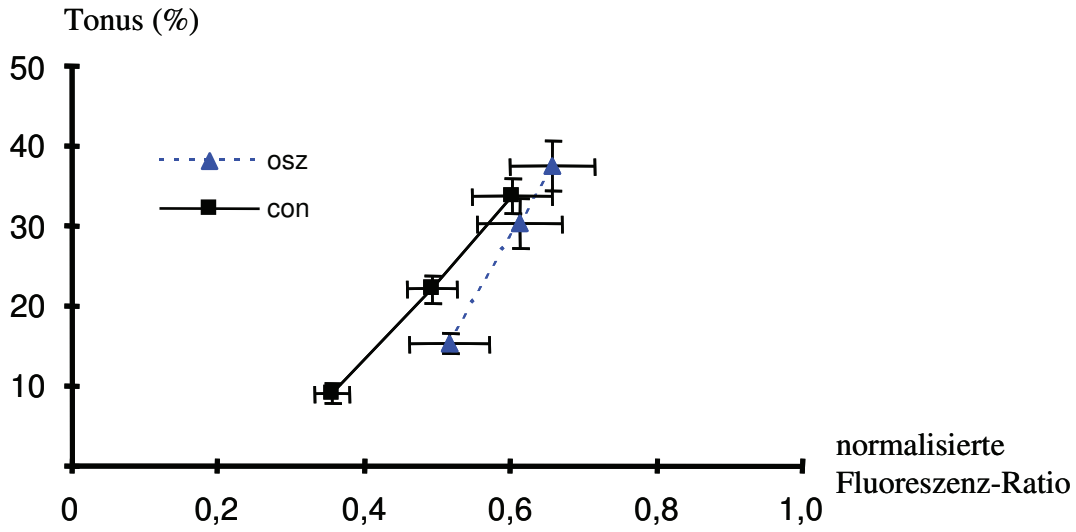

Abbildung 3.7: *Zusammenhang zwischen der intrazellulären Kalziumkonzentration, ausgedrückt als normalisierte Fluoreszenz-Ratio, und dem Tonus der A. caudalis erhalten unter pulsatilem Druck (osz) bei einer Frequenz von 1Hz und konstantem Druck (con).*

Alle bis hierhin dargestellten Ergebnisse basieren auf Experimenten an der A. caudalis. Um herauszufinden, inwieweit die an diesem Gefäß gefundenen Reaktionen allgemeingültig sind, wurde ein zweites Gefäß, die A. gracilis, untersucht.

Wie Abbildung 3.8 zeigt, wurden auch hierbei Sprünge konstanten Drucks von 40 über 80 auf 120 mmHg appliziert. Der pulsatile Druck oszillierte zwischen 10 und 70, 50 und 110 sowie 90 und 150 mmHg. Im Gegensatz zur A. caudalis (siehe Abb. 3.2) zeigt sich kein Unterschied im Vergleich zur Durchmesserreaktion bei konstanten Druckwerten (n=6; p=0,54), wenn die Gefäßreaktionen bei pulsatilem Druck auf dessen Mittelwert bezogen wurden.

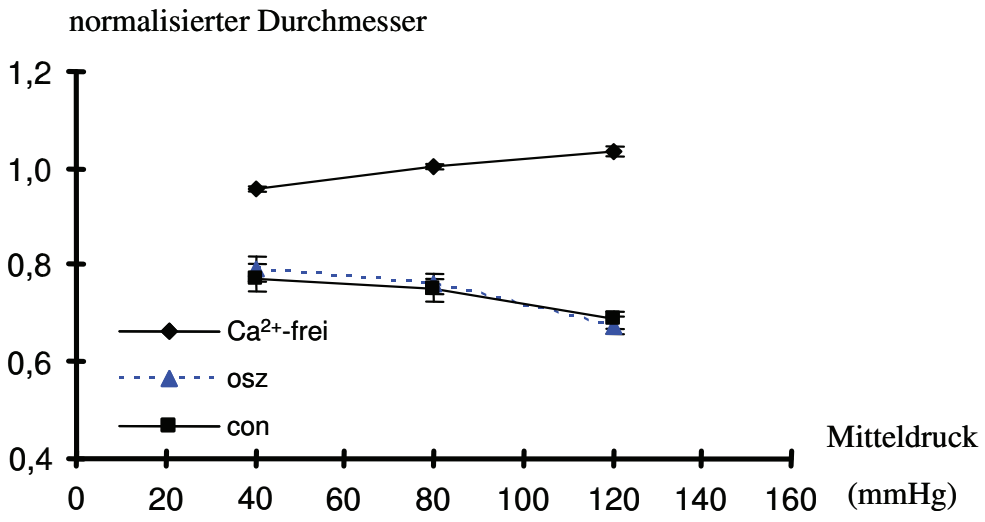

Abbildung 3.8: *Wirkung von pulsatilem Druck mit einer Frequenz von 1 Hz auf die A. gracilis. Zum Vergleich mit dem pulsatilen Druck (osz), der in Bezug auf seinen Mittelwert dargestellt ist, sind die Kontrollversuche mit konstantem Druck (con) sowie die passiven Druckeigenschaften (Ca^{2+}-frei) der A. gracilis abgetragen. Der pulsatile Druck oszillierte zwischen 10 und 70, 50 und 110 als auch 90 und 150 mmHg.*

Weitere Versuche mit pulsatilen Druckwerten, welche zwischen 20 und 40, 20 und 80 sowie 60 und 120 mmHg oszillierten, bestätigten die vorangegangenen Ergebnisse. Es kam zu einer identischen Gefäßreaktion bei konstantem und pulsatilem Druck, wenn der Letzte auf seinen Mittelwert bezogen wurde (n=9; p=0,07 und p=0,21 für die Parameter der linearen Regression) (Abb. 3.9).

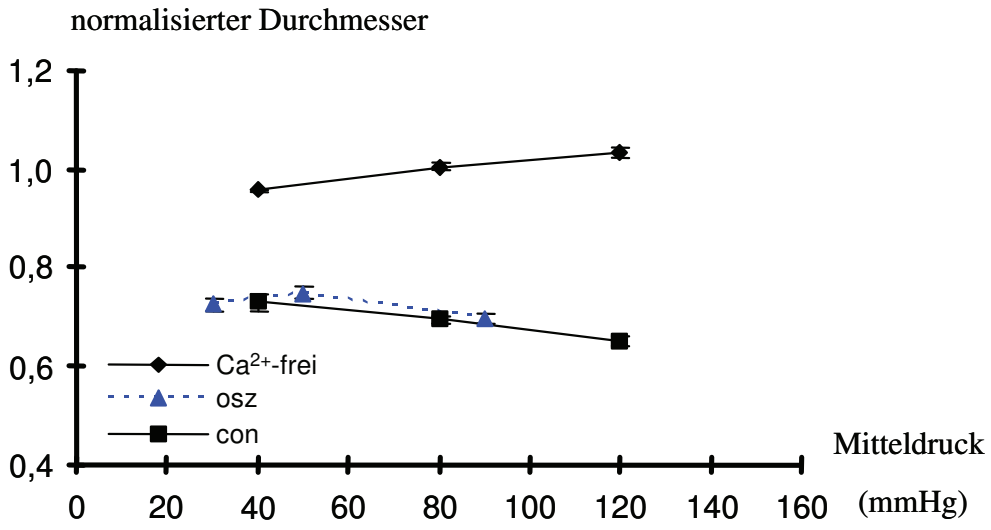

Abbildung 3.9: *Wirkung von pulsatilem Druck mit einer Frequenz von 1 Hz auf die A. gracilis. Zum Vergleich mit dem pulsatilen Druck (osz), der in Bezug auf seinen Mittelwert dargestellt ist, sind die Kontrollversuche mit konstantem Druck (con) sowie die passiven Druckeigenschaften (Ca^{2+}-frei) der A.gracilis abgetragen. Der pulsatile Druck oszillierte zwischen 20 und 40, 20 und 80 als auch 60 und 120 mmHg.*

Wenn jedoch, wie bei der A. caudalis auch dargestellt, der pulsatile Druck auf den systolischen Druckwert bezogen wird, wobei der pulsatile Druck zwischen 20 und 40, 20 und 80 sowie 60 und 120 mmHg oszillierte, waren die Gefäßdurchmesser im Vergleich zu denen bei konstantem Druck größer (n=9; p<0,01) (Abb. 3.10).

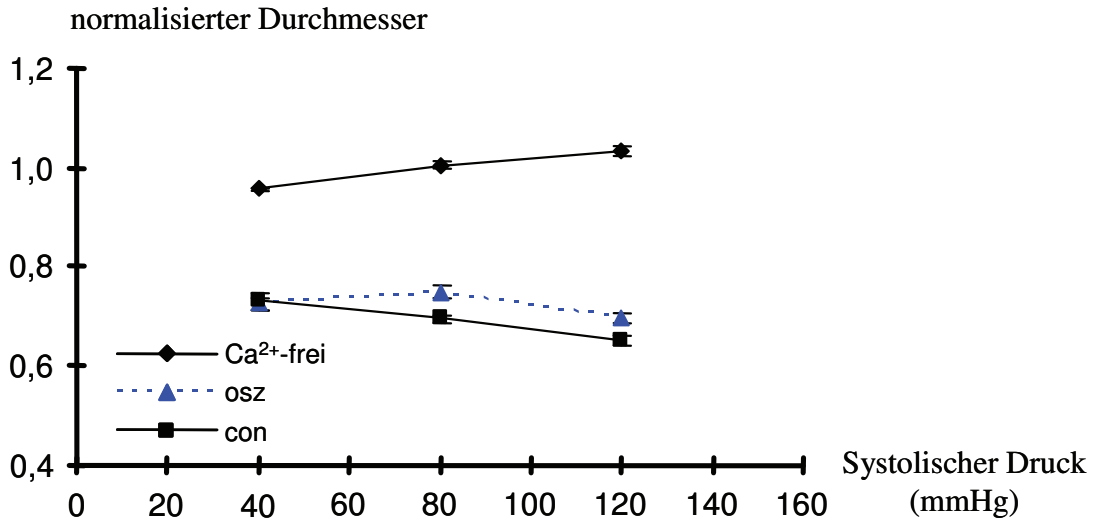

Abbildung 3.10: *Wirkung von pulsatilem Druck mit einer Frequenz von 1 Hz auf die A. gracilis. Zum Vergleich mit dem pulsatilen Druck (osz), der in Bezug auf seinen systolischen Wert dargestellt ist, sind die Kontrollversuche mit konstantem Druck (con) sowie die passiven Druckeigenschaften (Ca^{2+}-frei) der A. gracilis abgetragen. Der pulsatile Druck oszillierte zwischen 20 und 40, 20 und 80 als auch 60 und 120 mmHg.*

3.3 Frequenzabhängige Modulation der myogenen Reaktion der A. gracilis

Alle bisherigen Ergebnisse an der A. gracilis wurden bei einer Frequenz des pulsatilen Drucks von 1 Hz ermittelt. Vorangegangene Untersuchungen an der A. caudalis hatten ergeben, dass das Ausmaß der Durchmesserreaktion auf pulsatilen Druck von seiner Frequenz abhängen kann. Deshalb wurde auch bei der A. gracilis geprüft, inwieweit die Wirkung des pulsatilen Drucks frequenzabhängig ist. Dazu erfolgten Experimente bei 0,1 Hz. Es zeigte sich im Gegensatz zu den Versuchen bei 1Hz, dass sich die Gefäßreaktion bei konstantem und bei pulsatilem Druck nicht unterscheiden (n=5; p=0,32) (Abb. 3.11), wenn der pulsatile Druck auf seinen systolischen Wert bezogen wird. Der pulsatile Druck oszillierte zwischen 20 und 40, 20 und 80 als auch 60 und 120 mmHg.

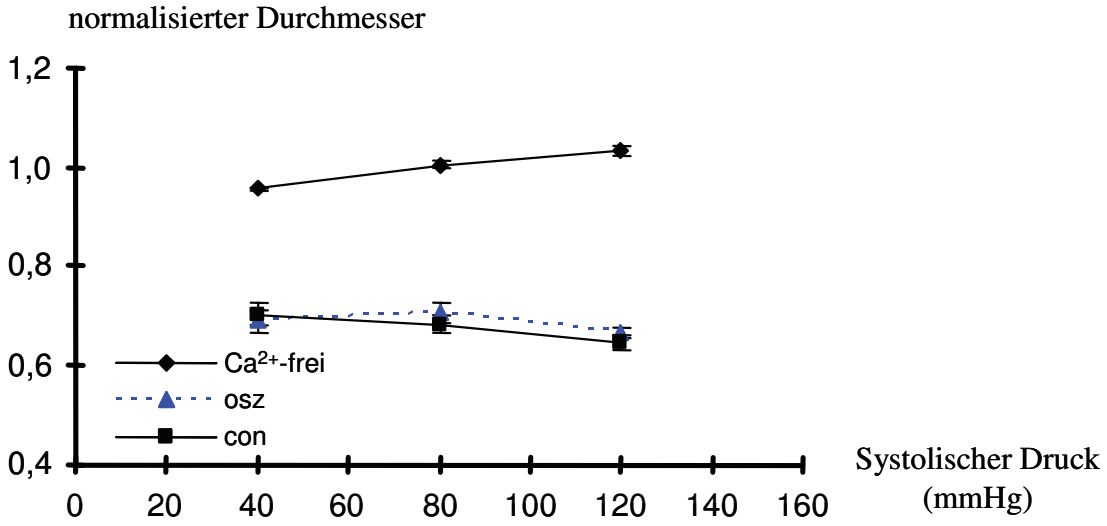

Abbildung 3.11: *Wirkung von pulsatilem Druck mit einer Frequenz von 0,1 Hz auf die A. gracilis. Zum Vergleich mit dem pulsatilen Druck (osz), der in Bezug auf seinen systolischen Wert dargestellt ist, sind die Kontrollversuche mit konstantem Druck (con) sowie die passiven Druckeigenschaften (Ca^{2+}-frei) der A. gracilis abgetragen. Der pulsatile Druck oszillierte zwischen 20 und 40, 20 und 80 als auch 60 und 120 mmHg.*

Um die erhaltenen Daten besser zu verstehen, wurde auch für dieses Gefäß der Zusammenhang zwischen konstantem bzw. pulsatilem Druck bei 1Hz und dem Gefäßtonus bestimmt. Ansteigende Druckwerte gehen sowohl bei konstantem als auch bei pulsatilem Druck mit einer Tonuserhöhung der A. gracilis einher. Diese Tonuserhöhung ist bei pulsatilem und konstantem Druck gleich, wenn sich auf die Mittelwerte des pulsatilen Drucks bezogen wurde (n=6; p=0,51) (Abb. 3.12).

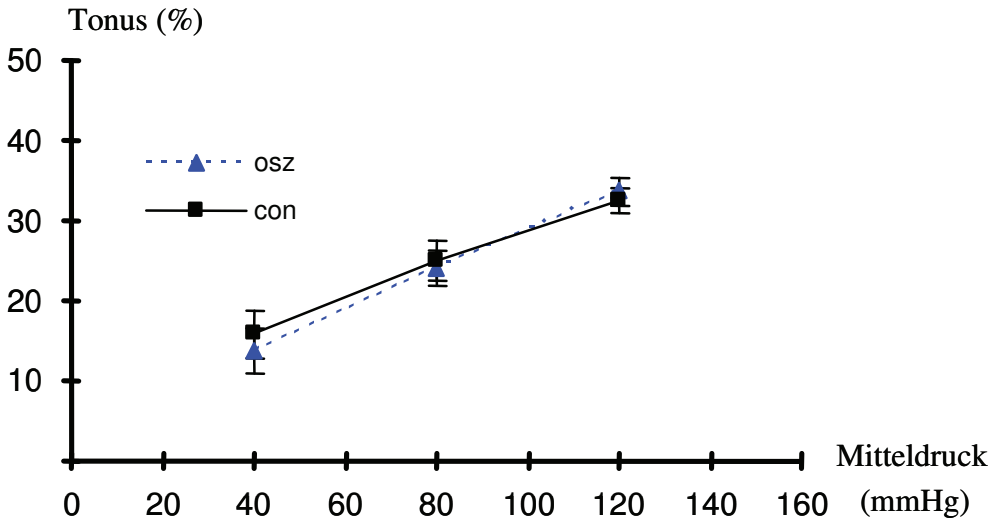

Abbildung 3.12: *Wirkung von pulsatilem Druck mit einer Frequenz von 1 Hz auf den Tonus der A. gracilis. Zum Vergleich mit dem pulsatilen Druck (osz), der in Bezug auf seinen Mittelwert dargestellt ist, sind die Kontrollversuche mit konstantem Druck (con) der A gracilis abgetragen. Der pulsatile Druck oszillierte zwischen 10 und 70, 50 und 110 als auch 90 und 150 mmHg.*

3.4 Abhängigkeit der intrazellulären Kalziumkonzentration vom pulsatilen Druck (A. gracilis)

Wie schon bei der A. caudalis wurde auch bei der A. gracilis die intrazelluläre Kalziumkonzentration in den glatten Muskelzellen gemessen, um ein besseres Verständnis über die Mechanismen der durch pulsatilen Druck ausgelösten Reaktionen zu erlangen. Hierbei ist ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration bei steigenden Druckwerten zu verzeichnen, wie Abbildung 3.13 verdeutlicht. Wenn die Veränderungen der Kalziumkonzentrationen bei pulsatilem Druck wie bei der Darstellung der Tonus- und Durchmesserreaktion auf den Mittelwert des Drucks bezogen wird, zeigten die Befunde ein höheres Niveau in der intrazellulären Kalziumkonzentration bei pulsatilem Druck im Vergleich zum konstanten Druck (n=5; p<0,01).

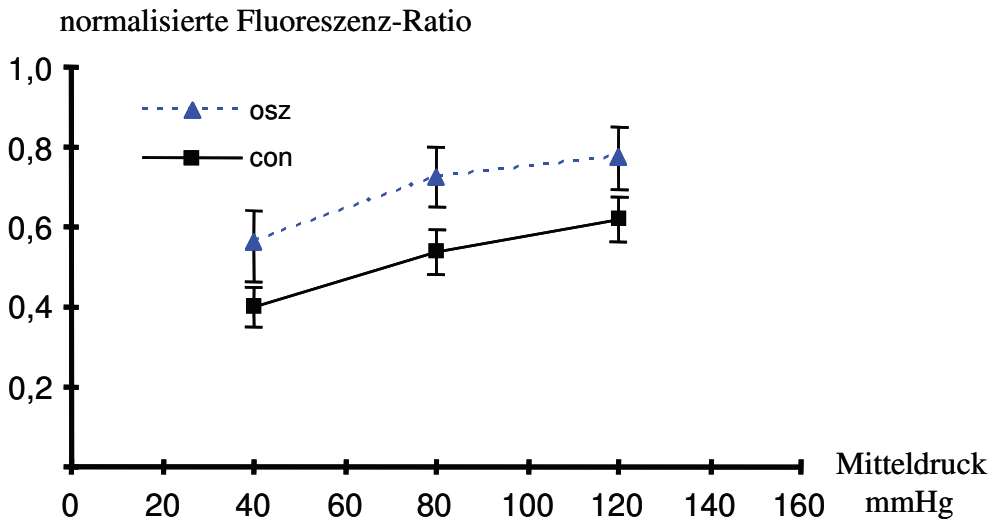

Abbildung 3.13: *Wirkung von pulsatilem Druck auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration der A. gracilis bei einer Frequenz von 1 Hz. Zum Vergleich mit dem pulsatilen Druck (osz), der in Bezug auf seinen Mittelwert dargestellt ist, sind die Kontrollversuche mit konstantem Druck (con) der A. gracilis abgetragen. Der pulsatile Druck oszillierte zwischen 10 und 70, 50 und 110 als auch 90 und 150 mmHg.*

Stellt man aus den oben vorgestellten Daten den Zusammenhang zwischen der intrazellulären Kalziumkonzentration und dem Tonus der A. gracilis grafisch dar, ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Befunden bei pulsatilem und bei konstantem Druck festzustellen. Wie Abbildung 3.14 zeigt, ist eine deutlich höhere intrazelluläre Kalziumkonzentration bei pulsatilem Druck nötig, um ein identisches Tonusniveau im Vergleich zu konstantem Duck zu erreichen. So wurde ein Tonus von 25% erreicht bei einem normalisierten Kalzium von 0,48±0,09 bei konstantem und von 0,67±0,09 bei pulsatilem Druck (n=5; p<0,01).

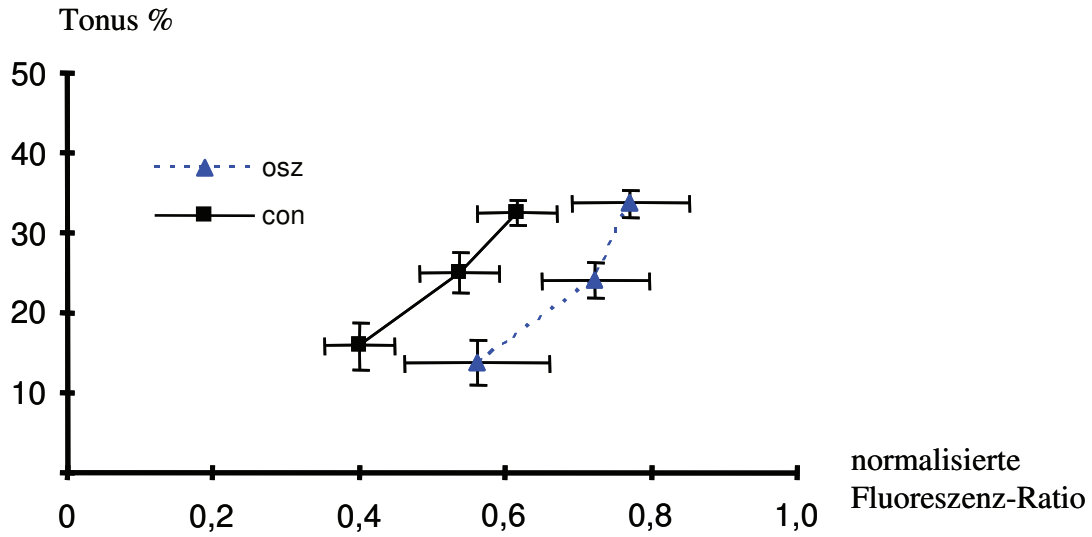

Abbildung 3.14: *Zusammenhang zwischen der intrazellulären Kalziumkonzentration, ausgedrückt als normalisierte Fluoreszenz-Ratio, und dem Tonus der A. gracilis erhalten unter pulsatilem Druck (osz) bei einer Frequenz von 1Hz und unter konstantem Druck (con).*

3.5 Modulation der Kalziumsensitivität durch partielle Rho-Kinase-Inhibition

Die in den vorangegangenen Abschnitten dargestellten Daten zeigen, dass Mechanismen, die die Sensitivität der kontraktilen Elemente für das intrazelluläre Kalzium bestimmen, in unterschiedlichem Maße an der Reaktion verschiedener Gefäße auf pulsatilen Druck beteiligt sind. Um für diesen Befund weitere Bestätigung zu erhalten, wurde die Reaktion der A. caudalis auf pulsatilen Druck erneut untersucht, nachdem ein Mechanismus, der in diesem Gefäß die Kalziumsensitivität stark mitbestimmt, die Rho-Kinase, mittels des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 partiell inhibiert wurde. In Anwesenheit von 3µM Y27632 wurden Sprünge konstanten Drucks von 40 über 80 auf 120 mmHg und pulsatiler Druck, der zwischen 10 und 70, 50 und 110 sowie 90 und 150 mmHg oszillierte, appliziert. Wenn die Gefäßreaktionen bei pulsatilem Druck auf dessen Mittelwert bezogen wurden, zeigte sich, ähnlich wie bei der A. gracilis aber im Unterschied zur A. caudalis in Abwesenheit von Y-27632, kein Unterschied im Vergleich zur Durchmesserreaktion bei konstanten Druckwerten (n=7; p=0,85) (Abb. 3.15).

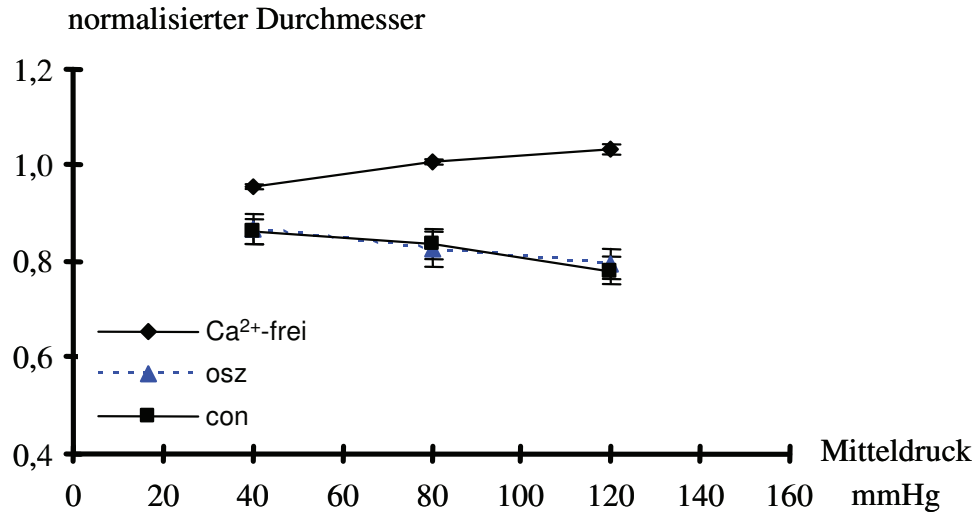

Abbildung 3.15: *Wirkung von pulsatilem Druck mit einer Frequenz von 1Hz auf die A. caudalis in Anwesenheit des Rho-Kinase-Ihibitors Y27632 (3µM). Zum Vergleich mit dem pulsatilen Druck (osz), der in Bezug auf seinen Mittelwert dargestellt ist, sind die Kontrollversuche mit konstantem Druck (con) sowie die passiven Druckeigenschaften (Ca^{2+}-frei) der A. caudalis abgetragen. Der pulsatile Druck oszillierte zwischen 10 und 70, 50 und 110 als auch 90 und 150 mmHg.*

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Wahl des isobaren Präparats als Untersuchungsmodell

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit basieren auf in vitro Untersuchungen an so genannten isobaren Präparaten der A. caudalis und der A. gracilis der Ratte. Im Vergleich zu isometrischen Präparaten, bei denen die Gefäße mit Hilfe einer Drahtkonstruktion auf einen definierten Durchmesser aufgespannt werden, bieten isobare Präparate die Möglichkeit, die Gefäße definierten Drücken auszusetzen und ihre konstriktorische und dilatatorische Reaktion in Form von Durchmesseränderungen zu beobachten. Mittels dieser Methode lassen sich insbesondere die Ausbildung des myogenen Tonus und die Eigenschaften der myogenen Reaktion gut untersuchen *[Osol et al. 2002]*. Des Weiteren ist zu beachten, dass während der myogenen Reaktion durch die Konstriktion eine Verringerung der Wandspannung zu verzeichnen ist. Dieses physiologische Phänomen lässt sich nur im Modell des isobaren Präparats beobachten, bei isometrischen Präparaten hingegen wird dies nicht gesehen. Hier kommt es während der Kontraktion sogar zu einer Erhöhung der Wandspannung *[Schubert et al. 1996]*. Zudem zeigten vergleichende Untersuchungen an isometrischen und isobaren Präparaten Sensitivitätsunterschiede verschiedenenr Rezeptoragonisten und -antagonisten, die durch die weniger physiologischen Bedingungen des isometrischen Präparats erklärt wurden *[Buus et al. 1994; Falloon et al. 1995]*. Weiterhin besteht nur bei isobaren Gefäßpräparaten die Möglichkeit einer Messung der Gefäßreaktionen bei pulsatilen Drücken durch eine Durchmesserbestimmung mittels Videomikroskopie, da beim isometrischen Präparat konstruktionsbedingt nur sehr schwer kontrollierte veränderliche Drücke bzw. Wandspannungen angelegt werden können. Im Sinne der Aufgabenstellung ist die Wahl des isobaren Gefäßpräparats daher das adäquatere Modell für die vorliegende Arbeit.

Zu beachten ist allerdings, dass auch dieses Modell die physiologische Situation nicht in ihrer ganzen Komplexität wiedergeben kann. Hier werden die Wirkungen des Blutflusses oder der vom umgebenden Gewebe freigesetzten Faktoren gänzlich ausgeschaltet *[Ward et al. 2000; Bryan et al. 2001]*. Zur Beurteilung der vorliegenden Ergebnisse muss daher berücksichtigt

werden, dass es sich bei dem verwendeten System um ein vereinfachtes, auf ein einzelnes Gefäß reduziertes Modell handelt, dessen Verständnis allerdings Voraussetzung für das Verständnis komplexer Gefäßnetze oder des Blutversorgungssystems in vivo ist, letztes jedoch nicht erschöpfend beschreiben kann.

4.1.2 Güte der Präparate – Ausschlusskriterien

Bei der mikrochirurgischen Präparation der Gefäße besteht die Gefahr, die empfindlichen Gefäße mechanisch zu beschädigen und somit in ihrer Funktion zu beeinträchtigen. Orientierend an bereits beschriebenen Gefäßreaktionen der kleinen Rattenschwanzarterie in isobaren Präparationen *[Schubert et al. 1997; Schubert et al. 1999; Schubert et al. 2002]* wurden sowohl für die A. caudalis als auch für die A. gracilis folgende Kriterien für die Fortsetzung eines Versuchs festgelegt: Bei einem transmuralen Druck von 80 mmHg mussten die verwendeten Gefäße einen spontanen basalen Tonus entwickeln, der in einer Konstriktion auf einen Durchmesser von weniger als 85% des Maximaldurchmessers bestand. Weiterhin wurde eine vollständige Dilatation der Gefäße bei Applikation von 10^{-6} M Acetylcholin sowie eine kontraktile Reaktion nach Applikation von 10^{-7} M Noradrenalin von mindestens 25% des Ausgangsdurchmessers gefordert. Die zu applizierenden Substanzen wurden, wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben, über eine Pumpe in die extravasale Lösung der Messkammer gebracht, so dass sie, im Gegensatz zur Situation in vivo, das Gefäß über die Adventitiaseite erreichten und von dort durch Diffusion oder transzellulären Transport in lumennahe Zellschichten gelangten. Dies ist die etablierte Art der Applikation vasoaktiver Substanzen im benutzten Versuchsmodell, ist jedoch bei der Beurteilung der Wirkung dieser Substanzen zu beachten.
Zur weiteren Vitalitätsprüfung erfolgte ein Drucksprung von 80 auf 120 mmHg über fünf Minuten, gefolgt von einer zehnminütigen Erholungsphase und anschließend eine kurze Sequenz von pulsatilen Drucksprüngen zwischen 10 und 70, 50 und 110 und 90 und 150 mmHg bei dementsprechendem Mitteldruck von 40, 80 und 120 mmHg mit einer Frequenz von 1Hz. War bei den jeweiligen Druckänderungen eine kontraktile Reaktion zu verzeichnen und stellte sich in der Erholungsphase der zuvor bestehende basale Tonus erneut ein, so wurde das Gefäß für anschließende Versuche freigegeben.
Es ist bekannt, dass durch den Blutfluss sowohl endothelvermittelte als auch endothelunabhängige Gefäßreaktionen ausgelöst oder moduliert werden können *[Davies*

1995; Sun et al. 1995; Park et al. 1999; Ward et al. 2000; Bryan et al. 2001]. Zur Vereinfachung wurden die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit daher an flussfreien Präparaten durchgeführt. Zur Gewährleistung der Flussfreiheit wurde bereits bei der Präparation darauf geachtet, einen Gefäßabschnitt ohne lichtmikroskopisch sichtbare Gefäßabgänge zu wählen. Die Kontrolle der Abwesenheit eines intravasalen Flusses erfolgte, wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben, über eine in das mit dem Gefäßlumen verbundene Schlauchsystem eingebrachte Luftblase, deren Bewegung während des Versuches beobachtet werden konnte. Jeder Fluss, der durch eine stärkere als die durch Filtration bedingte minimale Bewegung der Luftblase angezeigt wurde, galt als Ausschlusskriterium für die Verwendung des Gefäßes, bzw. während des laufenden Versuches als Abbruchkriterium. Bei der Beurteilung der Resultate ist jedoch die Abwesenheit eines Blutflusses zu berücksichtigen.
Für die Versuche zur Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration war es nötig, das Gefäßpräparat mit einem Fluoreszenzfarbstoff, Fura-2-AM, zu beladen. Nach dem Anfertigen der Fura-2-AM-Lösung, wie in 2.3.5 beschrieben, erfolgte die 60-minütige, lichtgeschützte Beladung des Gefäßes und anschließend das 20-minütige Auswaschen mit physiologischer Lösung. Zeigte das Gefäß nach diesem Verfahren weiterhin eine ausreichende myogene Autoregulation, konnte der Versuch gestartet werden.

4.1.3 Erfassung der Messwerte

Die Registrierung der Messwerte erfolgte über eine optisch-rechentechnische Darstellung eines Gefäßausschnittes und eine computergestützte Messung der Gefäßwandabstände. Hierbei machte man sich Kontrastunterschiede zwischen Gefäßlumen und Gefäßwand zunutze, so dass jeweils die Grenzen zwischen Lumen und Wand bestimmt und deren Abstand automatisch ausgemessen werden konnte *[Fischer et al. 1996]*. Das Auftreten anderer Kontrastunterschiede, hervorgerufen zum Beispiel durch winzige Luftbläschen oder auch die Verunreinigung der Lösung durch Fussel oder einen Faden, galt als mögliche Fehlerquelle. Durch die Abbildung des Gefäßes auf dem Computerbildschirm und die Anzeige der jeweiligen Lumengrenze war jedoch jederzeit die Möglichkeit der optischen Kontrolle gegeben, so dass eventuell auftretende Messartefakte berücksichtigt werden

konnten. Für die Auswertung wurden nur Messungen verwendet, die ohne die beschriebenen Störungen aufgenommen wurden.
Bei der Beurteilung der Messergebnisse ist zu beachten, dass sich bei dem verwendeten System eine Messungenauigkeit von 2 µm pro Bildschirmpixel ergab, was bei einem 200 µm dicken Gefäß einem Prozent vom Gesamtdurchmesser entspricht.

4.2 Der konstante und pulsatile Druck

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von definierten Drücken, sowohl konstanter als auch pulsatiler Natur, auf die myogene Reaktion isobarer Gefäßpräparate untersucht. Als konstanter Druck wurde ein einmaliger Drucksprung von einem festgelegten Druckniveau auf ein nächst höheres Druckniveau und Verbleiben auf diesem für eine bestimmte Zeit, mindestens 5 Minuten, definiert. Die hieraus gewonnenen Daten entsprechen der Kontrolle in den im Ergebnisteil beschriebenen Versuchsserien. Ein ständiger Wechsel zwischen hohem und niedrigem Druckniveau pro Zeiteinheit in einem bestimmten Zeitraum (1Hz = 1/s) entsprach dem pulsatilem Druck.
Als hinlänglich bekannt gilt, dass sowohl konstante als auch pulsatile Drücke kleine Arterien kontrahieren und deren myogene Reaktion modulieren *[VanBavel et al. 1998; Schubert und Mulvany 1999; Jarajapu und Knot 2004*; *Kotecha und Hill 2005; Loutzenhiser 2006]*. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Aussage bestätigt und erstmals direkt gezeigt werden, dass die myogene Reaktion unter pulsatilem Druck je nach Gefäßbett vom systolischen Druckwert beziehungsweise vom Mitteldruck des pulsatilen Drucks abhängt, ein Unterschied, der auf einer verschiedenartigen Reaktion der die myogene Reaktion stark mitbestimmenden Mechanismen der Kalziumsensitivitätsregulation auf pulsatilen Druck zu beruhen scheint. Die Ergebnisse von der A. caudalis zeigen, dass sich, wenn der systolische Wert des pulsatilen Drucks bei 1 Hz zum Vergleich mit dem konstanten Druck herangezogen wird, die myogene Reaktion bei pulsatilem und konstantem Druck nicht unterscheidet. Wird der Mitteldruck des pulsatilen Drucks zum Vergleich mit dem konstanten Druck benutzt, d. h. liegt der systolische Wert des pulsatilen Drucks höher als der konstante Druck, so ist der myogenen Tonus der A. caudalis bei pulsatilem Druck stärker als bei konstantem Druck. Dieser Befund wir durch

Untersuchungen an Arterien des afferenten Teils des Glomerulus der Ratte bestätigt [*Loutzenhiser 2006; Williamson 2008]*.

Um Aussagen zur Allgemeingültigkeit dieses Befundes machen zu können, wurden die Untersuchungen an einer Skelettmuskelarterie, der A. gracilis wiederholt. Hier wurde jedoch gefunden, dass die myogene Antwort durch den Mitteldruck des pulsatilen Drucks bestimmt wird. Eine solche Reaktionsweise von kleinen Arterien auf pulsatilen Druck ist bisher nicht beschrieben worden.

4.3 Frequenzabhängige Modulation der myogenen Reaktion

Die Hypothese, dass die unterschiedliche Abhängigkeit der myogenen Reaktion vom systolischen Druck bzw. Mitteldruck durch die Eigenschaften des Druckpulses verursacht wird, konnte in Untersuchungen mit geänderter Frequenz (0,1 Hz) spezifiziert werden. Die A. gracilis zeigte bei 0,1 Hz eine Reaktion wie die A. caudalis bei 1 Hz, d.h. bei verringerter Frequenz wurde die myogene Reaktion bei pulsatilem Druck auch in der A. gracilis vom systolischen Druck des pulsatilen Drucks bestimmt. Frühere Untersuchungen hatten ergeben, dass die Reaktion der A. caudalis bei 1 Hz und bei 0,1 Hz gleich ausfällt *(Burmeister und Schubert, unveröffentlichte Befunde)*. Für die A. gracilis wurde also gefunden, dass bei hohen Frequenzen der Mitteldruck des pulsatilen Drucks bestimmend für die Ausprägung der myogene Reaktion ist, bei niedrigen Frequenzen wird diese jedoch durch den systolischen Druck des pulsatilen Drucks bestimmt. Die myogene Antwort der A. gracilis wird demzufolge vom pulsatilen Druck frequenzabhängig moduliert, die der A. caudalis im untersuchten Frequenzbereich nicht.

In Untersuchungen bei denen renale Arterien der Ratte pulsatilen Drücken mit unterschiedlichen Frequenzen ausgesetzt wurden, zeigte sich eine myogene Autoreaktion. Die Ausprägung der myogenen Reaktion war bei diesen Gefäßen von der Höhe des Spitzendrucks, d. h. des systolischen Drucks des pulsatilen Drucks abhängig *[Loutzenhiser et al. 2004 und 2006]*. Es liegt also eine ähnliche Reaktionsweise wie bei der A. caudalis vor. Die Untersuchungen zeigten weiterhin, dass die myogenen Reaktionen der Arterien des afferenten Teils des Glomerulus bei Applikation von pulsatilem Druck der Pulsationsfrequenz abhängen *[Loutzenhiser et al. 2002 und 2006]*. So war bei höheren Frequenzen und bei sich

änderndem systolischen Druck eine stärkere Ausprägung der myogenen Reaktion zu verzeichnen, Änderungen des diastolischen Drucks oder des Mitteldrucks hatten keinen Effekt auf die Ausprägung der myogenen Reaktion. Der Applikationszeitraum der oszillierenden Drücke betrug jedoch nicht wie in der vorliegenden Arbeit 5 Minuten sondern variierte zwischen 10 bis 100 Sekunden. Es konnte somit eine frequenzabhängige Modulation der myogenen Reaktion bei pulsatilem Druck in den untersuchten Frequenzbereichen (0,1 bis 10 Hz) beobachtet werden, die Vergleichbarkeit mit den hier vorgestellten Befunden ist jedoch durch die unterschiedlichen Beobachtungszeiträume nur begrenzt gegeben. Weitere Untersuchungen an epi- und endokardialen Koronararterien zeigten, dass pulsatiler Druck ebenfalls einen Einfluss auf die myogene Reaktion dieser Arterien hat, in diesem Fall ist jedoch eine Dilatation der untersuchten Gefäße Folge des pulsatilen Drucks. Eine Erhöhung der Pulsationsfrequenz bei konstantem Mitteldruck (60 mmHg) und systolischem Druck (100 mmHg) ging mit einer signifikant abgeschwächten Dialatation einher, so dass eine frequenzabhängige Modulation der myogenen Reaktion auf pulsatile Drücke auch dieser Gefäße anzunehmen ist *[Sorop und VanBavel 2002]*. Die Dauer der oszillierenden Drücke betrug nur 15 Sekunden, so dass auch hier die Vergleichbarkeit mit den hier vorgestellten Ergebnissen durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen eingeschränkt ist.
Die neuartige Reaktionsweise der A. gracilis, die Abhängigkeit der myogenen Reaktion vom Mitteldruck des pulsatilen Drucks, stellt einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen bezüglich der unterschiedlichen Ausprägung der myogenen Reaktion in verschiedenen Gefäßbetten dar.

4.4 Intrazelluläres Kalzium und Kalziumsensitivität

Es gilt als gesichert, dass Kalzium eine Schlüsselrolle in der Signalkaskade der myogenen Reaktion einnimmt *[z. B. Knot und Nelson 1995; Knot und Nelson 1998; Kotecha und Hill 2005]*. Untersuchungen an diversen Gefäßen unterschiedlicher Lokalisation und verschiedener Spezies zeigten den Verlust der myogenen Reaktion nach Entfernung des extrazellulären Kalziums *[z. B. Hill und Meininger 1994; Wellmann et al. 1996; Reber und Nowicki 1998, Jarajapu und Knot 2004, Ito und Knot 2006]*. In Anlehnung an vorherige Untersuchungen, die einen Anstieg des intrazellulären Kalziums bei Erhöhung des

transmuralen Drucks zeigten, wurde geprüft, ob die verschiedenartigen Reaktionen der beiden in dieser Arbeit untersuchten Gefäße auf pulsatile Drücke durch unterschiedliche Veränderungen des intrazellulären Kalziums bedingt sind.

Die Messungen des intrazellulären Kalziums bei Applikation pulsatiler Drücke ergab, dass bei einer Frequenz von 1Hz pulsatiler Druck in der A. caudalis, bei Bezug auf den die Kontraktion bestimmenden systolischen Druck, die gleiche Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration wie konstanter Druck erzeugte. Im Gegensatz dazu erzeugte pulsatiler Druck in der A. gracilis, bei Bezug auf den hier die Kontraktion bestimmenden Mitteldruck, eine größere Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration als konstanter Druck. Diese vergrößerte Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch pulsatilen Druck bei Bezug auf den Mitteldruck zeigt an, dass sich in der A. gracilis die intrazelluläre Kalziumkonzentration, wie in der A. caudalis, am höheren systolischen Druck orientiert.

Die unterschiedliche Modulation der myogenen Antwort der beiden untersuchten Gefäße bei pulsatilen Drücken ist somit nicht durch verschiedenartige Reaktionen des intrazellulären Kalziums zu erklären. Es muss demzufolge ein anderer Regulationsmechanismus für die Unterschiede in der Ausbildung der myogenen Reaktion unter pulsatilem Druck verantwortlich sein.

Eine weiterführende Auswertung der erhaltenen Befunde zeigte, dass in der A. gracilis bei pulsatilem Druck für die Entwicklung des gleichen relativen Gefäßtonus wie bei konstantem Druck eine viel größere Menge an intrazellulärem Kalzium zur Verfügung gestellt werden muss. Das bedeutet, dass dieses Gefäß unter pulsatilem Druck eine geringere druckinduzierte Kalziumsensitivität als bei konstantem Druck aufweist. Bei der A. caudalis ist die Sensitivität zu Kalzium bei pulsatilem Druck und bei konstantem Druck identisch.

Der Befund der geringeren druckinduzierten Kalziumsensitivität der A. gracilis unter pulsatilem Druck wurde gestützt durch Versuche, in denen die Aktivität des an der Regulation der Kalziumsensitivität bei der myogenen Reaktion maßgeblich beteiligten Rho-Kinase Signalwegs durch den Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 eingeschränkt wurde. In Untersuchungen an cerebralen Arterien der Ratte konnte eine dosisabhängige Abschwächung der myogenen Antwort nach Anwendung von Rho-Kinase-Inhibitoren wie Y27632 oder HA-1077 gezeigt werden *[Okamoto und Nakayama 2004; Gokina und Osol 2005; Jarajapu und Knot 2005]*. In Anwesenheit des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 zeigte die A. caudalis die gleiche myogene Gefäßreaktion auf pulsatilen Druck wie die A. gracilis, d. h. diese Reaktion

war nun vom Mitteldruck des pulsatilen Drucks abhängig. Die Aktivität der Rho-Kinase scheint ein entscheidender Faktor für das Ausmaß der Reaktion von kleinen Gefäßen auf pulsatile Drücke zu sein. Einer der Hauptmechanismen für die Modulation der Kalziumsensitivität bei der Kontraktion glatter Muskelzellen ist die Aktivierung beziehungsweise Inaktivierung der Myosin-Leichtketten-Phosphatase, was einer De- beziehungsweise Phosphorylierung des Myosins gleichkommt (siehe Einleitung 1.2.3.2). Jüngste Untersuchungen zeigten bei Anwesenheit verschiedener Rho-Kinase-Inhibitoren eine Verminderung des Phosphorylierungsgrades der Phosphatase und des Myosins (MYPT1-T855 und LC_{20}) und konsekutiv abgeschwächter myogener Reaktion, so dass der RhoA/Rho-Kinase-Transduktionsweg, als ein die Kalziumsensitivität modulierender Faktor *[Johnson et al. 2009]* und modifizierender Faktor der myogene Reaktion *[Somlyo, A. P. und Somlyo, A. V. 2000; MacDonald und Haystead 2001]* anzusehen ist.
Zusammenfassend ist zu sagen, dass die verschiedenartige Reaktion der beiden in dieser Arbeit untersuchten Gefäße auf pulsatile Drücke durch eine unterschiedliche Kalziumsensitivierung unter pulsatilem Druck gekennzeichnet ist.

4.5 Extrazelluläre Modulation der myogenen Reaktion

Es sind eine Vielzahl sich gegenseitig beeinflussender Transduktionswege an der Ausbildung der myogenen Reaktion beteiligt. Die myogene Autoregulation kleiner Gefäße lässt sich mit dem momentanen Forschungsstand nicht erschöpfend erklären, da noch nicht alle feedback- und feedforward-Mechanismen und deren Zusammenspiel im Detail bekannt sind. Auch müssen extrazelluläre Regulationsmechanismen oder Einflüsse wie zum Beispiel neurogene Komponenten, extravasale Druckänderungen und adaptive Wachstumsprozesse inklusive lang- und kurzfristiger struktureller Umgestaltungen mit in die Diskussion einbezogen werden. Viele Untersuchungen an Skelettmuskelarterien und Arterien anderer Organe deuten darauf hin, dass es zu differenzierten strukturellen Umbauprozessen in Antwort auf hämodynamische Änderungen beziehungsweise bei chronischer Vasokonstriktion kommt *[Bakker et al. 2002, 2003 und 2004; Sorop et al. 2006]*. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Änderungen in der strukturellen Zusammensetzung der Gefäßwand von der Präsenz hochmolekularer Serumfaktoren *[Bakker et al. 2000]* und von intraluminalen

Flussphänomenen abhängen *[Pistea und VanBavel 2005]*. Da in der vorliegenden Arbeit ein intraluminaler Fluss durch ein blind endendes Schlauchsystem ausgeschlossen wurde, die Untersuchungen eine Dauer von acht Stunden nicht überschritten und keine quantitativen Untersuchungen von Geweben der verwendeten Gefäße durchgeführt wurden sowie Serumfaktoren beim verwendeten Versuchsmodell fehlten, können auf der Basis der hier vorgestellten Untersuchungen keine Aussagen über lang- oder kurzfristige strukturelle Umbauprozesse und deren Beteiligung an der myogenen Reaktion gemacht werden.

4.6 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung

Die myogene Reaktion ist ein physiologischer Regulationsmechanismus zur Konstanthaltung der Organdurchblutung und beeinflusst maßgeblich die Funktion des Blutkreislaufsystems. Im weiteren Sinne ist sie aber auch anteilnehmender Faktor einer Vielzahl von Erkrankungen wie zum Beispiel arterieller Bluthochdruck, cerebrovaskuläre Erkrankungen, koronare Herzkrankheit, renale Erkrankungen und vieles mehr. Inwieweit von einem protektiven oder supportiven Einfluss dieses an sich hochkomplexen Mechanismus bei den genannten Erkrankungen auszugehen ist, lässt sich nicht abschließend klären.

Ein zu erwähnender Unterschied zwischen Gefäßen aus unterschiedlichen Gefäßbetten besteht in einer frequenzabhängigen myogenen Antwort unter pulsatilem Druck, höchstwahrscheinlich bedingt durch eine unterschiedliche Kalziumsensitivität. Da die Kalziumsensitivität eine Schlüsselrolle in der Signalkaskade der myogenen Antwort einnimmt, liegen hierin Ansätze für weitergehende Untersuchungen und mögliche Therapieansätze für die Zukunft.

5 Zusammenfassung

Änderungen des Gefäßdurchmessers bei Erhöhung des transmuralen Drucks im Sinne einer Kontraktion wurden an kleinen Arterien und Arteriolen sowohl in vitro als auch in vivo beobachtet und werden als myogene Reaktion bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese überprüft, die myogene Reaktion werde durch pulsatile Drücke moduliert und ein hierbei beteiligter Mechanismus untersucht.

Die Experimente wurden an isobaren Gefäßpräparationen der A. caudalis und der A. gracilis der Ratte durchgeführt. Die Variation des transmuralen Drucks wurde durch Änderung des Höhenniveaus eines über ein Schlauchsystem mit dem untersuchten Gefäß verbundenen Reservoirs beziehungsweise durch eine elektronische Pumpe erreicht. Hierdurch wurde es möglich, die Gefäßpräparate verschiedenen konstanten sowie pulsatilen Drücken auszusetzen. Die Durchmesseränderungen der Gefäße wurden videomikroskopisch aufgezeichnet. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration wurde mit Hilfe von FURA-2 basierter Fluorimetrie bestimmt.

Es wurde gezeigt, dass die myogene Antwort der A. caudalis durch den systolischen Druck des pulsatilen Drucks bestimmt wird. Die myogene Reaktion der A. gracilis, einer Skelettmuskelarterie, wird hingegen bei Frequenzen im physiologischen Bereich (1 Hz) durch den Mitteldruck und nur bei niedrigen Frequenzen (0,1 Hz) durch den systolischen Druck des pulsatilen Drucks bestimmt. Pulsatiler Druck, bei Bezug auf den die Kontraktion bestimmenden systolischen Druck, erzeugte bei einer Frequenz von 1 Hz in der A. caudalis die gleiche Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration wie konstanter Druck. Im Gegensatz dazu, erzeugte pulsatiler Druck in der A. gracilis, bei Bezug auf den hier die Kontraktion bestimmenden Mitteldruck, eine größere Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration als konstanter Druck. Daraus folgt, dass die Kalziumsensitivität bei pulsatilem und bei konstantem Druck in der A. caudalis gleich, in der A. gracilis aber unterschiedlich, bei pulsatilem Druck verringert ist. In Anwesenheit des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632, der die Kalziumsensitivität senkt, wurde die myogene Antwort der A. caudalis, die eigentlich vom systolischen Druck des pulsatilen Drucks bestimmt wird, wie in der A. gracilis vom Mitteldruck bestimmt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchungen, dass die myogene Antwort unter pulsatilem Druck in Abhängigkeit vom konkreten Gefäß sowohl vom systolischen

Druck des pulsatilen Drucks als auch von seinem Mitteldruck bestimmt werden kann. Die Ursache für diese verschiedenartige Reaktion auf pulsatilen Druck liegt wohl in einer unterschiedlichen Frequenz-Empfindlichkeit des die Kalziumsensitivität mitbestimmenden Rho-Kinase Signalweges auf pulsatilen Druck in den untersuchten Gefäßen.

6 Thesen

1. Eine Erhöhung des transmuralen Drucks kleiner Arterien und Arteriolen hat eine Durchmesseränderung im Sinne einer Kontraktion dieser zur Folge und wird als myogene Reaktion bezeichnet.
2. Diese Arbeit untersucht die These, pulsatiler Druck moduliere die myogene Antwort kleiner Arterien und sucht nach den hierfür zugrunde liegenden Ursachen.
3. Gegenstand der Experimente waren isobare Gefäßpräparationen der A. caudalis und A. gracilis der Ratte.
4. Die Modifikation des transmuralen Drucks wurde durch Änderung des Höhenniveaus eines über ein Schlauchsystem mit dem untersuchten Gefäß verbundenen Reservoirs oder eine elektronischen Pumpe erreicht, so dass die Gefäßpräparate verschiedenen konstanten und pulsatilen Drücken ausgesetzt werden konnten.
5. Die Durchmesseränderungen der Gefäße wurden videomikroskopisch aufgezeichnet.
6. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration wurde mittels FURA-2 Fluorimetrie bestimmt.
7. Die myogene Antwort der A. caudalis wird durch den systolischen Druck des pulsatilen Drucks bestimmt.
8. Die myogene Antwort der A. gracilis, eine Skelettmuskelarterie, wird durch den Mitteldruck des pulsatilen Drucks bei physiologischen Frequenzen (1 Hz) und nur bei niedrigen Frequenzen (0,1 Hz) durch den systolischen Druck des pulsatilen Drucks bestimmt.
9. Pulsatiler Druck erzeugte in der A. caudalis, in Bezug auf den die Kontraktion dieses Gefäßes bestimmenden systolischen Druck, bei einer Frequenz von 1 Hz gleiche Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration wie konstanter Druck.
10. Pulsatiler Druck erzeugte in der A. gracilis, in Bezug auf den die Kontraktion dieses Gefäßes bestimmenden Mitteldruck, bei einer Frequenz von 1 Hz eine größere Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration als konstanter Druck.
11. Die Kalziumsensitivität der A. caudalis ist bei pulsatilem und konstantem Druck gleich, bei der A. gracilis hingegen bei pulsatilem Druck verringert.
12. In Anwesenheit des die Kalziumsensitivität vermindernden Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 wurde die myogene Antwort der A. caudalis, die eigentlich vom systolischen

Druck des pulsatilen Drucks bestimmt wird, wie in der A. gracilis vom Mitteldruck bestimmt.

13. Die myogene Antwort unter pulsatilem Druck kann sowohl vom systolischen Druck des pulsatilen Drucks als auch von seinem Mitteldruck in Abhängigkeit vom konkreten Gefäß bestimmt werden. Die Ursache für diese verschiedenartige Reaktion scheint in einer unterschiedlichen Frequenz-Empfindlichkeit des die Kalziumsensitivität mitbestimmenden Rho-Kinase Signalweges auf pulsatilen Druck in den untersuchten Gefäßen zu beruhen.

7 Quellenverzeichnis

Anschütz, S. (2003): Nervale Modulation der myogenen Reaktion kleiner Arterien. Universität Rostock, Dissertationsschrift 2004

Anschütz, S., Schubert, R. (2005): Modulation of the myogenic response by neurogenic influences in rat small arteries. *Br. J. Pharmacol.*, **146**, 226-233

Azzawi, M., Austin, C. (2005): Extravascular pressure modulates responses of isolated rat coronary arteries to vasodilator, but not vasoconstrictor, stimuli. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **290**, 1151-1156

Bayliss, W. M. (1902): On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J. Physiol.*, **28**, 220-231

Bakker, E. N. T. P., van der Meulen, E. T., Spaan, J. A. E., VanBavel, E. (2000): Organoid culture of cannulated rat resistance arteries: effect of serum factors on vasoactivity and remodelling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **278**, H1233-H1240

Bakker, E. N. T. P., Sorop, O., Spaan, J. A. E., VanBavel, E. (2004): Remodeling of resistance arteries in organoid culture is modulated by pressure and pressure pulsation and depends on vasomotion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **286**, H2052–H2056

Berczi, V., Stekiel, W. J., Contney, S. J. and Rusch, N. J. (1992): Pressure-induced activation of membrane K^+ current in rat saphenous artery. *Hypertension,* **19**, 725-729

Bolz, S. S., Vogel, L., Sollinger, D., Derwand, R., Boer, C., Pitson, S. M., Spiegel, S., Pohl, S. und U. (2003): Sphingosine kinase modulates microvascular tone and myogenic response through activation of RhoA/Rho kinase. *Circulation,* **108**, 342-347

Brayden, J. E., Nelson, M. T. (1992): Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science*, **256**, 532-535

Brenner, R., Peréz, G. J., Bonev, A. D., Eckman, D. M., Kosek, J.C., Wiler, S. W., Patterson, A. J., Nelson, M. T., Aldrich, R. W. (2000): Vasoregulation by the β1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature*, **407**, 870-876

Buus, N. H., VanBavel, E., Mulvany, M. J. (1994): Differences in sensitivity of rat mesenteric small arteries to agonists when studied as ring preparations or as cannulated preparations. *Br. J. Pharmacol.*, **112**, 579–587

Carlson, B. E., Secomb, T. W. (2005): A theoretical model for the myogenic response based on the length-tension characteristics of vascular smooth muscle. *Microcirc.*, **12**, 327-338

Cipolla, M. J., Gokina, N. I., Osol, G. (2002): Pressure-induced actin polymerization in vascular smooth muscle as a mechanism underlying myogenic behavior. *FASEB J.*, **16**, 72-76

Coats, P., Johnston, F., MacDonald, J., McMurray, J. J., Hillier, C. (2001): Signalling mechanisms underlying the myogenic response in human subcutaneous resistance arteries. *Cardiovasc. Res.*, **49**, 828-837

Coombes, J. E., Hughes, A. D., Thom, S. A. (2000): Intravascular pressure-evoked changes in intracellular calcium $[Ca^{2+}]_i$ and tone in rat mesenteric and rabbit cerebral arteries in vitro. *J. Hum. Hypertens.*, **13**, 855-858

D´Angelo, G., Mogford, J. E., Davis, G. E., Davis, M. J. und Meininger G. A. (1997): Integrin-mediated reduction in vascular smooth muscle $[Ca^{2+}]_i$ induced by RGD-containing peptide. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.***, 272**, H2065-H2070

Daut, J., Standen, N. B., Nelson, M. T. (1994): The role of the membrane potential of endothelial and smooth muscle cells in the regulation of coronary blood flow. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, **5**, 154-181

Davies, P. F. (1995): Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol. Rev.*, **75**, 519-560

Davis, M. J., Hill, M. A. (1999): Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol. Rev.*, **79**, 387-423

Davis, M. J. (1993): Myogenic response gradient in an arteriolar network. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **264**, H2168-H2179

Davis, M. J., Meiniger, G. A., Zawieja, D. C. (1992): Strech induced increases in intracellular calcium in isolated vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **263**, H1292-H1299

Dopico, A. M., Kirber, M. T., Singer, J. J., Walsh, J. V. Jr., (1994): Membrane stretch directly activates large conductance Ca^{2+}-activated K^+ channels in mesenteric artery smooth muscle cells. *Am. J. Hypertens.*, **7**, 82-89

Dörnyei, G., Monos, E., Kaley, G., Koller, A. (1996): Myogenic responses of isolated rat skeletal muscle venules: modulation by norepinephrine and endothelium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **271**, H267-H272

Doughty, J. M., Langton, P. D. (2001): Measurement of chloride flux associated with the myogenic response in rat cerebral arteries. *J. Physiol.*, **534**, 753-761

Drummond, H. A., Gebremedhin, D., Harder, D. R. (2004): Degenerin/epithelial Na^+ channel proteins: components of a vascular mechanosensor. *Hypertension*, **44**, 643-648

Drummond, H. A., Grifoni, S. C., Nikki, L. J., (2008): A new trick for an old dogma: ENaC Proteins as mechanotransducers in vascular smooth muscle. *Physiol.*, 23, 23-31

Earley, S., Starub, S. V., Brayden, J. E. (2007): Protein kinase C regulates vascular myogenic tone through activation of TRPM4. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*., **292**, 2613-2622

Earley, S., Waldron, B. J., Brayden, J. E. (2004): Critical role for transient receptor potential channel TRMP4 in myogenic constriction of cerebral atreies. *Circ. Res.*, **95**, 922-929

Falcone, J. C., Davis, M. J., Meininger, G. A. (1991): Endothelial independence of myogenic response in isolated skeletal muscle arterioles. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **260,** H130-135

Falloon, B. J., Stephens, N., Tulip, J. R., Heagerty, A. M. (1995): Comparison of small artery sensitivity and morphology in pressurized and wire-mounted preparations. *Am. J. Physiol.*, **268**, H670-H678

Fischer, J. G., Mewes, H., Hopp, H. H., Schubert, R. (1996): Analysis of pressurized resistance vessel diameter changes with a low cost digital image processing device. *Comp. Meth. Prog. Biomed.*, **50**, 23-30

Gokina, N. I., Osol, G. (2002): Actin cytoskeletal modulation of pressure-induced depolarisation and Ca^{2+} influx in cerebral arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **282**, H1410-H1420

Gokina, N. I., Park, K. M., McElroy-Yaggy, K., Osol, G. (2005): Effects of Rho kinase inhibition on cerebral artery myogenic tone and reactivity. *J. Appl. Physiol.*, **98**, 1940-1948

Golding, E. M., Robertson, C. S., Bryan, R. M. Jr. (1998): Comparison of the myogenic response in rat cerebral arteries of different calibers. *Brain Res.*, **785**, 293-298

Golenhofen, K., (2004): Basislehrbuch Physiologie, 3. Auflage, S. 123 ff.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y. (1985): A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440-3450

Harder, D. R. (1984): Pressure-dependent membrane depolarization in cat middle cerebral artery. *Circ. Res.*, **55**, 197-202

Hill, M. A., Meininger, G. A. (1994): Calcium entry and myogenic phenomena in skeletal muscle arterioles. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **267**, H1085-H1092

Hill, M., Kotecha, N. (2005): Myogenic contraction in rat skeletal muscle arterioles: smooth muscle membrane potential and Ca^{2+} signaling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **289**, H1326-1334.

Imig, J. D., Zou, A. P., Oritz de Montanello, P. R., Sui, Z., Roman, R. J. (1994): Cytochrome P-450 inhibitors alter afferent arteriolar response to elevations in pressure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **266**, H1879-H1885

Ito, I., Jarajapu, Y. P. R., Grant, M. B., Knot, H. J. (2006): Characteristics of myogenic tone in the rat ophthalmic artery. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **292,** H360-H368

Jaggar, J. H., Stevenson, A. S., Nelson, M. T. (1998): Voltage dependence of Ca^{2+} sparks in intact cerebral arteries. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **274**, C1755-C1761

Jarajapu, Y. P. R., Knot, H. J. (2004): Myogenic tone and reactivity of the rat ophthalmic artery. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, **45**, 253-259

Jarajapu, Y. P. R., Knot, H. J. (2005): Relative contribution of Rho kinase and protein kinase C to myogenic tone in rat cerebral arteries in hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **289**, H1917-H1922

Jeppesen, P., *Aalkjær, C.,* Bek, T. (2003): Myogenic response in isolated porcine retinal arterioles. *Current Eye Research*, **27**, 217-222

Jernigan, N. L., Drummond, H. A. (2005): Vascular ENaC proteins are required for renal myogenic constriction. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.,* **289**, F891-F901

Jernigan, N. L., Drummond, H. A. (2006): Myogenic vasoconstriction in mouse renal interlobar arteries: role of endogeneous beta and gammaENaC. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.,* **291**, F1184-F1191

Johnson, P. C. (1989): The myogenic response in the microcirculation and its interaction with other control systems. *J. Hypertens. Suppl.*, **7**, S33-39

Johnson, R. P., El-Yazbi, A. F., Takeya, K., Walsh, E. J., Walsh, M. P., Cole, W. C. (2009): Ca^{2+} sensitization owing to Rho kinase-dependent phosphorylation of MYPT1-T855 contributes to myogenic control of arterial diameter. *J. Physiol.*, **587***,* 2537-2553

Karibe, A., Watanabe, J., Horiguchi, S., Takeuchi, M., Suzuki, S., Funakoshi, M., Katoh, H., Keitoku, M., Satoh, S., Shirato, K. (1997): Role of cytosolic Ca^{2+} and protein kinase C in developing myogenic contraction in isolated rat small arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **272**, H1165-H1172

Kauser, K., Clark, J. E., Masters, B. S., Ortiz de Montellano, P. R., Ma, Y. H., Harder, D. R., Roman, R. J. (1991): Inhibitors of cytochrome P-450 attenuate the myogenic response of dog renal arcuate arteries. *Circ. Res.*, **68**, 1154-1163

Kellenberger, S., Schild, L. (2002): Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol. Rev.*, **82**, 735-767

Kirber, M. T., Ordway, R. W., Clapp, L. H., Walsh, J. V., Singer, J. J. (1992): Both membrane stretch and fatty acids directly activate large conductance Ca^{2+}-activated K^+ channels in vascular smooth muscle cells. *FEBS-Lett.*, **297**, 24-28

Knot, H. J. and Nelson, M. T. (1995): Regulation of membrane potential and diameter by voltage-dependent K^+ channels in rabbit myogenic cerebral arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **269**, H348-H355

Knot, H. J. and Nelson, M. T. (1998): Regulation of arterial diameter an wall $[Ca^{2+}]_i$ in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. *J. Physiol.*, **508**, 199-210

Kuo, L., Davis, M. J., Chilian, W. M. (1988): Myogenic activity in isolated subepicardial and subendocardial coronary arterioles. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **255**, H1558-H1562

Kuo, L., Chilian, W. M., Davis, M. J. (1991): Interaction of pressure- and flow-induced responses in porcine coronary resistance vessels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **261**, H1706-1715

Kuo, L., Arko, F., Chilian, W. M., Davis, M. J. (1993): Coronary venular responses to flow and pressure. *Circ. Res.*, **72**, 607-615

Lagaud, G., Gaudreault, N., Moore, E. D., Van Breemen, C., Laher, I. (2002): Pressure-dependent myogenic constriction of cerebral arteries occurs independently of voltage-dependent activation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **283**, H2187-2195

Lange, A., Gebremedhin, D., Narayanan, J., Harder, D. (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**, 27345-2752

Launay, P., Fleig, A., Perraud, A. L., Scharenberg, A. M., Penner, R., Kinet, J. P. (2002): TRPM4 is a Ca^{2+}-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell*, **109**, 397-407.

Launay, P., Cheng, H., Srivatsan, S., Penner, R., Fleig, A. Kinet, J. P. (2004): TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation. *Science*, **306**, 1374-1377

Loutzenhiser, R., Bidani, A., Chilton, L. (2002): Renal myogenic response. Kinetic Attributes and Physiological Role. *Circ. Res.*, **90**, 1316-1324

Loutzenhiser, R., Wang, X. (2002): Determinants of renal microvascular response to ACh: afferent and efferent arteriolar actions of EDHF. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **282**, F124-F132

Loutzenhiser, R., Griffin, K. A., Bidani, A. K. (2006): Systolic blood pressure as the trigger for the renal myogenic response. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, **15**, 41-49

Loutzenhiser, R., Griffin, K. A., Williamson G, Bidani, A. K. (2006): Renal autoregulation: new perspectives regarding protective and regulatory roles of the underlying mechanisms. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp.*, **290**, 1153-1167

Ma, Y. H., Gebremedhin, D., Schwartzman, M. L., Falck, J. R., Clark, J. E., Masters, B. S., Harder, D. R., Roman, R. J. (1993): 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid is an endogenous vasoconstrictor of canine renal arcuate arteries. *Circ. Res.*, Vol. **72**, 126-136

MacDonald, J. A., Borman, M. A., Murányi, A., Somlyo, A. V., Hartshorne, D. J., Haystead, T. A. J. (2001): Identification of the endogenous smooth muscle myosin phospatase-associated kinase. *PNAS*, **98**, 2419-2424

Massett, M. P., Ungvari, Z., Csiszar, A., Kaley, G., Koller, A. (2002): Different roles of PKC and MAP kinases in arteriolar constrictions to pressure and agonists. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **283**, H2282-2287

Masumoto, N., Nakayama, K., Oyabe, A., Uchino, M., Ishii, K., Obara, K., Tanabe, Y. (1997): Specific attenuation of the pressure-induced contraction of rat cerebral artery by herbimycin A. *Eur. J. Pharmacol.*, **330**, 55-63

McCarron, J. G., Osol, G., Halpern, W. (1989): Myogenic responses are independent of the endothelium in rat pressurized posterior cerebral arteries. *Blood Vessels*, **26**, 315-319

McCarron, J. G., Crichton, C. A., Langton, P. D., MacKenzie, A., Smith, G. L. (1997): Myogenic contraction by modulation of voltage-dependent calcium currents in isolated rat cerebral arteries. *J. Physiol.*, **498**, 371-379

Meininger, G. A., Davis, M. J. (1992): Cellular mechanisms involved in the vascular myogenic response. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **263**, H647-659

Miller, F. J., Dellsperger, K. C., Gutterman, D. D. (1997): Myogenic constriction of human coronary arterioles. *Am. J. Physiol.*, **273**, H257-H264

Murphy, T. V., Spurrell, B. E., Hill, M. A. (2002): Mechanisms underlying pervanadate-induced contraction of rat cremaster muscle arterioles. *Eur. J. Pharmacol.*, **442**, 107-114

Narayanan, J., Imig, M., Roman, R. J., Harder, D. R. (1994): Pressurization of isolated renal arteries increases inositol triphosphate and diacylglycerol. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **266**, H1840-H1845

Nelson, M. T., Conway, M. A., Knot, H. J., Brayden, J. E. (1997): Chloride channel blockers inhibit myogenic tone in rat cerebral arteries. *J. Physiol.*, **502**, 259-264.

Nilius, B., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., Vennekens, R., Freichel, M., Wissenbach, U., Flockerzi, V. (2003): Voltage dependence of the Ca^{2+}-activated cation channel TRPM4. *J. Biol. Chem.*, **278**, 30813-30820.

Noack, T., Edwards, G., Deitmer, P., Greengrass, P., Morita, T., Andersson, P. O., Criddle, D., Wyllie, M. G., Weston, A. H. (1992): The involvement of potassium channels in the action of ciclazindol in rat portal vein. *Br. J. Pharmacol.*, **106**, 17-24

Mano, I., Discoll, M, (1999): DEG/EnaC channels: a touchy superfamily that watches its salt. *Bioessays*, **21**, 568-578

Okamoto, Y., Kashihara, T., Nonogaki, A. Obara, K., Nakayama, K. (2004): Differential interplay between protein kinase C and Rho-kinase in the Endothelin-1-induced and pressure-induced contractions of rat posterior cerebral artery. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **44**, S265-S267

Osol, G. Lather, I., Cipolla, M. (1991): Protein kinase C modulates basal myogenic tone in resistance arteries from the cerebral circulation. *Circ. Res.*, **68**, 359-367

Osol, G., Brekke, J. F., McElroy-Yaggy, K., Gokina, N. I. (2002): Myogenic tone, reactivity and forced dilatation: a three phase model of in vitro arterial myogenic behaviour. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **283**, H2260-H2267

Pistea, A., Bakker, E. N. T. P., Spaan, J. A. E., VanBavel, E. (2005): Flow inhibits inward remodelling in cannulated porcine small coronary arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **289**, 2632-2640

Reber, K. M., Nowicki, P. T. (1998): Pressure and flow characteristics of terminal mesenteric arteries in postnatal intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **274**, G290-G298

Roman, R. J. (2002): P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol. Rev.*, **82**, 131-185

Sipkema, P., Westerhof, N., Hoogerwerf, N. (1997): Rate of the myogenic response increases with the constriction level in rabbit femoral arteries. *Annals of Biomedical Engineering,* **25**, 278-285

Schmidt, R. F., Thews, G., Lang, F. (2005): Physiologie des Menschen. 29. Auflage, S. 136 ff.

Schubert, R., Zutz, S. (1996): Factors regulating the level of the basal myogenic tone do not necessarily modulate the myogenic response of rat tail small arteries. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.*, **16**, 87 (Abstract)

Schubert, R., Gagov, H. S. (1997): Regulation of vascular smooth muscle calcium-activated potassium channels by intracellular pH. *Pflugers Arch.*, **434**, R102 Y(Abstract)

Schubert, R., Mulvany, M. J. (1999): The myogenic response: established facts and attractive hypothesis. *Clin. Sci. (Lond.)*, **96**, 313-326

Schubert, R., Kalentchuk, V. U., Krien, U. (2002): Rho kinase inhibition partly weakens myogenic reactivity in rat small arteries by changing calcium sensitivity. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **283**, H2288-H2295

Schubert, R., Lindington, D., Bolz, S. S. (2008): The emerging role of Ca^{2+} sensitivity regulation in promoting myogenic vasoconstriction. *Cardiovasc. Res.* **77**, 8-18.

Slish, D. F., Welsh, D. G., Brayden, J. E. (2002): Diacylglycerol and protein kinase C activate cation channels involved in myogenic tone. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **283**, H2196-H2201

Seow, C. Y. (2000): Response of arterial smooth muscle to length perturbation. *J. Appl. Physiol.* **89**, 2065-2072

Setoguchi, M., Ohya, Y., Abe, I., Fujishima, M. (1997): Stretch-activated whole-cell currents in smooth muscle cells from mesenteric resistance artery of guinea-pig. *J. Physiol.*, **501**, 343-353

Somlyo, A. P., Somlyo, A. V. (2000): Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J. Physiol. (Lond.)*, **522**, 171-185

Sorop, O., Spaan, J. A. E., VanBavel, E. (2002): Pulsation-induced dilation of subendocardial and subepicardial arterioles: effect on vasodilator sensitivity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **282**, H311-H319

Sorop, O., Bakker, E. N. T. B., Pistea, A., Spaan, J. A. E., VanBavel, E. (2006): Calcium channel blockade prevents pressure-dependent inward remodeling in isolated subendocardial resistance vessels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.,* **291**, H1236-H1245

Spurrell, B. E., Murphy, T. V., Hill, M. A. (2000): Tyrosine phosphorylation modulates arteriolar tone but is not fundamental to myogenic response. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **278**, H373-H382

Stephens, N. L., Seow, C. Y., Halayko, A. J., Jiang, H. (1992): The biophysics and biochemistry of smooth muscle contraction. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **70**, 515-531

Sun, D., Kaley, G., Koller, A. (1994): Characteristics and origin of myogenic response in isolated gracilis muscle arterioles. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **266**, H1177-H1183

Sun, D., Huang, A., Koller, A., Kaley, G. (1995): Flow-dependent dilation and myogenic constriction interact to establish the resistance of skeletal muscle arterioles. *Microcirc.*, **2**, 289–295

Takenaka, T., Kanno, Y., Kitamura, Y., Hayashi, K., Suzuki, H., Saruta, T. (1996): Role of chloride channels in afferent arteriolar constriction. *Kidney Int.*, **50**, 864-872

Thorin-Trescases, N., Bartolotta, T., Hyman, N., Penar, P. L., Walters, C. L., Bevan, R. D., Bevan, J. A. (1997): Diameter dependence of myogenic tone of human pial arteries. Possible relation to distensibility. *Stroke*, **28**, 2486-2492

VanBavel, E., Wesselmann, J. P. M. und Spaan, J. A. E. (1998): Myogenic activation and calcium sensitivity of cannulated rat mesenteric small arteries. *Circ. Res.*, **82**, 210-220

VanBavel, E., Bakker, E. N. T. P., Pistea, A., Sorop, O., Spaan, J. A. E. (2006): Mechanics of microvascular remodelling. *Clin. Hem. and Microcirc.*, **34**, 35-41

Watanabe, J., Keitoku, M., Hangai, K., Karibe, A., Takishima, T. (1993): Alpha-Adrenergic augmentation of myogenic response in rat arterioles: role of protein kinase C. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **264**, H547-H552

Watanabe, J., Horiguchi, S., Karibe, A., Keitoku, M., Takeuchi, M., Satoh, S., Takishima, T., Shirato, K., (1994): Effects of ryanodine on development of myogenic response in rat small skeletal muscle arteries. *Cardiovasc. Res.*, **28**, 480-484

Watanabe, J., Horiguchi, S., Keitoku, M., Karibe, A., Takeuchi, M., Suzuki, S., Satoh, S., Shirato, K. (1996): The role of extracellular cations in the development of myogenic contraction in isolated rat small arteries. *Jpn. Circ. J.*, **60**, 239-246

Wesselman, J. P., VanBavel, E., Pfaffendorf, M., Spaan, J. A. (1996): Voltage-operated calcium channels are essential for the myogenic responsiveness of cannulated rat mesenteric small arteries. *J. Vasc. Res.,* **33**, 32-41

Wesselmann, J. P., Schubert, R., VanBavel, E., Nolsson, H., Mulvany, M. J. (1997): K_{Ca}-channel blockade prevents sustained pressure-induced depolarization in rat mesenteric small arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **272**, H2241-H2249

Wesselmann, J. P., Spaan, J. A., van der Meulen, E. T., VanBavel, E. (2001): Role of protein kinase C in myogenic calcium-contraction coupling of rat cannulated mesenteric small arteries. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **28**, 848-855

Wellmann, G. C., Bonev, A. D., Nelson, M. T., Brayden, J. E. (1996): Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide and Ca^{2+}-dependent K^+ channels. *Circ. Res.*, **79**, 1024-1030

Welsh, D. G., Nelson, M. T., Eckmann D. M., Brayden, J. E., (2000): Swelling-activated cation channels mediate depolarization of rat cerebrovascular smooth muscle by hyposmolarity and intravascular pressure. *J. Physiol.*, **527**, 139-148

Welsh, D. G., Morielli, A. D., Nelson, M. T., Brayden, J. E., (2002): Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circ. Res.*, **90**, 248-250

Williamson, G. A., Loutzenhiser, R., Wang, X., Griffin, K., Bidani, A. K. (2008): Systolic and mean blood pressures and afferent arteriolar myogenic response dynamics: a modeling approach. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **295**, R1502–R1511

Wu, X., Davis, M. J. (2001): Characterization of stretch-activated cation current in coronary smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **280**, H1751-H1761

Yamazaki, J., Duan, D., Janiak, R., Kuenzli, K., Horowitz, B., Hume, J. R. (1998): Functional and molecular expression of volume-regulated chloride channels in canine vascular smooth muscle cells. *J. Physiol.*, **507**, 729-736

Zimmermann, P. A., Knot, H. J., Stevenson, A. S., Nelson, M. T. (1997): Increased myogenic tone and diminished responsivness to ATP-sensitive K^+ channel openers in cerebral arteries from diabetic rats. *Circ. Res.*, **81**, 996-1004

Zou, A. P., Imig, J. D., Kaldunski M, Ortiz de Montellano, P. R., Sui, Z., Roman, R. J. (1994): Inhibition of renal vascular 20-HETE production impairs autoregulation of renal blood flow. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **266,** F275-F282

Zou, H., Ratz, P. H. und Hill, M. A. (1995): Role of myosin phosphorylation and $[Ca^{2+}]_i$ in myogenic reactivity and arteriolar tone. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **269**, H1590-H1596

Zou, H., Ratz, P. H., Hill, M. A. (2000): Temporal aspects of $[Ca^{2+}]_i$ and myosin phosphorylation during myogenic and norepinephrin-induced arteriolar constriction. *J. Vasc. Res.*, **37**, 556-567

Abkürzungen

CYP_{450}	Cytochrom P_{450}
DAG	Diacylglycerin
DEG/ENaC	Degenerin/epitheliale Natriumkanäle
DMSO	Dimethylsulfoxid
EETs	Epoxyeicosatrienoidsäuren
Fura-2-AM	Fura-2-Acetoxymethylester 2-[6-[bis[2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxoethyl]amino]-5-[2- [2-[bis[2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxoethyl]amino]-5-methylphenoxy]ethoxy]-2-benzofuranyl]-5-oxazolecarboxylic acid (acetyloxy)methylester
20-HETE	20-Hydroxyeicosatetraensäure
Hz	Hertz (1/s)
IP_3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
MLC-K	Myosin-Leichtketten-Kinase
NO	Stickoxid
PIP_2	Phosphatidylinosindiphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLA_2	Phospholipase A_2
TRP	transient receptor potential

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2002 bis November 2010 unter der Leitung von Prof. Dr. med. R. Schubert an der Universität Rostock angefertigt.

Herrn Prof. Dr. med. R. Schubert danke ich für die Überlassung des Themas und Ermöglichung der Promotion sowie für die vielen wertvollen Diskussionen und hilfreichen Anregungen.

Mein Dank gilt allen Angestellten und Mitarbeitern des Institutes für Physiologie der Universität Rostock, insbesondere Frau dipl.-biol. U. Mikkat und Frau dipl.-chem. K. Porath, deren Rat und Hilfe ich oft und gerne in Anspruch genommen habe.

Meine Freunde und Kollegen haben durch Unterstützung, Verständnis und Aufmunterung einen wichtigen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meinen Eltern danke ich für ihre langjährige Unterstützung und für ihre beständige Liebe.

Selbständigkeitserlärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Hamburg, im November 2010 André Budrowitz