

AUS DEM OSCAR-LANGENDORFF-INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE

DIREKTOR: PROF. DR. MED. R. KÖHLING

**UNTERSUCHUNGEN ZUR NORADRENERGEN,
PURINERGEN UND PEPTIDERGEN INNERVATION DER
V. CAVA UND V. FEMORALIS DER RATTE**

INAUGURALDISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER MEDIZIN
DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON

LUISE KÄSTNER | GEB. AM 1. MÄRZ 1992 IN BRAUNSCHWEIG

ROSTOCK | JUNI 2023

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004705

DOKTORARBEIT

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

DEKAN: PROF. DR. MED. EMIL REISINGER

1. GUTACHTER: PROF. DR. MED. ROBERT PATEJDL, INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE, HMU ERFURT; EHEM. OSCAR LANGENDORFF-INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE, UNIVERSITÄT ROSTOCK
2. GUTACHTER: PROF. DR. MED. BURKHARD HINZ, INSTITUT FÜR PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE, UNIVERSITÄT ROSTOCK
3. GUTACHTER: PROF. DR. MED. FRIEDERIKE STUMPFF, INSTITUT FÜR VEGETATIVE PHYSIOLOGIE, HMU POTSDAM

DATUM DER EINREICHUNG: 8. JUNI 2023
DATUM DER VERTEIDIGUNG: 16. APRIL 2024

FÜR MEINE FAMILIE

Inhalt

| | |
|--|-----------|
| 1 Einleitung und Fragestellung | 11 |
| 1.1 Transmittersysteme | 14 |
| 1.1.1 Noradrenalin (NA) | 14 |
| 1.1.2 Adenosintriphosphat (ATP)..... | 14 |
| 1.1.3 Neuropeptid Y (NPY)..... | 15 |
| 1.2 Tonusregulation auf lokaler Ebene..... | 15 |
| 1.3 Eigenschaften der untersuchten Organe | 17 |
| 1.3.1 V. cava..... | 17 |
| 1.3.2 V. femoralis | 18 |
| 1.4 Klinische Bedeutung | 18 |
| 1.4.1 Physiologische Reaktion bei Blutdruckabfall..... | 19 |
| 1.5 Fragestellung | 19 |
| 2 Material und Methoden..... | 21 |
| 2.1 Organbad | 21 |
| 2.1.1 Organpräparation..... | 23 |
| 2.1.2 Kalibrierung..... | 24 |
| 2.1.3 Pharmakologische Experimente | 25 |
| 2.1.4 Experimente mit Elektrischer Feldstimulation (EFS) | 25 |
| 2.1.4.1 Tetrodotoxin (TTX)-Test..... | 27 |
| 2.1.4.2 EFS-Stimulationsprotokolle | 29 |
| 2.1.5 Lösungen und Substanzen | 29 |
| 2.1.5.1 Präparierlösung..... | 29 |
| 2.1.5.2 Krebs-Ringer-Lösung | 29 |
| 2.1.5.3 Kalium | 30 |
| 2.1.5.4 Noradrenalin (NA)..... | 30 |
| 2.1.5.5 Tetrodotoxin (TTX)..... | 31 |
| 2.1.5.6 Adenosintriphosphat (ATP)..... | 31 |
| 2.1.5.7 Neuropeptid Y (NPY)..... | 31 |
| 2.1.5.8 Suramin | 31 |
| 2.1.5.9 BIBP3226 | 32 |
| 2.2 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie..... | 32 |
| 2.2.1 Substanzen..... | 32 |
| 2.2.1.1 Fixierlösung..... | 32 |
| 2.2.1.2 Pufferlösung (Phosphate-buffered saline = PBS)..... | 32 |
| 2.2.1.3 Primäre Antikörper..... | 32 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.2.1.4 | Sekundäre Antikörper..... | 33 |
| 2.2.1.5 | Seren..... | 33 |
| 2.2.2 | Herstellung von Semi-Dünn schnitten..... | 34 |
| 2.2.3 | Durchführung der indirekten Immunfluoreszenzfärbung..... | 34 |
| 2.2.4 | Mikroskopie..... | 35 |
| 2.3 | Statistische Auswertung | 36 |
| 3 | Ergebnisse..... | 37 |
| 3.1 | Referenzkontraktionen | 37 |
| 3.2 | Der Venentonus | 38 |
| 3.2.1 | Maximale Kraftentwicklung..... | 39 |
| 3.2.2 | Kraftentwicklung im Zeitverlauf..... | 43 |
| 3.3 | Kotransmission am glatten Muskel der Vene..... | 49 |
| 3.3.1 | Experimente mit Antagonisten | 49 |
| 3.3.1.1 | Suramin | 51 |
| 3.3.1.2 | BIBP3226 | 54 |
| 3.3.2 | Experimente mit Agonisten..... | 57 |
| 3.3.2.1 | Adenosintriphosphat (ATP)..... | 57 |
| 3.3.2.2 | Neuropeptid Y (NPY)..... | 60 |
| 3.4 | Fluoreszenzmikroskopie..... | 65 |
| 3.4.1 | P2X1-Rezeptor | 65 |
| 3.4.1.1 | Ergebnisse an V. cava und V. femoralis..... | 65 |
| 3.4.2 | P2X2-Rezeptor | 68 |
| 3.4.2.1 | Positivkontrolle am Mesenterialgefäßpräparat..... | 68 |
| 3.4.2.2 | Negativkontrolle | 69 |
| 3.4.2.3 | Ergebnisse an V. cava und V. femoralis..... | 70 |
| 3.4.3 | Neuropeptid Y (NPY)..... | 71 |
| 3.4.3.1 | Positivkontrolle am Hippocampuspräparat | 71 |
| 3.4.3.2 | Negativkontrolle | 72 |
| 3.4.3.3 | Ergebnisse an V. cava und V. femoralis..... | 73 |
| 4 | Diskussion | 74 |
| 4.1 | Methodendiskussion | 74 |
| 4.1.1 | Organbad | 74 |
| 4.1.2 | Elektrische Feldstimulation (EFS) | 74 |
| 4.1.3 | Fluoreszenzmikroskopie..... | 75 |
| 4.2 | Ergebnisdiskussion | 76 |
| 4.2.1 | Referenzkontraktionen | 76 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.2.2 | Der Venentonus | 76 |
| 4.2.3 | Antagonisten..... | 77 |
| 4.2.3.1 | Suramin | 77 |
| 4.2.3.2 | BIBP3226 | 78 |
| 4.2.4 | Agonisten..... | 79 |
| 4.2.4.1 | Adenosintriphosphat (ATP)..... | 79 |
| 4.2.4.2 | Neuropeptid Y (NPY)..... | 80 |
| 4.2.5 | Fluoreszenzmikroskopie..... | 80 |
| 4.2.6 | Unterschiede zwischen V. cava und V. femoralis | 81 |
| 4.3 | Ausblick..... | 82 |
| 5 | Zusammenfassung | 84 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 85 |
| 7 | Anhang..... | 91 |
| 7.1 | Weitere Abbildungen | 91 |
| 7.2 | Danksagung | 97 |
| 8 | Thesen..... | 98 |

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Zusammenhang zwischen venösem Füllungsdruck und Blutvolumen | 13 |
| Abbildung 2: Systemskizze Organbad | 22 |
| Abbildung 3: Organbadaufbau mit 8 Kanälen | 23 |
| Abbildung 4: Organhalter mit EFS-Elektroden und Verbindungskabel | 26 |
| Abbildung 5: Skizze zur Platzierung des Präparats am EFS-Organhalter | 27 |
| Abbildung 6: Ablauf des TTX-Tests zum Nachweis einer rein neurogenen Kontraktion..... | 28 |
| Abbildung 7: Vergleich der maximalen Kraftentwicklung bei Kaliumkontraktur und Aktivierung mit NA und EFS an der V. cava. | 37 |
| Abbildung 8: Vergleich der maximalen Kraftentwicklung bei Kaliumkontraktur und Aktivierung mit NA und EFS an der V. femoralis..... | 38 |
| Abbildung 9: Beispielhafte Originalaufzeichnung einer V. femoralis mit NA-Applikation ... | 40 |
| Abbildung 10: Beispielhafte Originalaufzeichnung einer V. femoralis mit EFS-Applikation | 41 |
| Abbildung 11: Darstellung der maximal erreichten Kraft der V. cava | 42 |
| Abbildung 12: Darstellung der maximal erreichten Kraft der V. femoralis | 43 |
| Abbildung 13: Zeit bis zum Erreichen des Peaks bei Präparaten der V. cava und Stimulation mit NA-Gabe in aufsteigender Konzentration. | 44 |
| Abbildung 14: Zeit bis zum Erreichen des Peaks bei Präparaten der V. cava und Stimulation mit EFS in aufsteigender Frequenz | 45 |
| Abbildung 15: Zeit bis zum Erreichen des Peaks bei Präparaten der V. femoralis und Stimulation mit NA-Gabe in aufsteigender Konzentration..... | 46 |
| Abbildung 16: Zeit bis zum Erreichen des Peaks bei Präparaten der V. femoralis und Stimulation mit EFS in aufsteigender Frequenz | 46 |
| Abbildung 18: Zeit von Kontraktionsbeginn bis zum Peak bei Präparaten der V. cava..... | 47 |
| Abbildung 19: Zeit von Kontraktionsbeginn bis zum Peak bei Präparaten der V. femoralis .. | 48 |
| Abbildung 20: Darstellung der Auswertemethode der Antagonistenexperimente | 50 |
| Abbildung 21: Durchschnittswerte der Kontraktionsamplituden der V. cava mit EFS- Einzelstimulationen und kumulativer Gabe von Suramin..... | 52 |
| Abbildung 22: Durchschnittswerte der Kontraktionsamplituden der V. femoralis mit EFS- Einzelstimulationen und kumulativer Gabe von Suramin..... | 53 |
| Abbildung 23: Durchschnittswerte der Kontraktionsamplituden der V. cava mit EFS- Einzelstimulationen und Gabe von BIBP3226..... | 55 |
| Abbildung 24: Durchschnittswerte der Kontraktionsamplituden der V. femoralis mit EFS- Einzelstimulationen und Gabe von BIBP3226..... | 56 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 25: Originalaufzeichnung einer V. femoralis bei Gabe von ATP | 57 |
| Abbildung 26: Darstellung der durchschnittlich erreichten Kontraktionsamplituden der V. cava-Präparate mit verschiedenen ATP-Konzentrationen und des Basaltonus | 58 |
| Abbildung 27: Darstellung der durchschnittlich erreichten Kontraktionsamplituden der V. femoralis-Präparate mit verschiedenen ATP-Konzentrationen und des Basaltonus..... | 59 |
| Abbildung 28: Originalaufzeichnung einer V. cava bei Gabe von NPY | 60 |
| Abbildung 29: Darstellung der durchschnittlich erreichten Kontraktionsamplituden der V. cava-Präparate mit verschiedenen NPY-Konzentrationen und des Basaltonus | 61 |
| Abbildung 30: Durchschnittlich erreichte Kontraktionsamplitude der V. femoralis-Präparate mit verschiedenen NPY-Konzentrationen und des Basaltonus..... | 62 |
| Abbildung 31: NA-Kontraktionen mit und ohne Anwesenheit von NPY an der V. cava | 63 |
| Abbildung 32: NA-Kontraktionen mit und ohne Anwesenheit von NPY an der V. femoralis | 64 |
| Abbildung 33: Immunfluoreszenzmikroskopie von Whole Mount-Präparaten der V. cava mit Anti-P2X1-Antikörper | 66 |
| Abbildung 34: Immunfluoreszenzmikroskopie von Whole Mount-Präparaten der V. femoralis mit Anti-P2X1-Antikörper | 67 |
| Abbildung 35: Immunfluoreszenzmikroskopie eines Mesenterialgefäßes ohne und mit Anti-P2X2-Antikörper | 68 |
| Abbildung 36: Immunfluoreszenzmikroskopie einer Kontrollfärbung ohne Applikation des primären Antikörpers von V. cava und Aorta bzw. A. und V. femoralis | 69 |
| Abbildung 37: Immunfluoreszenzmikroskopie mit Anti-P2X2-Antikörper von V. cava und Aorta bzw. V. femoralis | 70 |
| Abbildung 38: Immunfluoreszenzmikroskopie des Hippocampus ohne und mit Anti-NPY-Antikörper | 71 |
| Abbildung 39: Immunfluoreszenzmikroskopie einer Kontrollfärbung ohne Applikation des primären Antikörpers von V. cava und Aorta bzw. A. und V. femoralis | 72 |
| Abbildung 40: Immunfluoreszenzmikroskopie mit Anti-NPY-Antikörper von V. cava und Aorta bzw. A. und V. femoralis | 73 |
| Abbildung 41: Durchschnittswerte der Kontraktionsamplituden der V. femoralis mit EFS-Einzelstimulationen und kumulativer Gabe von Suramin..... | 91 |
| Abbildung 42: Durchschnittswerte der Kontraktionsamplituden der V. femoralis mit EFS-Einzelstimulationen an Kontrollpräparaten zur Erfassung von Zeiteffekten | 92 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 43: Durchschnittswerte der Kontraktionsamplituden der V. cava mit 30 Sekunden langer, hochfrequenter (20Hz) EFS und Suramin, sowie Kontrolle zur Erfassung von Zeiteffekten | 93 |
| Abbildung 44: Durchschnittswerte der Kontraktionsamplituden der V. femoralis mit 30 Sekunden langer, hochfrequenter (20Hz) EFS und Suramin, sowie Kontrolle zur Erfassung von Zeiteffekten | 94 |
| Abbildung 45: Durchschnittswerte der Kontraktionsamplituden der V. cava mit 30 Sekunden langer, hochfrequenter (20Hz) EFS und BIBP3226, sowie Kontrolle zur Erfassung von Zeiteffekten | 95 |
| Abbildung 46: Durchschnittswerte der Kontraktionsamplituden der V. femoralis mit 30 Sekunden langer, hochfrequenter (20Hz) EFS und BIBP3226, sowie Kontrolle zur Erfassung von Zeiteffekten | 96 |
| | |
| Tabelle 1: Wirkungsweisen der Tonusregulation auf lokaler Ebene | 16 |
| Tabelle 2: Eigenschaften verschiedener Venentypen..... | 17 |
| Tabelle 3: Parameter der verschiedenen EFS-Protokolle..... | 29 |
| Tabelle 4: Zusammensetzung der Präparierlösung | 29 |
| Tabelle 5: Zusammensetzung der Krebs-Ringer-Lösung..... | 30 |
| Tabelle 6: Zusammensetzung der PBS-Pufferlösung..... | 32 |
| Tabelle 7: Verwendete primäre Antikörper | 33 |
| Tabelle 8: Verwendete sekundäre Antikörper..... | 33 |
| Tabelle 9: Verwendete Seren | 33 |
| Tabelle 10: Eigenschaften der verwendeten Fluorophore..... | 36 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| NA | Noradrenalin |
| TTX | Tetrodotoxin |
| DAG | Diacylglycerin |
| IP3 | Inositoltriphosphat |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| NPY | Neuropeptid Y |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Na ⁺ | Natrium |
| Ca ²⁺ | Calcium |
| PBS | Phosphat Buffered Saline |
| PFA | Paraformaldehyd |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| VC | Vena cava |
| VF | Vena femoralis |
| Vv. | Venae |
| V. | Vena |
| A. | Arteria |
| Aa. | Arteriae |
| sbt | standard basal tone |
| ZVD | Zentralvenöser Druck |
| cGMP | Zyklisches Guanosinmonophosphat |
| EFS | Elektrische Feldstimulation |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| mM | mmol/l |
| M | mol/l |
| IQR | Interquartilsabstand |
| SD | Standardabweichung |

1 Einleitung und Fragestellung

Die neurogene Kontrolle des Gefäßtonus leistet einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung eines stabilen Blutkreislaufs. Der Tonus der glatten Gefäßmuskulatur ist verantwortlich für die Einstellung des Gefäßdurchmessers und der Compliance. Der Gefäßdurchmesser bestimmt zum einen als global gemittelte Größe den systemischen Blutdruck, zum anderen ist er eine maßgebliche Einflussgröße für die lokale Durchflussrate und somit für die Perfusion des nachgeschalteten Gewebes. Näherungsweise dargestellt werden kann dieser Sachverhalt anhand des Hagen-Poiseuille'schen Gesetzes:

$$V/t = (r^4 \times \pi \times \Delta P) / (8 \times \eta \times l)$$

Legende:

V/t : Volumen/Zeit

r^4 : vierte Potenz des Innenradius

π : Pi

ΔP : Druckdifferenz

η : Viskosität

l : Länge des betrachteten Rohrabschnittes

Das Gesetz trifft die wichtige Aussage, dass die Durchblutung, wie an der vierten Potenz des Gefäßradius ersichtlich, maßgeblich durch die Einstellung der Gefäßweite gesteuert wird.

Zudem fasst das venöse System 70% des Blutvolumens, Venen werden daher auch als „Kapazitätsgefäß“ bezeichnet. Sie weisen eine weitaus größere Compliance als Arterien auf (Gelman 2008). Schwankungen im Blutvolumen können so durch die bedarfsgerechte Einstellung der großen potentiellen Füllungskapazität aufgefangen werden.

Durch ihre Kontraktilität und die damit einhergehende Fähigkeit, große Blutvolumina zu mobilisieren, üben die Venen Einfluss auf die Druck- und Volumenverhältnisse des kardiovaskulären Systems aus (Guyton et al. 1957). Diese Dynamik zeigt sich beispielsweise durch die Steuerung der Vorlast am Herzen und den daraus resultierenden Einfluss auf den Frank-Starling-Mechanismus: Das durch den venösen Rückstrom erzeugte ventrikuläre Blutvolumen zum Ende der Diastole hat einen maßgeblichen Einfluss auf den kardialen Output.

Der Tonus der Venenmuskulatur ist für die Aufrechterhaltung eines physiologischen Zentralvenösen Drucks (ZVD) und damit einer adäquaten Blutfüllung des rechten Vorhofs verantwortlich und somit von essentieller Bedeutung für die kardiale Auswurfleistung und damit für die Stabilität des Kreislaufs (Gelman 2008). Zur Anpassung an verschiedene Anforderungen, wie zum Beispiel Lageänderungen oder physische Leistung ist deshalb eine stabile und kontinuierliche neurogene Tonuskontrolle notwendig (Feigofsky und Fedorowski 2020).

Die Kontrolle und stetige Neujustierung des Tonus geschieht über das vegetative Nervensystem und dessen Aktivierung des Sympathikus. Die für die Gefäßinnervation verantwortlichen postganglionären sympathischen Fasern befinden sich in Form eines perivaskulären Nervengeflechts zwischen Adventitia und Media (Ekblad et al. 1984). Die Signalübermittlung erfolgt über Varikositäten, kleine Aufreibungen der Nervenfasern, die die Funktion einer Synapse erfüllen. Der Parasympathikus hingegen spielt bei der Tonusregulation eine untergeordnete Rolle und kann nur auf indirektem Wege einen Einfluss ausüben (Klinke et al. 2010).

Im Folgenden ist die Abhängigkeit des intravenösen Füllungsdrucks von der Sympathikusaktivität und dem Blutvolumen dargestellt (Abbildung 1).

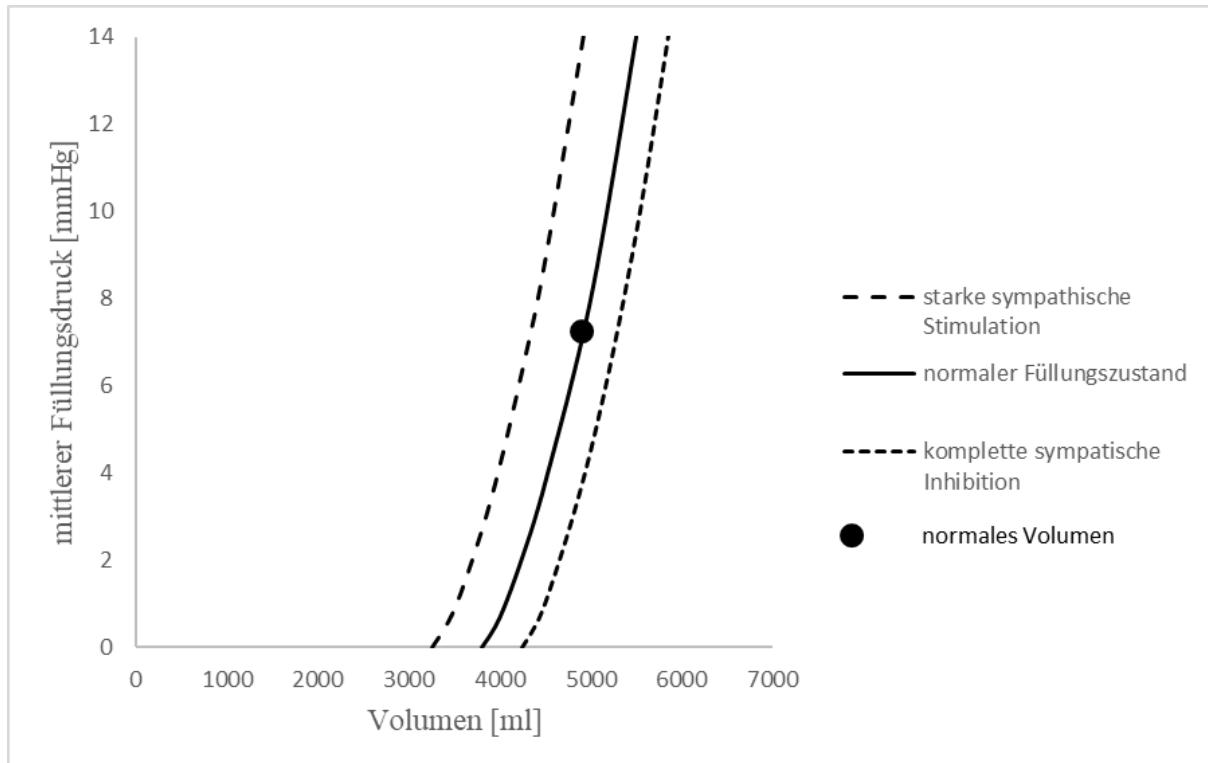


Abbildung 1: Zusammenhang zwischen venösem Füllungsdruck und Blutvolumen

in Abhängigkeit der Aktivität des Sympathikus und dessen aktivierender Wirkung auf den Gefäßtonus, sowie der daraus resultierenden Kapazitätsänderung (nach Guyton und Hall 2000, S. 217). Es wird deutlich, dass schon geringe Änderungen im Sympathikotonus bei gleichbleibendem Volumen massive Schwankungen im venösen Füllungsdruck verursachen können. Gewisse Volumenänderungen können durch sympathische Aktivität ausgeglichen werden.

Während arterielle Gefäße aufgrund häufiger und vielfältiger Pathologien und der entsprechenden Suche nach Behandlungsmöglichkeiten bereits umfassend beforscht wurden, existiert zur neurogenen Tonussteuerung von Venen bislang nur eine recht kleine Anzahl an Arbeiten und Daten. Es wird davon ausgegangen, dass der Venentonus ähnlich gesteuert wird, wie der von Arterien, also durch das vegetative Nervensystem kontrolliert und maßgeblich durch die Transmitterfunktion von Noradrenalin (NA) beeinflusst. So ist bekannt, dass der Tonus von Venen durch Infusion von NA (Ricci 2017) sowie eine Hemmung des Abbaus von NA erhöht wird (Ramelet 2011). Bei *in vitro* Experimenten konnte an Venen eine kräftige kontraktile Wirkung von NA festgestellt werden, wenngleich die Kraftentwicklung aufgrund der schwächer ausgeprägten Muskulatur geringer ausfällt als an Arterien (Blaylock und Wilson 1995). Jedoch besteht verglichen mit den jeweils korrespondierenden Arterien eine höhere Sensitivität von distalen und mesenterialen Venen gegenüber NA (Blaylock und Wilson 1995;

Enouri et al. 2011). Die Dichte sympathischer Nervenfasern wird an Venen als geringer beschrieben als an Arterien (Pernow 1988).

Die physiologische Relevanz der genannten Befunde in Bezug auf die Erhaltung und Modulation des Venentonus ist nur schwer abschätzbar. Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht daher die funktionelle Analyse einzelner Komponenten der neurogenen Tonuskontrolle isolierter Venen.

1.1 Transmittersysteme

Die Wirkung der zentral gesteuerten Achse der Tonusmodulation wird über die Ausschüttung von Neurotransmittern aus den Varikositäten perivaskulärer Nervenfasern vermittelt. Wie an arteriellen Gefäßen verschiedener Spezies nachgewiesen, sind neben NA auch die Transmitter ATP und NPY in die Tonussteuerung des glatten Gefäßmuskels involviert (Ekblad et al. 1984; Malmström 1997; Sheng und Zhu 2018). Die transmitterhaltigen Vesikel der Varikositäten, die bei Aktivierung ihren Inhalt entleeren, geben dabei im Sinne einer Kotransmission unterschiedliche Transmitter gleichzeitig frei. Diese können sich auch gemeinsam innerhalb des gleichen Vesikels befinden (Burnstock 1987; Sheng und Zhu 2018). Unter Kotransmission versteht man hierbei das Synthetisieren, Speichern und Ausschütten mehrerer Transmitter aus derselben Nervenfaser (Burnstock und Ralevic 1994). Historisch bedingt werden die Wirkungen von NPY und ATP wegen ihrer fehlenden Blockierbarkeit durch Anticholinergika und Sympatholytika auch als NANC-Effekte bezeichnet (non-adrenerg und non-cholinerg) (Modin 1994; Ralevic und Dunn 2015).

1.1.1 Noradrenalin (NA)

Das Katecholamin NA ist der am besten bekannte konstriktiv wirkende Transmitter im Gefäßsystem. Die Wirkung wird hauptsächlich durch den metabotropen, Gq-Protein-aktivierenden α 1-Rezeptor vermittelt. Eine komplexe Signalkaskade führt u.a. über Phospholipase C, Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und somit zu einer Kontraktion der Muskelzelle (Wegener et al. 2014). Im Rahmen der Sympathikusaktivität hat NA weitere Wirkungsbereiche über andere Rezeptoren.

1.1.2 Adenosintriphosphat (ATP)

Die konstriktiv wirkende Signalkaskade des Nukleotids ATP als Neurotransmitter läuft über die ionotrope P2X-Rezeptor-Familie. Der P2X-Rezeptor ist als nicht-selektiver Kationenkanal für die frühe, schnelle Komponente der Depolarisation und somit der Kontraktionsantwort

verantwortlich (Enrique et al. 2012; North 2016). ATP als Transmitter hat auch unabhängig von NA einen konstriktiven Effekt (Warland und Burnstock 1987).

Am Gefäßmuskel findet sich vorherrschend der Rezeptorsubtyp P2X1 (Sheng und Zhu 2018; Nichols et al. 2014; Wier et al. 2009). Auch P2X2-, P2X4- und P2X7-Rezeptoren konnten an arteriellen Gefäßen verschiedener Gewebe nachgewiesen werden (Hansen et al. 1999; Turner et al. 2003; Ralevic und Dunn 2015; Li et al. 2020). Über am Endothel befindliche metabotrope P2Y-Rezeptoren kann ATP jedoch auch eine relaxierende Wirkung entfalten (Burnstock 2018).

1.1.3 Neuropeptid Y (NPY)

Das Neuropeptid Y (NPY) wirkt an Gefäßen über den metabotropen Y1-Rezeptor und bewirkt die späte, lang wirkende Komponente der Kontraktion (Modin 1994; Lundberg und Modin 1995). Die Ausschüttung des Kotransmitters NPY hat an arteriellen Gefäßen einen synergistischen Effekt auf die vasokonstriktive Wirkung von NA, bei Experimenten an isolierten Arterien *in vitro* zeigt NPY jedoch kaum einen eigenständigen konstriktiven Effekt (Ekblad et al. 1984; Wier et al. 2009). Experimente an venösen Gefäßen verschiedener Gewebe zeigen hingegen eine deutliche kontraktile Wirkung von NPY, während kein synergistischer Effekt auf die Wirkung von NA festgestellt werden konnte (Edvinsson et al. 1984; Tsurumaki et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass bei verschiedenen Venen mehrerer Spezies im Vergleich zu den korrespondierenden Arterien eine nur geringe Dichte von NPY-positiven Nervenfasern in der Adventitia nachzuweisen ist, wobei die Dichte von großen zentralen venösen Gefäßen hin zu peripheren Venen zunimmt (Ekblad et al. 1984).

1.2 Tonusregulation auf lokaler Ebene

Neben der beschriebenen zentralen Achse der Tonusregulation von Gefäßen, die über die Innervation des Gefäßmuskels gesteuert wird, ist als weitere wichtige Einflussgröße das lokale Geschehen am Gefäß zu nennen. Hierbei handelt es sich um Gewebsmetabolite und -hormone, die im Rahmen von lokal herrschenden Bedingungen, Pathologien oder auch der Belastungssituation des vom jeweiligen Gefäß versorgten Gewebes ausgeschüttet werden und ihre Wirkung entfalten (Ricci 2017). Die Wirkungsweisen sind vielfältig und finden auch überlappend statt (Persson 1996). Grundsätzlich gilt, dass stark aktivierte lokale Mechanismen die neurogene Tonusregulation in ihrer Wirksamkeit übersteigen, dieses Phänomen wird auch als „funktionelle Sympatholyse“ bezeichnet; eine zentrale Rolle in der Synthese und

Ausschüttung der lokalen vasomotorisch wirksamen Substanzen spielt das Gefäßendothel (Marshall 2015; Hearon et al. 2016).

Beispiele für lokal wirksame Einflussgrößen sind die lokale Entzündungsreaktion, verstärkte Muskelarbeit und deren Auswirkung auf die zuführenden und ableitenden Blutgefäße sowie die Steigerung des Drucks im Gefäßsystem, die mit einer Erhöhung der Schubspannung und Dehnung der Gefäße einhergeht (siehe Tabelle 1).

| | Entzündung | Muskelarbeit | Schubspannung |
|------------------|---|-----------------|----------------|
| Substanz | Eikosanoide, v.a. Prostaglandine | Adenosin | NO |
| Wirkung | Vasodilatativ, können auch vasokonstriktiv wirken | Vasodilatativ | Vasodilatativ |
| Ort der Synthese | Endothel | Alle Zellen | Endothel |
| Quelle | (Gutterman et al. 2016; Cines et al. 1998) | (Marshall 2007) | (Persson 1996) |

Tabelle 1: Wirkungsweisen der Tonusregulation auf lokaler Ebene

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Wirkung des Sympathikus einen Grundtonus aufrechterhält, während anforderungsabhängig benötigte Durchblutungssteigerungen lokal durch sowohl endothelabhängige als auch –unabhängige Reaktionen ermöglicht werden.

1.3 Eigenschaften der untersuchten Organe

Die Experimente der vorliegenden Studie wurden an isolierten venösen Gefäßen von Ratten durchgeführt. Es bestehen im venösen Schenkel des Gefäßsystems große Unterschiede zwischen den verschiedenen Venen und ihrer Funktion und Beschaffenheit. Im Allgemeinen nimmt etwa die Dicke der Media relativ zum Gefäßdurchmesser von distal nach proximal ab, was bedeutet, dass periphere Venen zwar eine größere Kontraktilität, jedoch eine geringere Compliance aufweisen. Weitere Besonderheiten in ihren Eigenschaften zeigen die Splanchnikus- und Hautvenen (siehe Tabelle 2).

| | Große proximale Venen | Distale Venen | Venen im Splanchnikus-gebiet | Oberflächliche Hautvenen |
|--------------------------|--|----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Mediadicke | + | +++ | ++ | ++ |
| Compliance | ++ | + | +++ | ++ |
| Aktivierungs-modalitäten | Sympathikus | Sympathikus | Sympathikus | Sympathikus, Temperatur |
| Dichte der Innervierung | ++ | + | ++ | +++ |
| Quelle | (Tucker et al. 2021; Nakazato et al. 1982) | (Campos Munoz et al. 2021) | (Noble et al. 1998; Gelman 2008) | (Rowell 1977; Rusch et al. 1981) |

Tabelle 2: Eigenschaften verschiedener Venentypen

Die in dieser Studie untersuchten Venen sind der ersten (V. cava) bzw. einer Mischform im Rahmen des Kontinuums zwischen der ersten und zweiten beschriebenen Gruppe (V. femoralis) zuzuordnen. Es wurden aufgrund der guten Zugänglichkeit und der vergleichsweise einfachen Präparation, sowie der bereits teilweise bestehenden morphologischen und funktionellen Charakterisierung große Gefäße für die Experimente ausgewählt. Zur Untersuchung von Unterschieden zwischen der zentralen V. cava und einem Gefäß weiter in der Peripherie fiel die Wahl auf die V. femoralis, da aufgrund der Anatomie Unterschiede im Kontraktionsverhalten möglich erschienen, das Gefäßkaliber jedoch die Anwendung der gleichen Methode zuließ.

1.3.1 V. cava

Die V. cava ist das größte venöse Gefäß des Körpers. Sie gliedert sich in die V. cava superior, welche den Gefäßanteil kranial des Herzens ausmacht, und die V. cava inferior (bei Tieren V.

cava caudalis), welche aus einem abdominellen Teil zwischen Zusammenfluss der beiden Vv. iliaca communes und Eintritt in die Thoraxhöhle durch das Zwerchfell, sowie einem thorakalen Teil bis zur Einmündung ins Herz besteht. Die V. cava nimmt das gesamte sauerstoffarme Blut aus der Körperperipherie auf und führt es dem rechten Herzen zu. Es handelt sich um ein dünnwandiges Gefäß mit geringer Mediadicke (Klinke et al. 2010). Die V. cava setzt sich aus Abschnitten unterschiedlicher embryonaler Herkunft zusammen, die morphologische und funktionelle Differenzen aufweisen (Shigei et al. 1978).

1.3.2 V. femoralis

Die Vv. femorales sind paarige Gefäße, sie nehmen das sauerstoffarme Blut der unteren Extremität auf. Am Leistenkanal münden sie in die Vv. iliaca externae, von dort in die Vv. iliaca communes und schließlich in die V. cava inferior. Normvarianten in ihrem Verlauf sind keine Seltenheit (Uhl et al. 2010). Als große, jedoch nicht zentrale venöse Gefäße ist ihre Mediadicke als mittelwertig zu beschreiben (Klinke et al. 2010).

1.4 Klinische Bedeutung

Die klinische Bedeutung einer intakten Venenfunktion ergibt sich durch die große potentielle Kapazität, die im venösen System bei vollständiger Relaxation der Gefäßmuskulatur entsteht. Das Blutvolumen verteilt sich auf die Gesamtheit der Kapazität, was zunächst eine venöse Hypotonie mit Abfall des zentralvenösen Druckes hat (Brown 2007). Dieser Effekt zieht eine Verringerung der Vorlast am Herzen nach sich, das Füllungs- und konsekutiv auch das Auswurfvolumen nehmen ab. Bei Übersteigung der Möglichkeiten der gegenregulatorischen Mechanismen kommt es zusätzlich zu einer arteriellen Hypotonie bzw. zur Kreislaufdekompensation (Gelman 2008).

Ursachen hierfür können pathologische Zustände wie die distributiven Schockformen als Extremform sein. Auch periphere neurologische Störungen im Rahmen einer autonomen Dysfunktion, wie etwa die Polyneuropathie als Spätfolge eines Diabetes mellitus, spielen eine Rolle (Goldberger et al. 2019). Des Weiteren kommen iatrogene Gründe wie die Verabreichung von blutdruckregulierenden Medikamenten wie Diuretika und Vasodilatatoren, aber auch die Verabreichung von Antidepressiva und Antipsychotika in Betracht (Rivasi und Ungar 2020; Smith et al. 2021).

1.4.1 Physiologische Reaktion bei Blutdruckabfall

Als Reaktion auf einen Blutdruckabfall, unabhängig vom pathophysiologischen Mechanismus, folgt als physiologischer Kompensationsversuch eine Aktivierung des Sympathikus. Die Ausschüttung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin hat im Folgenden mehrere Wirkungsweisen, die vorrangig über die metabotropen Adrenorezeptoren α_1 und β_1 zu beschreiben sind, wovon letzterer myokardspezifisch ist und hier nicht näher beschrieben werden soll.

Der α_1 -Rezeptor wirkt, wie unter 1.1.1 beschrieben, über ein Gq-Protein und eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels konstringierend auf die glatte Muskulatur. Diese Kaskade führt zunächst zu einer Venokonstriktion und einer Verringerung der Kapazität im venösen Schenkel des Gefäßsystems. Es kommt zu einem Anstieg des ZVD und des venösen Rückstroms und somit der Vorlast (Patel et al. 2008). Der erste Schauplatz sympathisch erzeugter Kompensation ist also das venöse Gefäßsystem, was durch die weitaus größere Reagibilität von Venen im Vergleich zu Arterien bei geringen Aktivierungsfrequenzen deutlich wird (Karim und Hainsworth 1976).

Die Vasokonstriktion im arteriellen Schenkel, die bei stärkerer Aktivierung des Sympathikus folgt, sorgt außerdem für eine Zunahme der Nachlast (Kalmar et al. 2018).

1.5 Fragestellung

In der Forschung zum glatten Muskel an verschiedenen Geweben gelten neben NA auch ATP und NPY als maßgebliche Player der konstriktiv wirkenden Transmission und damit der neurogenen Steuerung (Burnstock und Ralevic 1994; Modin 1994; Tsuru et al. 2002). Zum glatten Muskel an venösen Gefäßen im Speziellen gibt es dazu wenig Erkenntnisse, obgleich die Steuerung der Gefäßweite von Venen von immenser Bedeutung für die Stabilität des Blutkreislaufs ist. Diese Arbeit stellt eine Annäherung an die genauen Transmissionsmechanismen am glatten Venenmuskel dar und beleuchtet dazu neben der funktionellen Betrachtung auch die morphologischen Grundvoraussetzungen für das Vorhandensein von weiteren Transmittersystemen neben NA und dem Gq-Protein-Rezeptor.

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob an V. cava und V. femoralis der Ratte Unterschiede zwischen reiner NA-Aktivierung und endogener Aktivierung mittels EFS (Elektrischer Feldstimulation) bestehen, um die Beteiligung möglicher weiterer Transmittersysteme zu identifizieren. Im nächsten Schritt wurde der Frage nach weiteren beteiligten Rezeptoren nachgegangen. Zur Komplettierung der funktionellen Untersuchungen

wurden im Anschluss die vermuteten Effekte der möglichen Kotransmitter untersucht. Um das Vorhandensein der untersuchten Strukturen nachzuweisen, wurden zusätzlich Immunfluoreszenzfärbungen mit Markierung der untersuchten Rezeptoren bzw. Substanzen angefertigt.

2 Material und Methoden

Um Untersuchungen von Gefäßen und deren Kontraktionsverhalten möglichst nah am tatsächlichen Verhalten *in vivo* anzustellen, ist es notwendig, einen vollständigen Abschnitt des Gefäßes zu verwenden, also ein Präparat, das sämtliche Schichten und damit Zelltypen eines Gefäßes besitzt. Auf diese Weise beinhaltet die Untersuchung die Aktivität unterschiedlicher Gewebe und damit zahlreicher Strukturen, die auch *in vivo* Stellschrauben für den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur sind. Hierbei handelt es sich unter anderem um die durch NO und die lösliche Guanylatzyklase vermittelte relaxierende Funktion des Endothels, die kontraktile Kapazität der Media und um das in der Adventitia lokalisierte Nervengeflecht, welches über Varikositäten Transmitter ausschüttet und somit den neuronalen Einfluss auf den Tonus bestimmt.

2.1 Organbad

Das Organbad (Experimetria Ltd., Ungarn) ermöglicht durch seine Imitation der Verhältnisse *in vivo* eine genaue Betrachtung und Aufzeichnung der entstandenen Kraft bei Muskelkontraktion. Der Aufbau besteht im Wesentlichen aus doppelwandigen Glaszylinern, deren Wandzwischenraum mit auf physiologische 37°C beheiztem zirkulierendem *Aqua dest.* gefüllt ist. Das Innere jedes Glaszyinders wurde mit 20 ml einer modifizierten physiologischen Krebs-Lösung befüllt, welche das eingehängte Organ umspült und von einem wasserdampfgesättigten Carbogengasgemisch (95% O₂, 5% CO₂) durchperlt wird (Abbildungen 2 und 3).

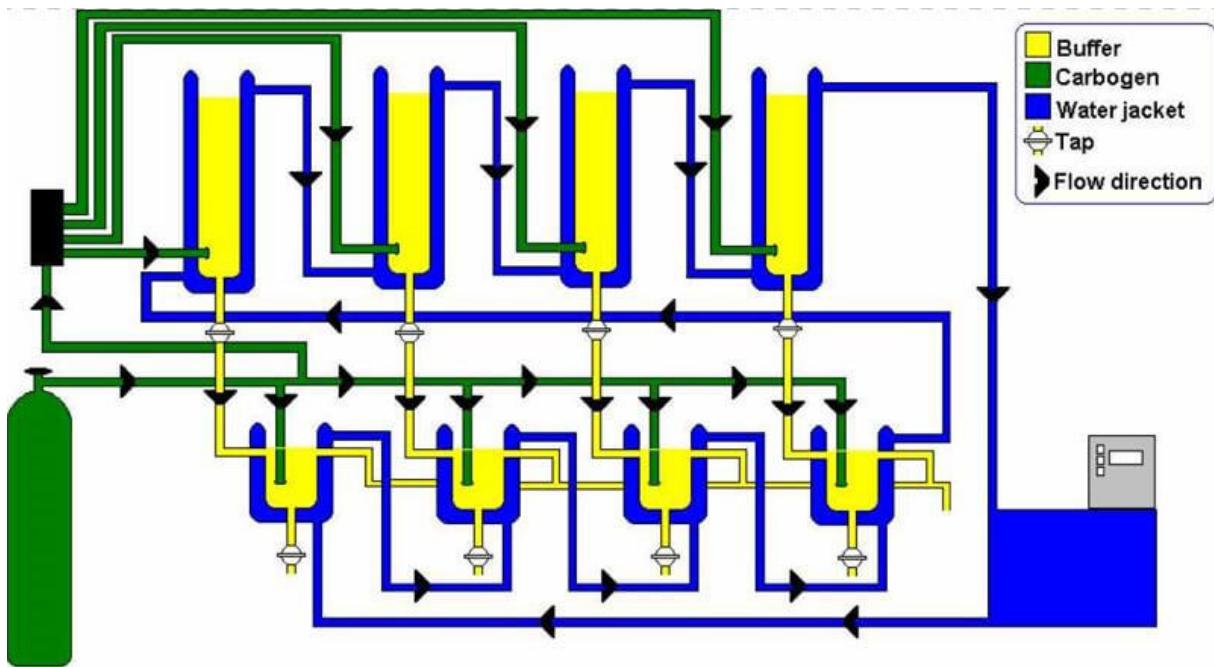


Abbildung 2: Systemskizze Organbad

Der gezeigte Aufbau entspricht dem in dieser Arbeit verwendeten System. Dargestellt sind die modifizierte physiologische Krebs-Ringer-Lösung (=Buffer), das auf physiologische 37°C beheizte Aqua dest. (=water jacket) im Zwischenraum der doppelwandigen Glaszyylinder, das ins Innere des Zylinders geleitete Carbogengasgemisch (=carbogen), sowie alle Hähne (=tabs) und Fließrichtungen (=flow direction). Mit freundlicher Genehmigung der MDE Research GmbH, Walldorf.

Mittels einer Halteapparatur kann das Organ in die Flüssigkeit eingebracht werden, wo es frei flottierend auf eine leichte Vordehnung gebracht und am oberen Pol mit Hilfe eines feinen Garns an einem Kraftabnehmer befestigt wird. Letzterer ist mit einer Messbrücke (TBM 4, WPI, Friedberg) und dieser mit einem PowerLab-Datenaufnahmesystem (PowerLab 8/30, ADInstruments Ltd, Oxford, UK) verbunden, was die analoge Information digitalisiert und die grafische Darstellung am Computer unter Nutzung des Programms LabChart (ADInstruments) ermöglicht. Die spätere Verarbeitung der Rohdaten wurde mit Hilfe des Programms LabChartReader (ADInstruments) durchgeführt. Die Entleerung des Organbads zu Spülzwecken erfolgte durch eine Pumpe (C10, Haake, Karlsruhe), zum Spülen und erneutem Auffüllen wurde vortemperierte und begaste Lösung aus einem oberhalb gelegenen Reservoirgefäß verwendet, welche über ein Schlauchsystem eingelassen werden konnte.



Abbildung 3: Organbadaufbau mit 8 Kanälen

Zu sehen sind die Reservoirs (oben), die Organbäder (unten), jeweils mit Auslassventilen, und die über den Organbädern befindlichen höhenverstellbaren Kraftabnehmer, an denen das Präparat aufgehängt wurde. Ganz links sind die Begasungsregler für alle Gefäße zu sehen.

2.1.1 Organpräparation

Die Experimente wurden mit den Vv. cavae und Vv. femorales von ausgewachsenen Wistar-Ratten beider Geschlechter durchgeführt. Für die Entnahme der Organe wurde das Tier unter einem Abzug mit Diethylether narkotisiert und nach Erlöschen der Reflexe durch Dekapitation getötet. Dieses Vorgehen gilt im Rahmen der gesetzlichen Tierschutzvorgaben als schmerzlose Tötung. Nach Schnitt der Haut bzw. des Fells und dem subkutanen Fett wurde die muskuläre Bauchdecke entlang der Linea alba durchtrennt, die Bauchhöhle eröffnet und das Darmkonvolut abgeklappt. Durch stumpfe Präparation wurden im Anschluss die V. cava und die Aorta freigelegt und zunächst 5 mm über dem Zusammenfluss der Vv. iliaca communes, dann am unteren Rand der Leber abgesetzt. Bei allen nachfolgend genannten V. cava-Präparaten handelt es sich also um die V. cava caudalis, die der V. cava inferior beim Menschen entspricht. Im Rahmen der späteren Präparation wurde der gewonnene Gefäßabschnitt in zwei Präparate geteilt. Zur Entnahme der Vv. femorales wurde die Oberschenkelhaut eingeschnitten und dann die bereits sagittal geteilte Bauchmuskulatur bis auf das Leistenband aufgeschnitten. Mit anschließender vorsichtiger Eröffnung des Leistenkanals mittels Durchtrennung des Leistenbandes und stumpfer Präparation durch die Faszienschichten am Oberschenkel wurde die Gefäß-Nerven-Straße im Schenkelspalt freigelegt und ab Höhe des Leistenkanals ein etwa

8 mm langes Stück abgesetzt. Unmittelbar nach der Entnahme wurden alle Präparate in eine auf +4°C gekühlte Präparierlösung, eine vereinfachte Krebs-Ringer-Lösung, überführt und im Falle einer späteren Präparation zwischenzeitlich für maximal drei Stunden bei +4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Im Anschluss folgte die Präparation der weiterhin in Präparierlösung befindlichen und mit feinen Pins spannungsfrei fixierten Organe unter einem Stereomikroskop (SZ-ST/SZ40, Olympus, Tokio, Japan) mit Illumination durch eine Kaltlichtquelle (KL 1500 LCD, Schott, Mainz). Als Präparationsinstrumente dienten Pinzetten und eine feine Federschere (Vannas-Federschere, fein/gerade/8 cm, Geuder, Heidelberg). Ziel war es, die die Organe umhüllende Fettschicht und Anteile anderer Gewebe, wie zum Beispiel Skelettmuskulatur an den Vv. femorales oder Leber am proximalen Pol des V. cava-Präparates, zu entfernen, ohne die Organintegrität dabei zu beschädigen. Der nächste Schritt bestand darin, die Vene von der jeweils begleitenden Arterie zu trennen und aus dem umgebenden Gewebe heraus zu präparieren. Nach Freilegung der gesamten Vene, Absetzen von Nebenästen und Ausspülen von Blutresten aus dem Lumen wurde das V. cava-Präparat mittig geteilt. Für die angestrebte Messung von Ringpräparaten wurden anschließend mit Hilfe von zwei Pinzetten unter dem Mikroskop zwei für diesen Zweck gefertigte Haken aus Stahldraht (1 mm Dicke) durch das Lumen des Gefäßes geschoben, an denen jeweils ein feines Garn befestigt war. Durch Befestigung eines Hakens an einem Organhalter und Anbringen des Garns vom zweiten Haken am Kraftabnehmer wurde die Aufhängung des Präparats im Inneren des Glaszylinders vom Organbad (siehe Abbildung 3) bewerkstelligt.

2.1.2 Kalibrierung

Um Absolutwerte der zwischen beiden Haken wirkenden Kräfte zu erhalten, erfolgte mittels der „units conversion“ – Funktion der LabChart-Software eine Zweipunktkalibrierung des Messsystems mit einem Gewicht von 11 mN: Das Gewicht wurde angehängt und für einige Sekunden dort belassen. Der resultierende Spannungswert in der digitalen Aufzeichnung wurde als Gewichtskraft des angehängten, definierten Gewichts in mN eingegeben. Die Baseline, also das Spannungssignal der „leeren“ Messbrücke ohne zusätzliches Gewicht auf den Kraftabnehmer, wurde ebenfalls erfasst und dem Wert 0 mN zugeordnet.

2.1.3 Pharmakologische Experimente

Pharmakologische Experimente sind im Organbad mittels Applikation von Substanzen in die das Präparat kontinuierlich umspülende Krebs-Ringer-Lösung realisierbar. Die erwünschte Konzentration kann anhand der Füllmenge der Lösung im Organbad errechnet werden. Durch Diffusion durch die Flüssigkeit erreicht die jeweilige Substanz das Präparat und entfaltet dort ihre Wirkung. Je nach Wirkstoff und Konzentration muss das Organbad danach ein- oder mehrfach gespült werden, um die Substanz auszuschwemmen und das Präparat wieder in seinen Neutralzustand zu versetzen, damit anschließend mit weiteren Experimenten fortgefahrene werden kann.

Einfach gespült wurde bei Substanzen, die in Konzentrationen im 10^{-3} -mol/l-Bereich ihre Wirkung entfalten, ab Konzentrationen von 10^{-5} mol/l und geringer wurde der Spülvorgang drei Mal mit Abständen von mindestens 60 Sekunden durchgeführt.

2.1.4 Experimente mit Elektrischer Feldstimulation (EFS)

Die Elektrische Feldstimulation ermöglicht eine gezielte elektrische Aktivierung von Zellen eines im Organbad befindlichen Präparats durch Herstellung eines Spannungsfeldes. Mit Hilfe dieser Methode kann eine der Situation *in vivo* nahe kommende Reaktion des Organs nachgestellt werden, indem durch eine Aktivierung der Nervenzellen des in der Adventitia befindlichen Nervengeflechts eine Transmitterausschüttung aus den Varikositäten provoziert wird. Diese führt zu einer Rezeptor-vermittelten Reaktion an der Postsynapse, welche in diesem Fall die Muskelzelle ist. Die Folge ist eine Muskelkontraktion.

Um im Organbad Experimente mit Elektrischer Feldstimulation durchzuführen, werden spezielle Organhalter mit Elektroden benötigt (Hersteller Werkstatt des Physiologischen Instituts der Universität Marburg, siehe Abbildung 4). Auf diese Weise kann ein Organ mit der oben beschriebenen Aufhängung in Nähe zu den Elektroden platziert werden. Da sich das Organ in wässriger Lösung befindet, stellt diese den Kontrakt mit den Elektroden her.



Abbildung 4: Organhalter mit EFS-Elektroden und Verbindungsleitung

Die vier Elektroden sind abwechselnd gegensätzlich gepolt. Der Stecker am Ende des Kabels stellte die Verbindung zum Stimulator her.

Hierbei ist darauf zu achten, dass das Organ sich wie in Abbildung 5 dargestellt möglichst zwischen zwei gegensätzlich gepolten Elektroden befindet, um es optimal dem Spannungsfeld auszusetzen. Des Weiteren ist es wichtig, dass sich das Organ nicht in direktem Kontakt zu einer Elektrode befindet, denn in diesem Fall kann es leichter zu einer direkten Aktivierung der Muskelzelle kommen, was durch die daraus resultierende myogene Kontraktion die Ergebnisse verfälschen würde. Die Elektrode am Organhalter steht über ein Kabel in Verbindung mit einem Stimulator (S8 Stimulator (Model S8C), GRASS Medical Instruments, Quincy, Mass., USA), über welchen gezielt Reize gesetzt werden und die Parameter Reizdauer, Frequenz, Intervall und Spannungsstärke, sowie die Optionen Dauerstimulation und einzelner Reiz eingestellt werden können.

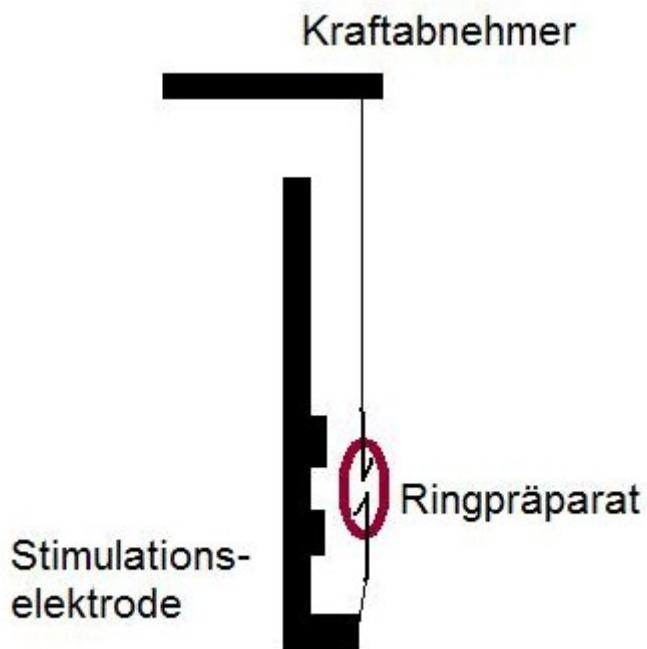


Abbildung 5: Skizze zur Platzierung des Präparats am EFS-Organhalter

Das Füßchen am unteren Ende des Organhalters verfügt über ein Loch, in welches ein Faden zur Befestigung des unteren Hakens, der zur Aufhängung des Präparats dient, eingeknotet wird. Der obere Haken stellt über einen weiteren Haken eine Verbindung zu einem Kraftabnehmer her. Das Präparat wird ohne direkten Kontakt zwischen zwei Elektroden platziert.

2.1.4.1 Tetrodotoxin (TTX)-Test

Mittels Tetrodotoxin, einem Blocker von spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen (Lorentz et al. 2016), kann die indirekte, neurogen ausgelöste Kontraktion des Gefäßmuskels von einer direkt am Muskel ausgelösten Kontraktion unterschieden werden. Für diesen Test werden zunächst Pulse mit ansteigender elektrischer Spannung appliziert. Sobald bei weiterer Steigerung der Reizstärke keine Zunahme der Antwort mehr auftritt, werden mit den zuletzt eingestellten Parametern regelmäßige elektrische Reize appliziert. Bleibt die Antwort stabil, wird TTX wie in Abbildung 6 dargestellt in einer Konzentration von 10^{-7} mol/l appliziert, wodurch bei einer rein neurogenen Aktivierung die Kontraktionsantwort durch die Wirkung des TTX vollständig zum Erliegen kommt (Knight et al. 2003). Nach dreifachem Spülen mit mindestens einer Minute Abstand zwischen den Spülphasen zum Ausschwemmen des TTX kann das Organ mit den getesteten Parametern am Stimulator für Experimente zur neurogenen Gefäßmuskelaktivierung verwendet werden.

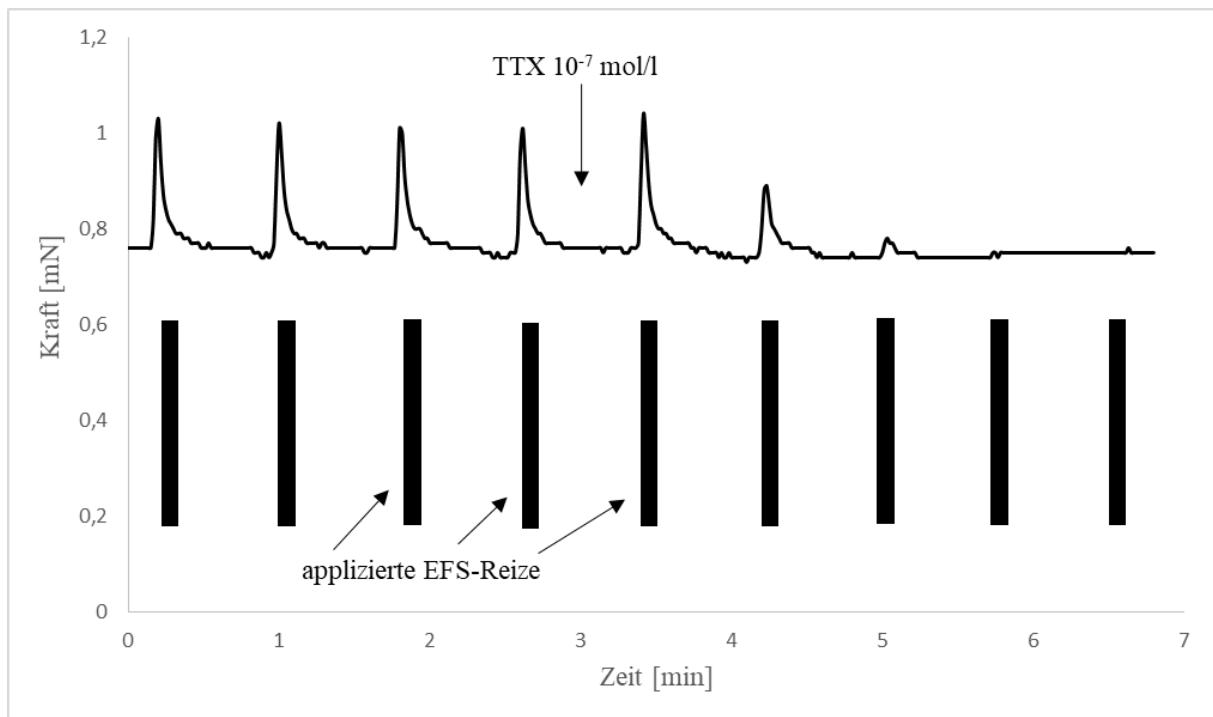


Abbildung 6: Ablauf des TTX-Tests zum Nachweis einer rein neurogenen Kontraktion

Die schwarzen Balken geben die applizierten EFS-Reize an, die aufgezeichnete Registrierung die dadurch ausgelöste Kontraktion des Gefäßpräparats (hier *V. cava*). Nach Zugabe von 10^{-7} mol/l Tetrodotoxin (TTX) verringert sich die Kontraktionsamplitude und bleibt schließlich aus, wodurch die neurogen vermittelte Stimulation belegt ist.

2.1.4.2 EFS-Stimulationsprotokolle

Die EFS wurde im Rahmen dreier unterschiedlicher Protokolle (siehe Tabelle 3) mit jeweiligen Standardparametern verwendet. Bei den Einzelstimulationen wurden diese je nach Einstellung des Organs im Organbad so modifiziert, dass die kleinstmögliche Spannung angewendet wurde, die noch eine Sättigung der Kontraktionsantwort auslöste. So konnte sichergestellt werden, dass die Stimulation im TTX-Test nachweisbar rein neurogen erfolgte. Das Intervall zwischen den einzelnen EFS-Reizen bei den Einzelstimulationen betrug etwa eine Minute. Zusätzlich wurden intensive Stimulationen und eine kontinuierliche Stimulation getestet. Zur Testung unterschiedlicher Aktivierungsniveaus des Sympathikus wurden physiologische Frequenzen zwischen 1 Hz und 20 Hz appliziert (Yang und Chiba 2000; Bradley et al. 2003). Es wurden Die Stufen 1, 2, 4, 7, 10 und 20 Hz gewählt.

| | Reizdauer [s] | Pulsdauer [ms] | Spannung [V] | Frequenz [Hz] |
|----------------------------|----------------|----------------|--|--------------------------|
| Einzel-stimulationen | 2 | 1 | 80, modifiziert nach Kontraktionsantwort | 10 |
| Intensive Stimulation | 30 | 1 | 80 | 20 |
| Treppenförmige Kontraktion | kontinuierlich | 1 | 80 | Aufsteigend von 1 bis 20 |

Tabelle 3: Parameter der verschiedenen EFS-Protokolle

2.1.5 Lösungen und Substanzen

2.1.5.1 Präparierlösung

In dieser gepufferten Lösung (pH 7,3) wurde das Präparat direkt nach der Entnahme aus dem Tier, während der Präparation und zur späteren Bearbeitung im Kühlschrank aufbewahrt.

| Substanzen | NaCl | KCl | NaH ₂ PO ₄ x 1H ₂ O | MgSO ₄ | CaCl ₂ | EDTA | HEPES |
|------------|--------|-------|---|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------------|
| Menge | 42,34g | 1,68g | 0,83g | 0,6g | 1ml (0,5mol/l) | 5ml (25mmol/l) | 50ml (0,5mol/l) 4°C |

Tabelle 4: Zusammensetzung der Präparierlösung (5 l)

2.1.5.2 Krebs-Ringer-Lösung

Für das Ansetzen der Krebs-Ringer-Lösung wurden die entsprechenden Salze und die Glucose (Sigma Aldrich, Taufkirchen) abgewogen und mittels Magnetrührer in etwas weniger als der entsprechenden Menge Reinwasser gelöst. Nach der Auflösung wurde, wenn nötig, die

fehlende Menge Reinwasser aufgefüllt. Dieses Vorgehen erlaubte eine möglichst genaue Bestimmung des Endvolumens und damit der Osmolarität. Die physiologische Krebs-Ringer-Lösung wurde, von Carbogengas durchperlt und auf 37°C erwärmt, im Organbad verwendet.

| Substanzen | NaCl | NaHCO ₃ | KCl | CaCl ₂ | MgCl ₂ | KH ₂ PO ₄ | Glucose |
|------------|------|--------------------|-----|-------------------|-------------------|---------------------------------|---------|
| mmol/l | 112 | 25 | 4,7 | 2,5 | 1,2 | 1,2 | 11,5 |

Tabelle 5: Zusammensetzung der Krebs-Ringer-Lösung

2.1.5.3 Kalium

Mit 60 mM K⁺ wurde zu Beginn jedes Experiments im Organbad das Präparat auf seinen Zustand getestet. Nicht vitale Präparate konnten somit identifiziert und von den Messungen ausgenommen werden. Durch die hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration wird bei gegebener K⁺-Leitfähigkeit der Plasmamembran eine Depolarisation bewirkt, deren Ausmaß nach der Goldmann-Hodgkin-Katz-Gleichung (David E. Goldman 1943) berechnet werden kann. Die Depolarisation löst das Öffnen von spannungsgesteuerten Ca²⁺-Kanälen in der Plasmamembran aus, der resultierende Ca²⁺-Einstrom bewirkt eine Kontraktur des Präparats. Sie kann durch Auswaschen wieder rückgängig gemacht werden. Durch Zugabe der entsprechenden Menge einer KCl-Stammlösung (1,5 M) zu den 20 ml Krebslösung im Organbad wurde eine Anhebung der extrazellulären K⁺-Konzentration auf 60 mM im Organbad erzeugt.

2.1.5.4 Noradrenalin (NA)

Noradrenalin, auch Norepinephrin genannt, ist ein Katecholamin, das seine Wirkung sowohl als Hormon als auch als Neurotransmitter entfaltet. Es wird im Rahmen des vegetativen Nervensystems aus in der Adventitia befindlichen Varikositäten, welche auch *synapse en passant* oder *synapse par distance* genannt werden, und sich am Axon des zweiten Neurons des Sympathikus befinden, ausgeschüttet und aktiviert den Gefäßmuskel über α1-Adrenozeptoren. Die Folge ist eine Kontraktion, eine Verminderung der Gesamtkapazität des Gefäßsystems und damit eine Blutdrucksteigerung (BIRMINGHAM et al. 1969). Noradrenalin (Arterenol Norepinephrine, Sigma Aldrich, 98%, MW: 169,18) wurde als Stammlösung (10⁻¹ mol/l) in *Aqua dest.* angesetzt und daraus die Verdünnungsstufen 10⁻², 10⁻³ und 10⁻⁴ mol/l hergestellt. Zum weiteren Gebrauch wurden die Verdünnungsstufen abgefüllt in Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) bei -20°C eingefroren aufbewahrt. Im Organbad wurden die Konzentrationen 10⁻⁷ bis 10⁻⁴ mol/l angewendet (Golbasi et al. 2005; Knight et al. 2003).

2.1.5.5 *Tetrodotoxin (TTX)*

Tetrodotoxin kommt in Kugelfischen und einigen Krebs-, Schnecken- und Molcharten vor. Durch Blockade der Porenregion des schnellen, spannungsgesteuerten Natriumkanals (Lorentz et al. 2016) verhindert es die Entstehung und Weiterleitung von Aktionspotentialen in den Neuronen. Die Folge sind Lähmungserscheinungen. TTX (Tetrodotoxin, Sigma Aldrich, >98%, MW: 319.27) wurde als Stammlösung (10^{-4} mol/l) in *Aqua dest.* angesetzt und im Organbad in der Konzentration 10^{-7} mol/l angewendet (Knight et al. 2003).

2.1.5.6 *Adenosintriphosphat (ATP)*

ATP ist ein Nukleotid, was aus einem Adeninrest, der Pentose Ribose und drei Phosphaten zusammengesetzt ist. Die Phosphate sind mit einer Esterbindung (α) an die Ribose und mit Anhydridbindungen (β und γ) untereinander verbunden. ATP ist als universeller Energieträger bekannt, bei extrazellulärem Vorkommen besitzt es aber auch Eigenschaften eines Transmitters und bindet in dieser Funktion an P2X-Rezeptoren (Burnstock 2012). ATP (ATP disodium salt, Tocris Bioscience, Bristol, UK, >99%, MW: 551.14) wurde als Stammlösung in *Aqua dest.* angesetzt, daraus wurden die Verdünnungsstufen 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} mol/l hergestellt. Im Organbad wurde ATP in den Konzentrationen 10^{-6} bis 10^{-3} mol/l angewendet (Nichols et al. 2014; Enrique et al. 2012).

2.1.5.7 *Neuropeptid Y (NPY)*

Das Neuropeptid Y (NPY) besteht aus 36 Aminosäuren und kommt sowohl zentralnervös, als auch in Neuronen des peripheren Nervensystems vor (Ekblad et al. 1984). Es ist für seine Beteiligung an der Steuerung des Hungergefühls und von Stress- und Angstreaktionen bekannt (Nway et al. 2016; Leitermann et al. 2016). Seine Wirkungen werden über Neuropeptid-Rezeptoren vermittelt, die Gi-gekoppelt sind (Grundemar et al. 1996). An Blutgefäßen wurde eine konstriktive Wirkung durch Agonismus an Y1-Rezeptoren beschrieben (Yang und Chiba 2000; Malmström 1997). NPY (Neuropeptide Y, Tocris Bioscience, Bristol, UK, 96,3%, MW: 4271.7) wurde als Stammlösung in *Aqua dest.* angesetzt, daraus wurden die Verdünnungsstufen 10^{-5} bis 10^{-8} mol/l hergestellt. Im Organbad wurde NPY in den Konzentrationen 10^{-11} bis $3 \cdot 10^{-8}$ mol/l angewendet (Wier et al. 2009; Bradley et al. 2003).

2.1.5.8 *Suramin*

Suramin wurde in den 1910er Jahren als Arzneimittel gegen Trypanosomen entwickelt (Wiedemar et al. 2018). Seine vielfältigen und dosisabhängigen Wirkungen führten dann zur Erprobung im Einsatz gegen andere Erkrankungen. Eine bekannte Wirkung von Suramin ist

die Blockade von P2X-Rezeptoren (Lambertucci et al. 2015). Es handelt sich jedoch um einen P2-Antagonisten mit breitem Spektrum (Kur und Newman 2014). Auch eine hemmende Wirkung auf endotheliale P2Y-Rezeptoren ist bekannt (Hoyle et al. 1990; Ziyal et al. 1997). Suramin (Suramin Hexasodium Salt, Tocris, 99,4%, MW: 1663,347) wurde in den Konzentrationen 10^{-1} bis 10^{-5} mol/l angesetzt und in den Konzentrationen 10^{-8} bis 10^{-4} mol/l im Organbad angewendet (Sim et al. 2008; Enrique et al. 2012).

2.1.5.9 BIBP3226

BIBP3226 ist ein selektiver Antagonist des Y1-Rezeptors (Jacques et al. 1995; Lundberg und Modin 1995). BIBP3226 (BIBP3226 trifluoroacetate, Tocris, >98%, MW: 596,6) wurde als Stammlösung in einer Konzentration von 10^{-3} mol/l in *Aqua dest.* angesetzt und im Organbad in der Konzentration 10^{-6} mol/l angewendet (Yang und Chiba 2000).

2.2 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie macht es möglich, spezifische Strukturen durch markierte Antikörper sichtbar zu machen. Diese Methode wurde zur Untersuchung der Expression von P2X1 und P2X2-Rezeptoren, sowie den Vorkommen von NPY an den jeweiligen Organabschnitten angewendet. Untersucht wurden sowohl Präparate, die längs aufgeschnitten und in aufgespanntem Zustand fixiert wurden, als auch Gefrierschnittpräparate.

2.2.1 Substanzen

2.2.1.1 Fixierlösung

Zum Fixieren wurden die Präparate in Paraformaldehyd (PFA) überführt und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei handelt es sich um eine 1:10-Verdünnung von 37%igem Formaldehyd (Carl Roth, Karlsruhe) in PBS.

2.2.1.2 Pufferlösung (Phosphate-buffered saline = PBS)

Zusammensetzung des PBS-Puffers für die Herstellung von 1l:

| Substanzen | NaCl | KCl | Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O | K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O |
|------------|------|-----|---|--|
| g | 8 | 0,2 | 1,41 | 0,31 |

Tabelle 6: Zusammensetzung der PBS-Pufferlösung

Nach dem Einröhren der Substanzen in 1l *Aqua dest.* wurde mit Hilfe eines pH-Meters der pH durch Zugabe von NaOH oder HCl auf 7,4 eingestellt.

2.2.1.3 Primäre Antikörper

Die primären Antikörper binden an die Epitope des nachzuweisenden Proteins im Gewebe. Sie sind wiederum das Antigen für den fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper. Die

Antikörper wurden als Lösung bezogen und in 10% Serum (Donkey/Goat, s.2.2.1.5) in PBS angesetzt.

| Antikörper | Hersteller | Verdünnung |
|------------------------------|--------------|------------|
| P2X1 receptor antibody | Alomone labs | 1:200 |
| P2X2 Polyclonal antibody | ThermoFisher | 1:200 |
| Anti-Neuropeptide Y antibody | Abcam | 1:200 |

Tabelle 7: Verwendete primäre Antikörper

2.2.1.4 Sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper sind gegen die Spezies des primären Antikörpers gerichtet und mit einem Fluorophor gekoppelt. Jeder Arbeitsschritt mit Verwendung dieser Antikörper musste unter abgedunkelten Lichtverhältnissen stattfinden, um ein vorzeitiges Ausbleichen der Fluorophore zu vermeiden. Die Antikörper wurden in 10% Serum in PBS angesetzt.

| Antikörper | Hersteller | Verdünnung |
|-----------------------------------|--------------|------------|
| Cy3 goat anti-rabbit | Invitrogen | 1:200 |
| Goat anti-rabbit Cy3 | Invitrogen | 1:200 |
| Alexa Fluor 647 donkey anti-sheep | ThermoFisher | 1:200 |

Tabelle 8: Verwendete sekundäre Antikörper

2.2.1.5 Seren

Zur Minimierung der unspezifischen Bindung vor der Immunfluoreszenzmarkierung wurden die jeweiligen Seren benötigt. Diese wurden in 10%iger Lösung in PBS angesetzt.

| Serum | Hersteller | Verdünnung |
|--------------------------|---------------|------------|
| Normal Goat Serum | Sigma Aldrich | 1:9 |
| Normal Goat Serum N 5630 | ThermoFisher | 1:9 |
| Donkey Serum D 9663 | Sigma Aldrich | 1:9 |

Tabelle 9: Verwendete Seren

Durch die im Serum vorhandenen Antikörper werden alle unspezifischen Targets am Präparat besetzt und damit blockiert. Der später hinzu gegebene spezifische Antikörper bindet dann nur an die Epitope der Proteine, die sichtbar gemacht werden sollen und kann keine unspezifischen Bindungen an anderen Strukturen eingehen. Nach der Applikation des Serums darf das Präparat keinesfalls einem weiteren Waschschritt unterzogen werden, da die entstandenen Bindungen sonst zunichte gemacht würden. Das Serum wurde nach seiner Inkubationszeit lediglich

vorsichtig vom Objektträger abgeklopft, beziehungsweise aus der Vertiefung der 96-Loch-Mikrotiterplatte abgezogen.

2.2.2 Herstellung von Semi-Dünnschnitten

Zur Fertigung von Schnittpräparaten wurden bereits fixierte Organe in 30%ige Sucrose-Lösung in Reinwasser überführt und über Nacht bei +4°C gekühlt inkubiert. Im Anschluss wurden sie in das aus wasserlöslichen Glykolen und Harzen bestehende Einbettmedium TissueTek O.C.T. Compound (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Netherlands) eingebettet. Das geschah, indem das Präparat möglichst entfaltet und glatt in einen Streifen des gelartigen Einbettmediums eingegeben und anschließend mit Einbettmedium komplett bedeckt wurde. Danach wurden die eingebetteten Präparate auf einen Kryostaten-Organhalter aufgebracht und bei -50 °C zunächst im Kryostaten (Leica CM3050S, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) eingefroren. Für den Schneidevorgang wurde der Tisch im Kryostaten auf -26 Grad Celsius und die Organhalterung auf eine Temperatur zwischen -21 und -24 Grad Celsius eingestellt. Die Dicke der in dieser Studie angewendeten Schnitte betrug 10 µm bzw. 20 µm. Die Schnitte wurden im Anschluss auf einen beschrifteten Objektträger mit Poly-L-Lysin-Haftbeschichtung des Herstellers Menzel aufgebracht. Die Position des Präparats wurde jeweils auf der Rückseite des Objektträgers mittels Edding-Stift mit einer Umrandung markiert, um das spätere Aufsuchen unter dem Mikroskop zu vereinfachen.

2.2.3 Durchführung der indirekten Immunfluoreszenzfärbung

Sowohl die längs aufgeschnittenen Organe, welche in aufgespanntem Zustand fixiert und dann in 96-Loch-Mikrotiterplatten überführt worden waren, als auch die auf Objektträger aufgezogenen Gefrierschnitte wurden dann mit dem Protokoll zur Fluoreszenzfärbung weiterbearbeitet:

1. Drei Waschschritte mit PBS, je 10 min
2. 60 min Inkubation mit 10% Serum in PBS
3. Über Nacht/über Wochenende bei +4 °C: Inkubation der Testpräparate mit primärem Antikörper, die Kontrollpräparate verbleiben in PBS
4. Drei Waschschritte mit PBS, je 10 min
5. Über Nacht/über Wochenende bei +4 °C: Inkubation aller Präparate mit sekundärem Antikörper
6. Eindecken

Für die Schritte 1. bis 5. wurden die Präparate für die angegebene Zeit, wenn nicht anders angegeben bei Raumtemperatur, auf einem Schüttler (Edmund Bühler, Tübingen, Germany)

platziert. Für die langen Inkubationsschritte über Nacht oder übers Wochenende wurden die Mikrotiterplatten beziehungsweise Objektträgerkästen mit Parafilm (Bemis, Neenah, USA) verschlossen, um eine Austrocknung zu vermeiden.

Im Anschluss an den Vorgang der Fluoreszenzfärbung wurden auch die vollständigen, noch in Mikrotiterplatten befindlichen Präparate auf beschriftete Objektträger aufgebracht und ihre Position rückseitig mittels Edding-Stift-Umrandung markiert. Jedes Präparat wurde dann mit einem Tropfen ProLong Gold DAPI (ProLong Gold Antifade reagent with DAPI, Invitrogen, Karlsruhe) versehen, welches zweierlei Effekt hat: Das Präparat wird durch die Substanz vor vorzeitigem Ausbleichen der Fluorophore geschützt und die Zellkerne werden mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) fluoreszenzmarkiert.

Danach wurden die Präparate mit einem Deckglas abgedeckt und dieses mit handelsüblichem Nagellack randständig auf dem Objektträger fixiert. Die Untersuchung der Präparate fand innerhalb einer Woche nach Abschluss der Vorbereitung statt, gelagert wurden die Präparate in lichtgeschützten Objektträgerkästen bei +4 °C.

2.2.4 Mikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde an einem inversen Mikroskop des Typs Leica DMI6000 (Leica Microsystems, Wetzlar) durchgeführt. Der Raum wurde zunächst abgedunkelt und die Fluoreszenzlichtquelle (Kompaktlichtquelle EL600, Leica Microsystems) mit Quecksilber-Kurzbogen-Reflektor-Lampen (HXP-R120W/45C VIS, Osram, München) gestartet. Der Objektträger des zu untersuchenden Präparats wurde mit dem Präparat nach unten auf die Halterung aufgebracht und positioniert. Im Anschluss konnte mit 100facher, 200facher und 400facher Vergrößerung mikroskopiert werden (HC FL PLAN 10x/0.25 DRY; HC PL APO 20x/0.70 DRY, HC PL APO 40x/0.85 DRY). Dafür wurden die Einstellung „Lichtmikroskopie“ für das Durchlicht, sowie die Einstellungen „DAPI“, „Cy3“ und „Cy5“ für die jeweilige Fluoreszenzdarstellung gewählt (siehe Tabelle 10). Es kamen hierbei die Filterwürfel A4 (Dapi); N3 (Cy3); und Y5 (Cy5) zum Einsatz. Die Lichtmikroskopie diente zur Orientierung und zum Aufsuchen der gewünschten Ausschnitte. Mit der DAPI-Einstellung wurden die Zellkerne sichtbar gemacht. Die Cy3-Einstellung wurde zur Darstellung der sekundären anti-P2X-Antikörper verwendet und die Cy5-Einstellung machte die sekundären NPY-Antikörper sichtbar. Die Aufnahmen und die Bildverarbeitung wurden mit dem Programm LAS X (Leica Application Suite, Leica, Wetzlar) durchgeführt.

| Fluoreszenzfarbstoff | Max. Anregung | Max. Emission | Farbeindruck |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| DAPI | 358 nm | 461 nm | Blau |
| Cy3 | 554 nm | 568 nm | Gelb-(Orange) |
| Cy5 | 649 nm | 670 nm | (Orange)-Rot |

Tabelle 10: Eigenschaften der verwendeten Fluorophore

2.3 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit Hilfe der Funktionen „Mini Window“, „Cursor“ und „Data Pad“ des Programmes LabChart aus den Aufzeichnungen der Experimente extrahiert und dann im Programm Excel2013 bzw. Excel2016 des Herstellers Microsoft (Redmond, Washington, USA) weiterbearbeitet.

Zur Testung der Normalverteilung wurde der für kleine Stichprobengrößen besonders geeignete Shapiro-Wilk-Test angewendet. Es wurde das Programm IBM SPSS Statistics Version 27 (IBM, Armonk, New York USA) verwendet.

Zur Testung einer statistischen Signifikanz wurde neben dem t-Test für verbundene Stichproben bei Datensätzen mit Normalverteilung auch der Wilcoxon-Test für nicht normalverteilte gepaarte Stichproben verwendet. Diese Testung kam bei Daten, die nacheinander am gleichen Präparat erhoben wurden, zum Einsatz, beispielsweise vor und nach einer Substanzgabe oder bei Gabe unterschiedlicher Substanzen nacheinander. Bei nicht verbundenen Stichproben wurden je nachdem, ob die Bedingung der Normalverteilung erfüllt war, oder nicht, der t-Test für nicht verbundene Stichproben und der Mann-Whitney U-Test für nicht normalverteilte, ungepaarte Datensätze angewendet. Diese Testung wurde bei Daten, die an verschiedenen Präparaten zum gleichen Zeitpunkt erhoben wurden, angewendet, also beispielsweise bei laufender EFS mit einem Präparat mit Substanzgabe und einem Kontrollpräparat. Des Weiteren kamen mit der einfaktoriellen Varianzanalyse, dem Friedman-Test und dem Kruskal-Wallis-Test Testmethoden zur Analyse von Datensätzen mit mehr als zwei Stichproben zum Einsatz.

Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

Der Schwerpunkt der Statistik ist aufgrund geringer Stichprobengrößen deskriptiv. Bei den teilweise durchgeführten wiederholten Einzeltestungen wurde auf eine alpha-Adjustierung verzichtet, um eine orientierende Beurteilung der Zusammenhänge anhand der unkorrigierten p-Werte zu ermöglichen. Bei den vorgenommenen Varianzanalysen können die zusätzlich durchgeführten Wilcoxon- bzw. t-Tests als post-Test-Äquivalente angesehen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Referenzkontraktionen

Zur Vitalitätstestung und als Referenz wurde zu Beginn jedes Experiments eine Kaliumkontraktur mit 60mM K⁺, angesetzt als KCl, durchgeführt. Die Aktivierungen mit NA und EFS zeigten im Vergleich zu den Referenzergebnissen sowohl an V. cava- (siehe Abbildung 7) als auch an V. femoralis-Präparaten (siehe Abbildung 8) eine signifikant stärkere Kraftentwicklung.

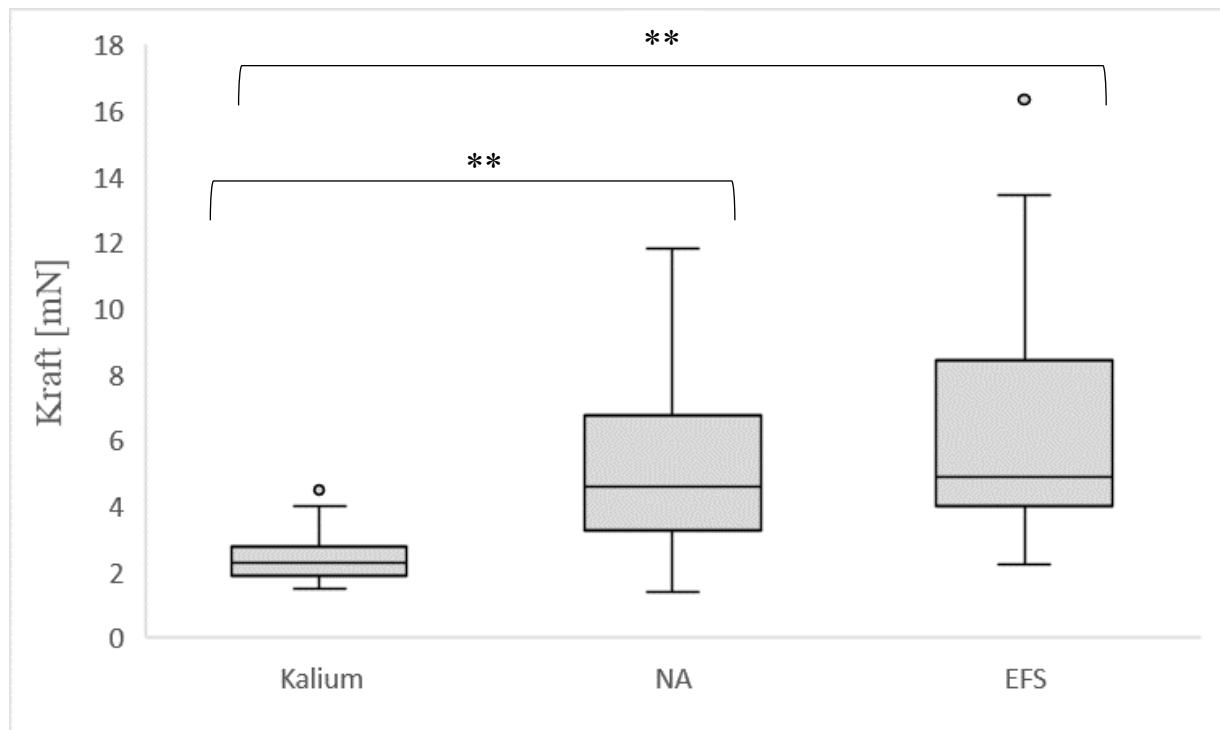


Abbildung 7: Vergleich der maximalen Kraftentwicklung bei Kaliumkontraktur und Aktivierung mit NA und EFS an der V. cava.

Im t-Test für verbundene Stichproben zeigt sich zwischen Kalium und NA und zwischen Kalium und EFS eine signifikant unterschiedliche Kraftentwicklung (beide $**p<0,01$): Kalium: $n=16$; NA und EFS: $n=36$. Der kleinere n -Wert der Kaliumkontraktur liegt an weniger auswertbaren Daten bei den Experimenten, in denen die Kaliumkontraktur stets zu Beginn als Vitalitätstestung durchgeführt wurde, wo teils Nachjustierungen der Präparatpositionierung vorgenommen werden mussten.

Die V. cava erreichte bei der Kaliumkontraktur einen Median von 2,25 mN (IQR 0,9 mN). Die Aktivierung mit NA zeigte mit einem Median von 4,6 mN (IQR 3,4 mN) eine um 51,1 % größere und die Aktivierung mit EFS mit einem Median von 4,9 mN (IQR 4,4 mN) eine um

54,1% größere Kraftentwicklung, als die Kaliumkontraktur (beide $**p<0,01$). Bei der V. femoralis erreichte die Kaliumkontraktur einen Median von 0,9 mN (IQR 0,75 mN). Die Aktivierung mit NA erreichte mit einem Median von 3 mN (IQR 3,1 mN) eine um 70% größere und die Aktivierung mit EFS mit einem Median von 5 mN (IQR 4,4 mN) eine um 82 % größere Kraftentwicklung im Vergleich zur Kaliumkontraktur (beide $**p<0,01$).

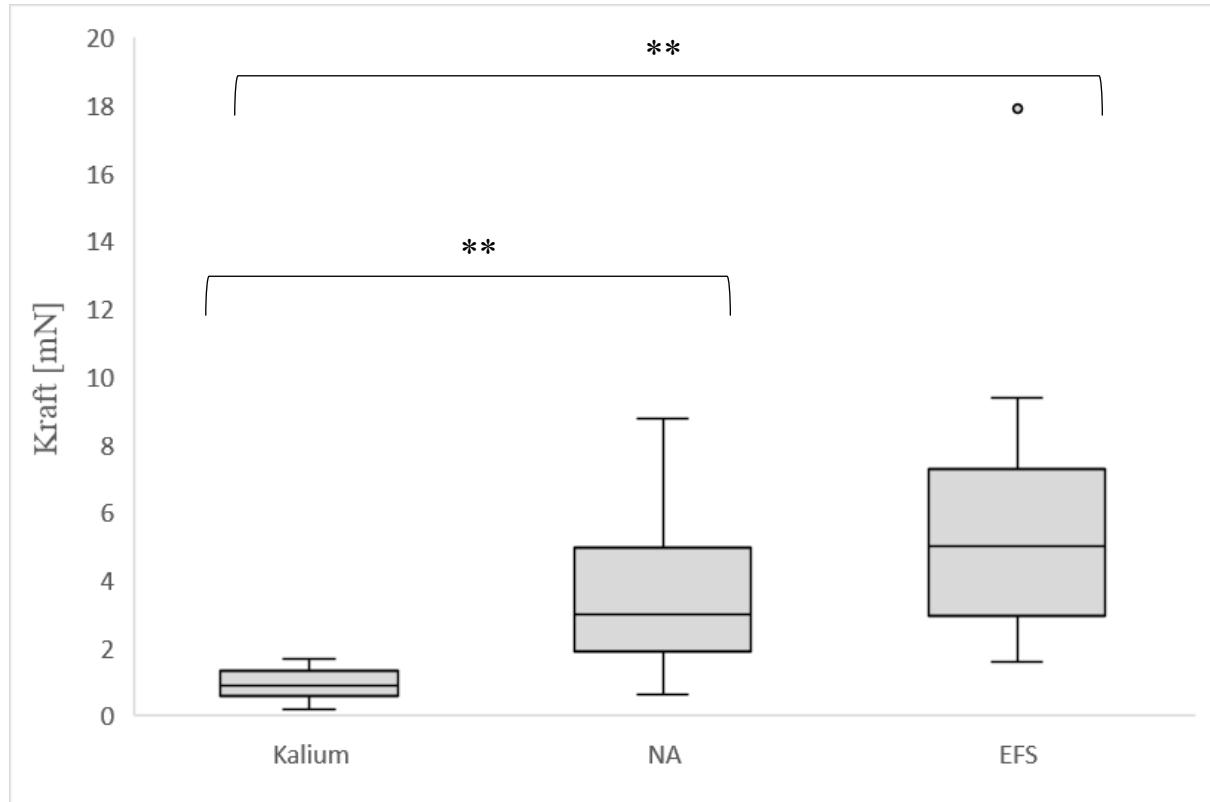


Abbildung 8: Vergleich der maximalen Kraftentwicklung bei Kaliumkontraktur und Aktivierung mit NA und EFS an der V. femoralis.

Im t-Test für verbundene Stichproben zeigt sich zwischen Kalium und NA und zwischen Kalium und EFS eine signifikant unterschiedliche Kraftentwicklung (beide $**p<0,01$). Kalium: $n=15$, NA und EFS: $n=36$. (Erklärung zur Stichprobengröße siehe Abb. 7).

3.2 Der Venentonus

Zur Untersuchung des Venentonus bei unterschiedlichen Aktivierungsmodalitäten wurden Experimente durchgeführt, die die Aktivierung des glatten Muskels der Vene mittels exogen appliziertem NA der Aktivierung mittels endogener Transmitterfreisetzung durch Applikation von EFS gegenüberstellen. Ein besonderes Augenmerk lag dabei neben der Kraftentwicklung auch auf der zeitlichen Dynamik der Kontraktionen bei Stimulationen unterschiedlicher Intensität. Ziel dieser Experimente war es, mögliche Unterschiede in der Charakteristik der nur

durch NA und durch endogene Aktivierung induzierten Kontraktionen zu identifizieren und somit Rückschlüsse auf das mögliche Vorhandensein weiterer neurogener Steuerungsmechanismen ziehen zu können.

3.2.1 Maximale Kraftentwicklung

Die maximale Kraft wurde durch Vergleich der Kraftentwicklung bei der höchsten NA-Konzentration und der höchsten Frequenzstufe bei EFS-Aktivierung gemessen. Die Konzentrationen und Aktivierungsparameter wurden aufgrund von Daten aus der Literatur festgelegt (siehe 2.1.4 und 2.1.5.4). Die folgenden Originalaufzeichnungen (Abbildung 9 und 10) veranschaulichen die Vorgehensweise, die dargestellten Messungen wurden am selben Präparat, einer V. femoralis, durchgeführt. Die Zeitabstände zwischen den einzelnen Konzentrationen bzw. Frequenzen wurden so gewählt, dass das Erreichen eines Peaks abgewartet wurde, bevor die nächsthöhere Konzentration NA hinzupipettiert oder auf die nächsthöhere Frequenz umgeschaltet wurde. Demnach fällt die Dauer der Konzentrations- bzw. Frequenzstufen unterschiedlich lang aus. Insgesamt ergibt sich eine treppenförmig konfigurierte Kontraktion. Die Zugabe von NA erfolgte kumulativ, angegeben ist jeweils die im Organbad neu eingestellte Konzentration.

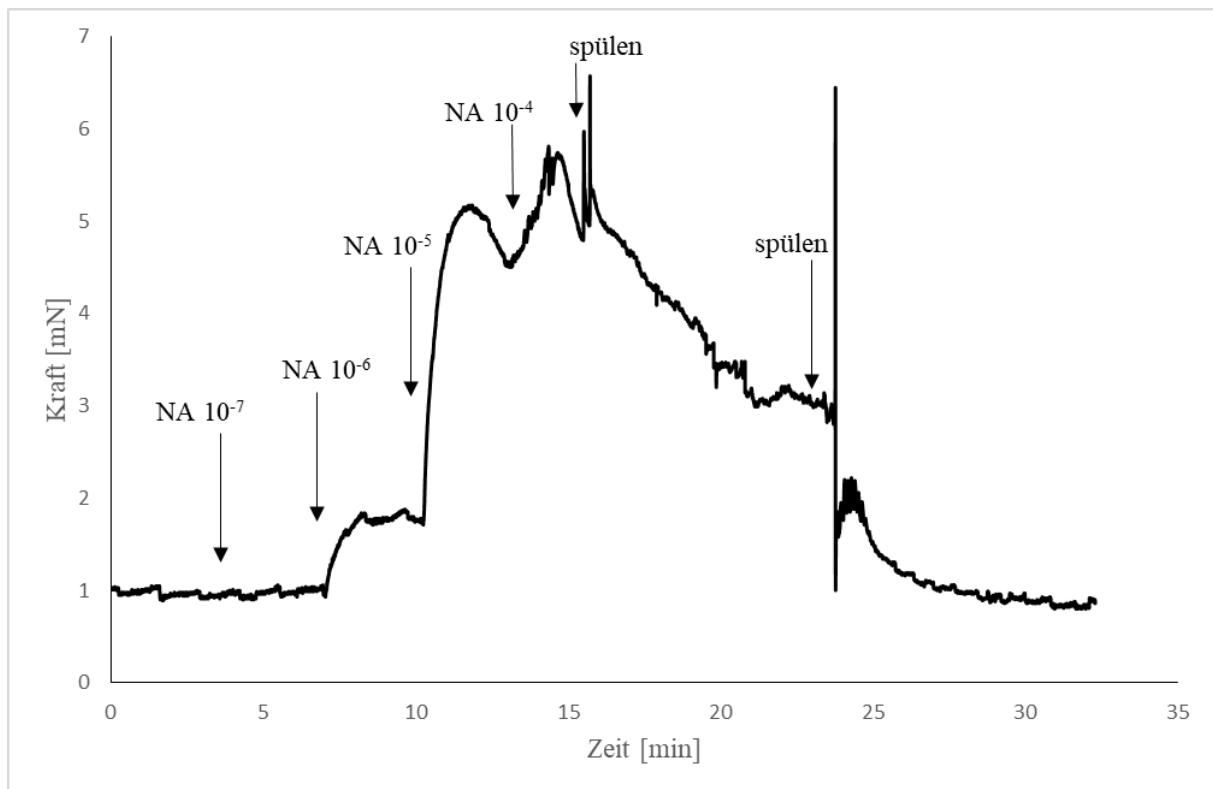


Abbildung 9: Beispielhafte Originalaufzeichnung einer V. femoralis mit NA-Applikation
 in den Konzentrationen 10^{-7} mol/l bis 10^{-4} mol/l. Die hohen Ausschläge bei ca. 16 min und 23 min sind Artefakte des Spülvorgangs.

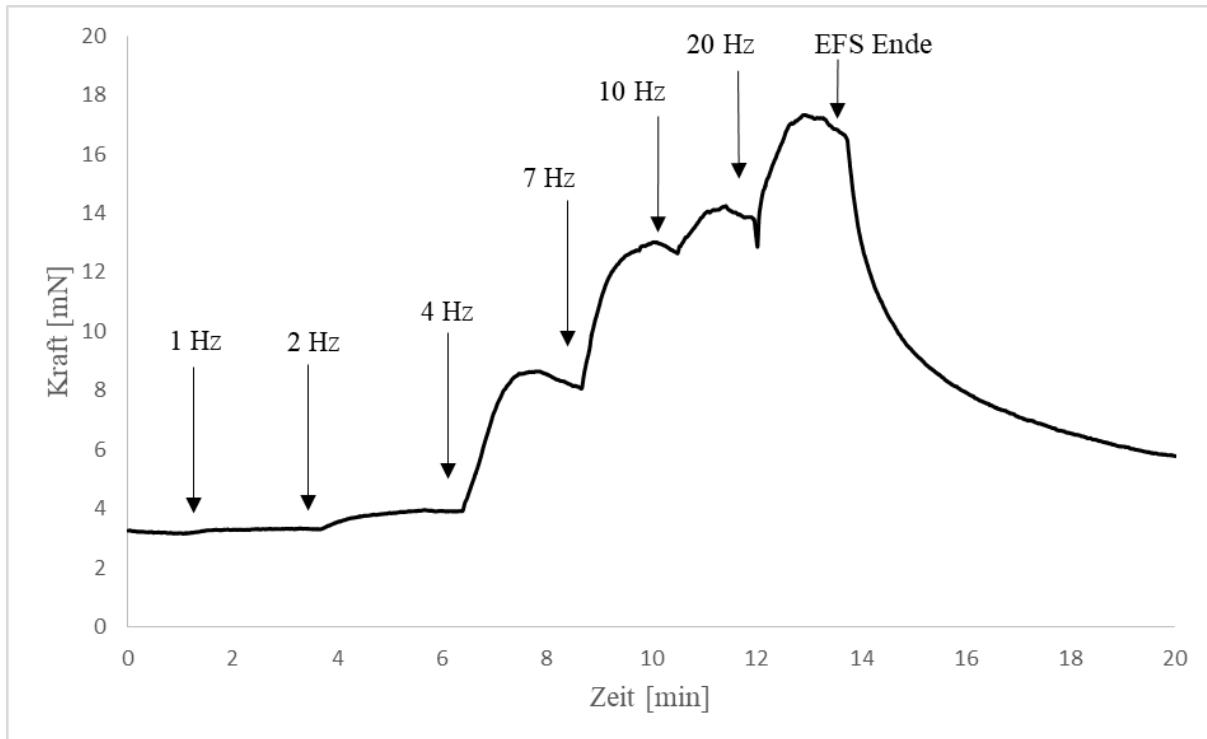


Abbildung 10: Beispielhafte Originalaufzeichnung einer V. femoralis mit EFS-Applikation mit den Frequenzen 1 Hz bis 20 Hz.

Zur Untersuchung der maximalen Kraftentwicklung wurden die maximal erreichten Werte von NA- und EFS-Aktivierungen einander gegenübergestellt. Voraussetzung zum Einschluss in die Auswertung war eine ununterbrochene Messaufzeichnung. Da es bei einigen Messungen aufgrund von Adhäsion des Präparats an der Organbadwand oder Nachjustierung der Position und Vorspannung zur Optimierung der Bedingungen für die EFS zu entsprechenden Unterbrechungen kam, war in diesen Fällen eine Vergleichbarkeit zwischen den Kraftentwicklungen der Aktivierungen nicht gegeben. Ergebnisse solcher Experimente wurden demnach aus der Auswertung ausgeschlossen.

Die auf diese Weise durchgeführten Messungen weisen intra- und interindividuelle Unterschiede auf. In der graphischen Gegenüberstellung fallen insbesondere die große Streuung und das Vorhandensein von Ausreißern auf, die die Messungen mit EFS zeigen. Der Shapiro-Wilk-Test zeigte eine annähernde Normalverteilung, die Signifikanztestung wurde mit dem t-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Im Falle der V. cava zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei annähernd gleichem Median (Abbildung 11). Dieser betrug bei der NA-Aktivierung 4,6 mN (IQR 3,4 mN) und bei der EFS-Aktivierung 4,5 mN (IQR 4,4 mN).

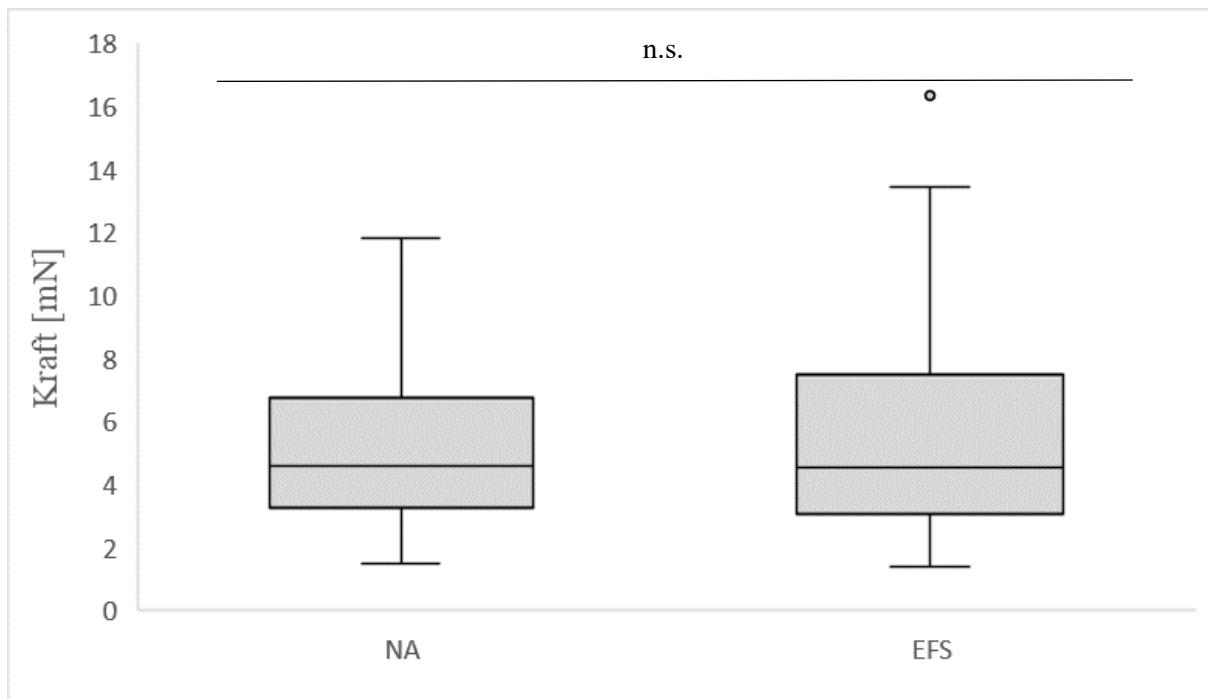


Abbildung 11: Darstellung der maximal erreichten Kraft der V. cava

bei Aktivierung durch exogenes NA und durch EFS. Im t-Test für abhängige Stichproben keine Signifikanz nachweisbar. Die Konzentration der maximalen NA-Aktivierung beträgt 10^{-4} mol/l, die maximale EFS-Frequenz 20/s. NA exogen $n=36$, EFS $n=36$.

Bei den Experimenten mit Präparaten der V. femoralis hingegen erreichte die Gegenüberstellung wie in Abbildung 12 gezeigt trotz großer Streuung der EFS-Daten im t-Test für verbundene Stichproben ein hohes Signifikanzniveau ($**p<0,01$). Der Median betrug bei der NA-Aktivierung 3 mN (IQR 3,1 mN) und bei der EFS-Aktivierung 5 mN (IQR 4,4 mN).

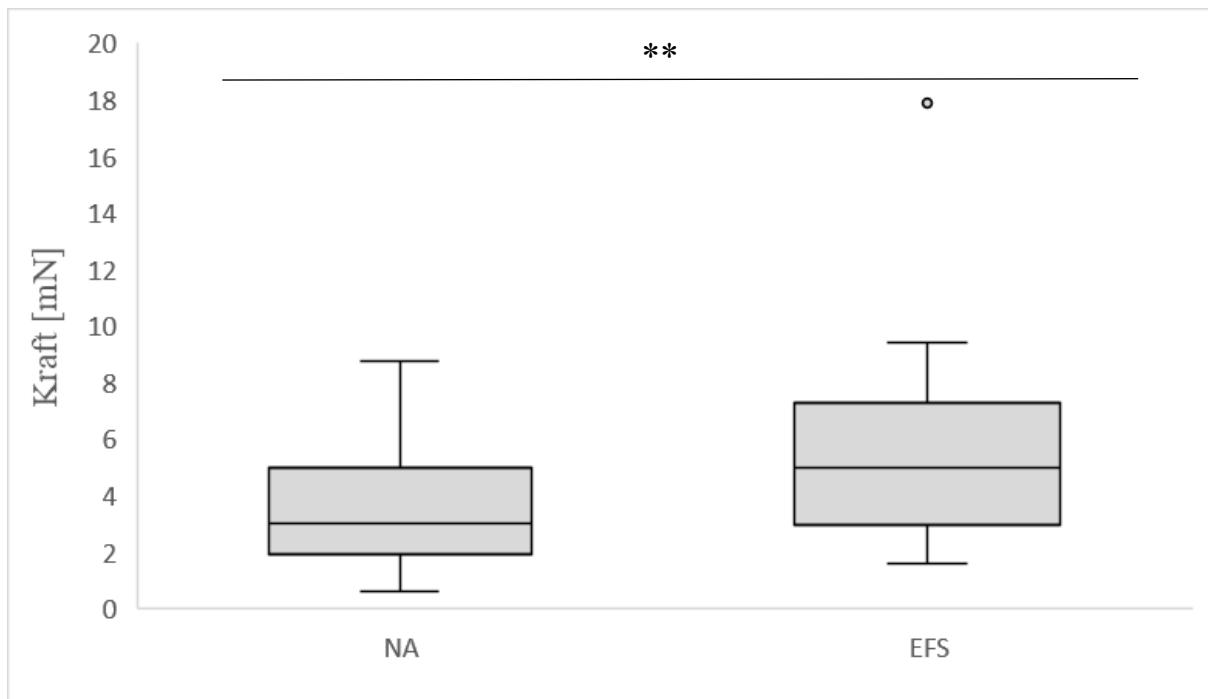


Abbildung 12: Darstellung der maximal erreichten Kraft der V. femoralis

bei Aktivierung durch exogenes NA und durch EFS. Im T-Test für abhängige Stichproben signifikant ($**p<0,01$). Die Konzentration der maximalen NA-Aktivierung beträgt 10^{-4} mol/l, die maximale EFS-Frequenz 20/s. NA exogen $n=21$, EFS $n=21$.

Zur genaueren Beleuchtung der Effekte anderer kontraktiler Systeme schließen sich im Abschnitt 3.3 Experimente zur Untersuchung der Rolle von Kotransmission bei der Kontraktionssteuerung des glatten Venenmuskels an.

3.2.2 Kraftentwicklung im Zeitverlauf

Der Zeitverlauf der Kraftentwicklung wurde vergleichend zwischen exogen appliziertem NA und Transmitterausschüttung durch EFS untersucht, um Erkenntnisse zur Stabilität der jeweils erzeugten Kontraktionen und zu möglichen Unterschieden zu erlangen. Es wurde die Zeit zwischen Beginn der Kontraktion nach Reizbeginn und dem Peak der Kontraktion gemessen. Da die Frequenzen 1 Hz und 2 Hz nicht immer Reizantworten zeigten, wurden sie aus dem Vergleich ausgeschlossen. Die Messungen wurden an Präparaten der V. cava und der V. femoralis durchgeführt. Im Shapiro-Wilk-Test zeigte sich eine teilweise annähernd, teilweise vollständig gegebene Normalverteilung, die Signifikanztestung wurde mit t-Test bzw. bei Reihentestungen mit einfaktorieller Varianzanalyse durchgeführt.

Für die Testung innerhalb der NA- beziehungsweise EFS-Treppe wurde für jede der Treppen eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Diese zeigte bei der NA-Treppe der V. cava

(siehe Abbildung 13) eine signifikante Verlängerung der Zeitintervalle bis zum Erreichen des Peaks (**p<0,01), Bei der Aktivierung mit NA zeigte sich bei der Konzentration NA 10^{-7} mol/l ein Median von 52 Sekunden (IQR 26 Sekunden) bis zum Peak, bei der Konzentration NA 10^{-6} mol/l 74 Sekunden (IQR 43 Sekunden) bei der Konzentration NA 10^{-5} mol/l 94 Sekunden (IQR 41 Sekunden) und bei der Konzentration NA 10^{-4} mol/l 107 Sekunden (IQR 60 Sekunden).

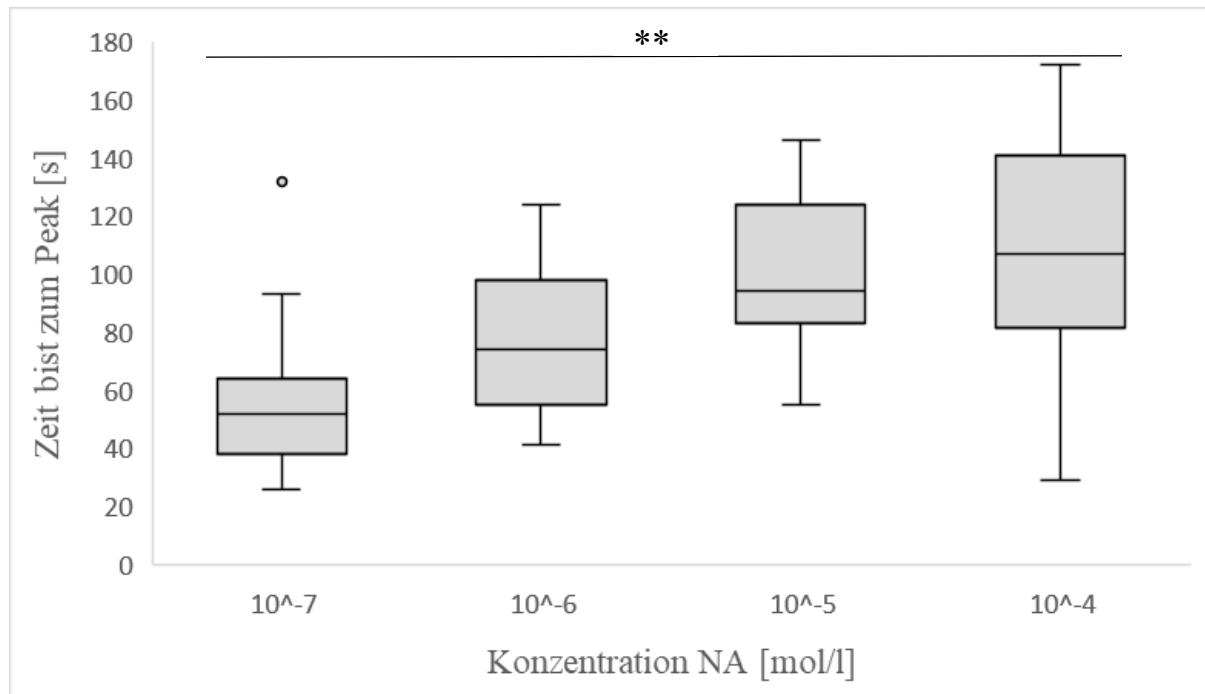


Abbildung 13: Zeit bis zum Erreichen des Peaks bei Präparaten der V. cava und Stimulation mit NA-Gabe in aufsteigender Konzentration.

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigt signifikante Unterschiede in der Dauer zwischen den verschiedenen Konzentrationen (**p<0,01). n=23

Die EFS-Treppe (siehe Abbildung 14) zeigte keine signifikante Veränderung im Zeitintervall bis zum Erreichen des Peaks. Die EFS ruft bei der V. cava frequenzunabhängig stabil gleich oder ähnlich lange andauernde Kontraktionen hervor. Es zeigte sich bei der Frequenz 4 Hz ein Median von 45 Sekunden (IQR 20 Sekunden) bis zum Peak, bei der Frequenz 7 Hz 45 (IQR 21 Sekunden), bei der Frequenz 10 Hz 43 Sekunden (IQR 20 Sekunden) und bei der Frequenz 20 Hz 43 Sekunden (IQR 26 Sekunden).

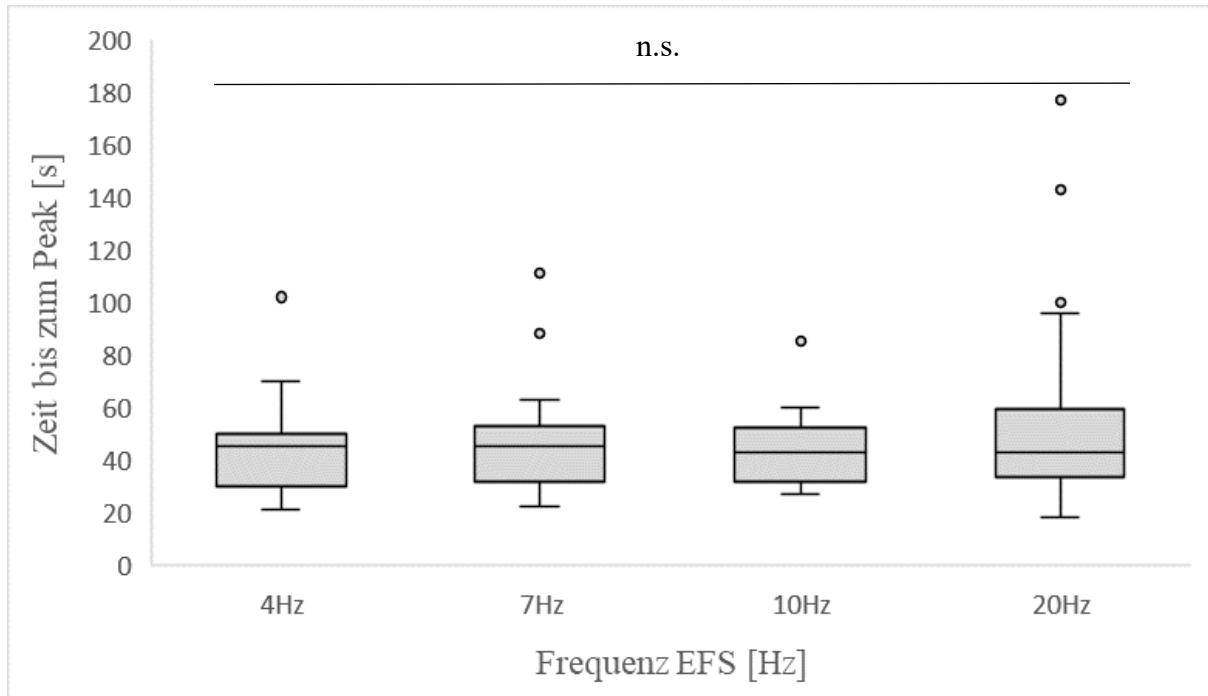


Abbildung 14: Zeit bis zum Erreichen des Peaks bei Präparaten der V. cava und Stimulation mit EFS in aufsteigender Frequenz. Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Dauer zwischen den verschiedenen Frequenzen. $n=23$

Die Experimente an V. femoralis-Präparaten zeigen ähnliche Ergebnisse: Auch hier sind die Zeitintervalle bei der NA-Treppe (siehe Abbildung 15) signifikant unterschiedlich und werden länger. Es zeigte sich bei der Konzentration $NA10^{-7}$ mol/l ein Median von 54 Sekunden (IQR 26 Sekunden) bis zum Peak, bei der Konzentration $NA10^{-6}$ mol/l 73 Sekunden (IQR 36 Sekunden) bei der Konzentration $NA10^{-5}$ mol/l 100 Sekunden (IQR 28 Sekunden) und bei der Konzentration $NA10^{-4}$ mol/l 100 Sekunden (IQR 86 Sekunden).

Bei der EFS-Treppe (siehe Abbildung 16) zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Es zeigte sich bei der Frequenz 4 Hz ein Median von 55 Sekunden (IQR 19 Sekunden) bis zum Peak, bei der Frequenz 7 Hz 46 (IQR 16 Sekunden), bei der Frequenz 10 Hz 48 Sekunden (IQR 15 Sekunden) und bei der Frequenz 20 Hz 50 Sekunden (IQR 35 Sekunden).

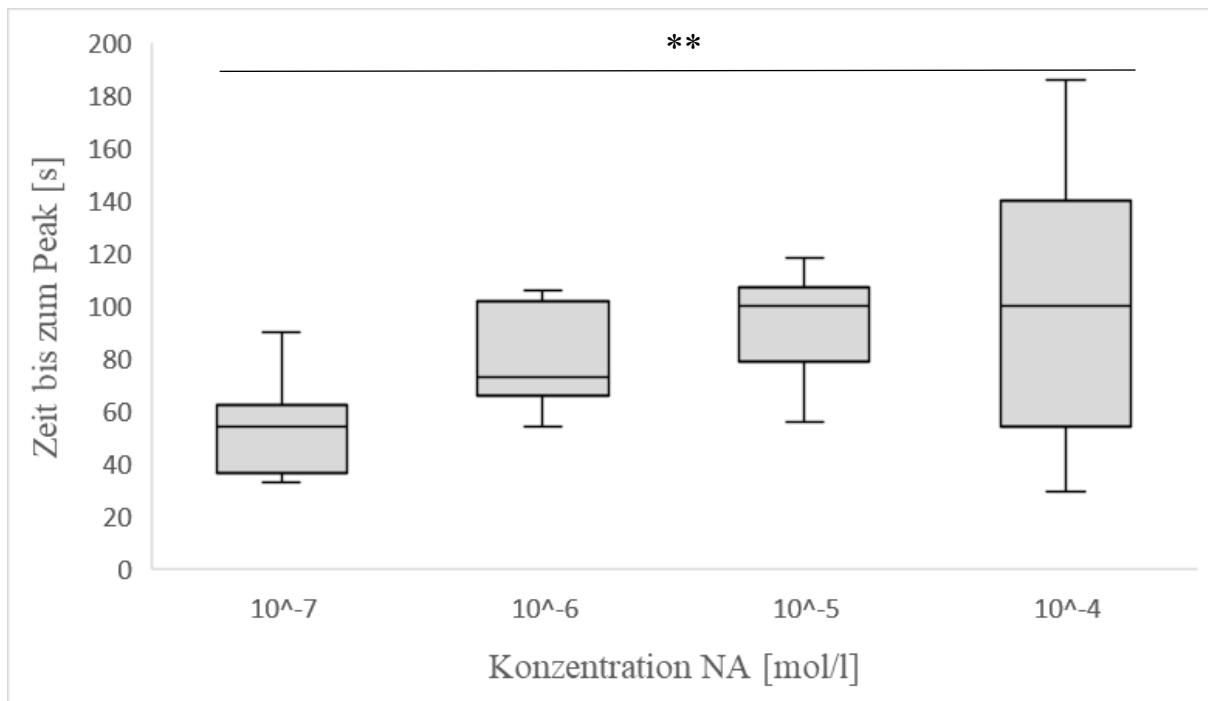


Abbildung 15: Zeit bis zum Erreichen des Peaks bei Präparaten der V. femoralis und Stimulation mit NA-Gabe in aufsteigender Konzentration. Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigt signifikante Unterschiede in der Dauer zwischen den verschiedenen Konzentrationen (**p<0,01). n=13

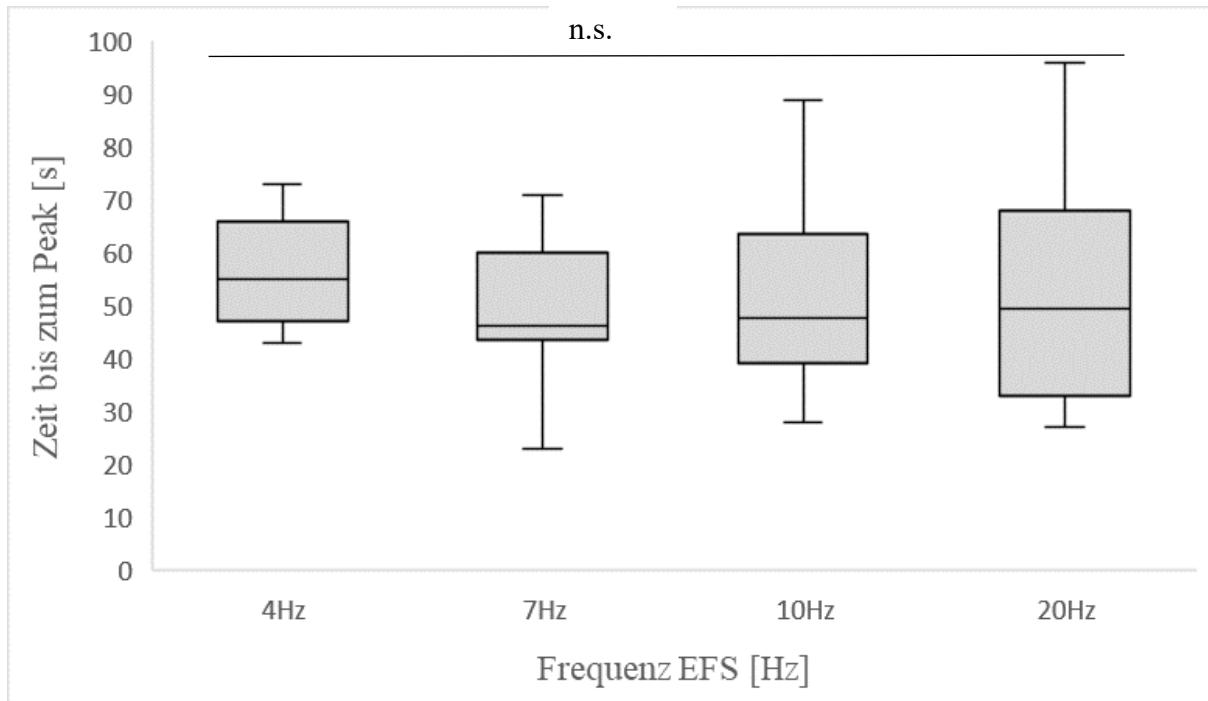


Abbildung 16: Zeit bis zum Erreichen des Peaks bei Präparaten der V. femoralis und Stimulation mit EFS in aufsteigender Frequenz. Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Dauer zwischen den verschiedenen Frequenzen. n=12

Die Frequenzen bis auf 1 Hz und 2 Hz aus den EFS-Experimenten und die vier Konzentrationen von NA wurden zusätzlich einander gegenübergestellt. Die verglichenen Paare befinden sich jeweils in vergleichbaren Intensitäten ihres Reizspektrums (siehe 2.1.4 und 2.1.5.4).

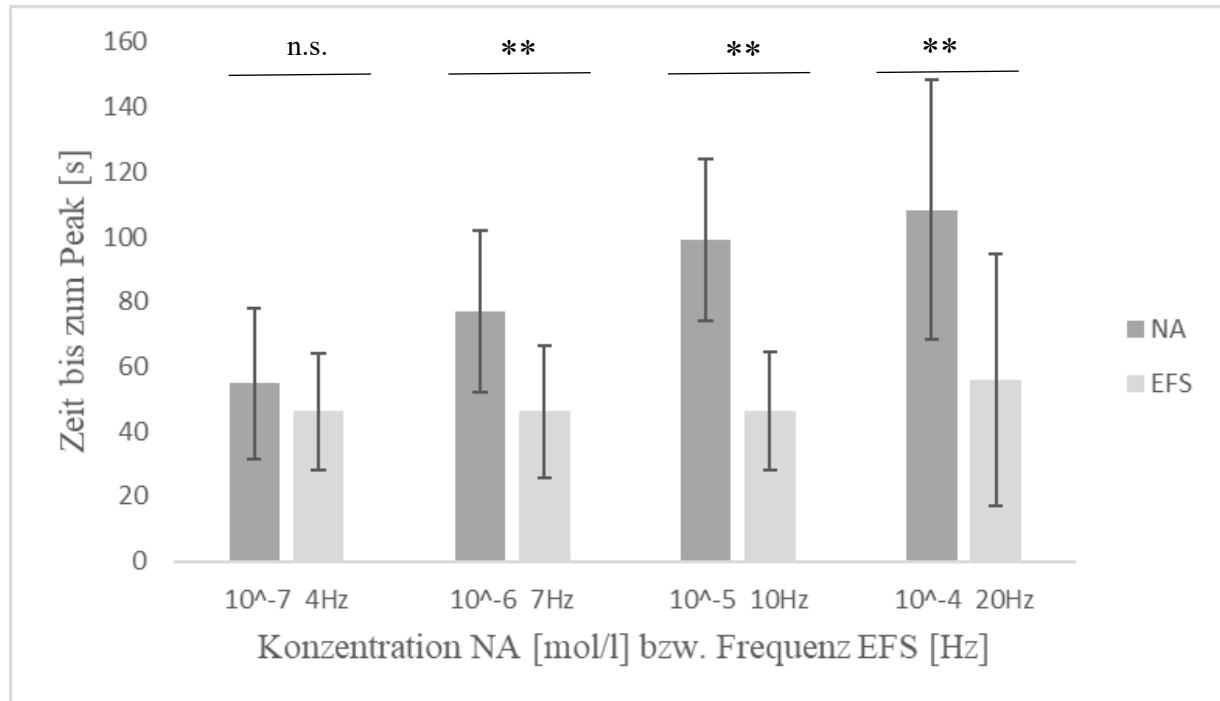


Abbildung 17: Zeit von Kontraktionsbeginn bis zum Peak bei Präparaten der V. cava

Die Dauer der Kontraktion bis zum Erreichen des Peaks wuchs bei der Aktivierung mit NA, während sie bei endogener Aktivierung mit EFS stabil blieb. Die NA- und EFS-Antworten wiesen bei den Stufen 10^{-6} mol/l NA/7Hz, 10^{-5} mol/l NA/10Hz und 10^{-4} mol/l NA/20Hz im t-Test für verbundene Stichproben signifikante Unterschiede auf ($**p<0,01$). NA und EFS jeweils $n=23$.

In den verglichenen Konzentrations- bzw. Frequenzstufen weisen die Stimulationseffekte abhängig von der Art der Aktivierung bei den Experimenten an der V. cava große Unterschiede auf. Während die Zeit bis zum Peak bei NA mit jeder Stufe zunimmt, bleibt sie bei EFS-Aktivierung gleich, wobei sich bei den ersten beiden verglichenen Stufen NA 10^{-7} mol/l und 4 Hz die Zeit bis zum Erreichen des Peaks der Kontraktion im t-Test für verbundene Stichproben noch nicht signifikant voneinander unterscheidet, wie in Abbildung 18 dargestellt. Alle anderen verglichenen Stufen weisen im t-Test für verbundene Stichproben signifikante Unterschiede auf: Das Erreichen des Peaks einer Kontraktion dauert bei der NA-Aktivierung länger.

Bei der Aktivierung mit NA zeigte sich bei Experimenten an der V. cava bei der Konzentration $NA10^{-7}$ mol/l ein Mittelwert von 54,8 (SD $\pm 23,3$) Sekunden bis zum Peak, bei der Konzentration $NA10^{-6}$ mol/l 77 (SD $\pm 24,9$), bei der Konzentration $NA10^{-5}$ mol/l 99 (SD ± 25) Sekunden und bei der Konzentration $NA10^{-4}$ mol/l 108,3 (SD $\pm 39,9$) Sekunden. Bei der Aktivierung mit EFS zeigte sich bei der Frequenz 4 Hz ein Mittelwert von 46,3 (SD ± 18) Sekunden bis zum Peak, bei der Frequenz 7 Hz 46,1 (SD $\pm 20,3$) Sekunden, bei der Frequenz 10 Hz 46,4 (SD $\pm 18,2$) Sekunden und bei der Frequenz 20 Hz 56 (SD $\pm 38,7$) Sekunden.

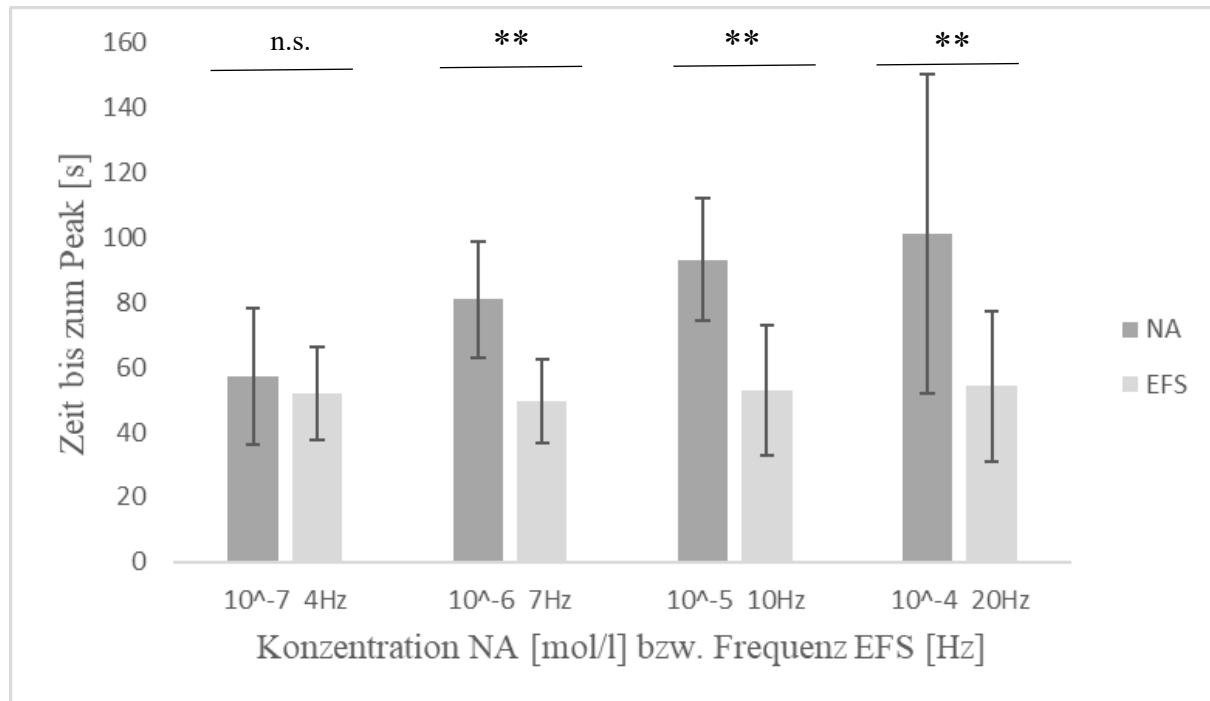


Abbildung 18: Zeit von Kontraktionsbeginn bis zum Peak bei Präparaten der V. femoralis

Die Dauer der Kontraktion bis zum Erreichen des Peaks wuchs bei der Aktivierung mit NA, während sie bei endogener Aktivierung mit EFS stabil blieb. Die NA- und EFS-Antworten wiesen bei den Stufen 10^{-6} mol/l NA/7Hz, 10^{-5} mol/l NA/10Hz und 10^{-4} mol/l NA/20Hz im T-Test für nicht verbundene Stichproben signifikante Unterschiede auf ($**p < 0,01$). NA $n=13$, EFS $n=12$.

In den Auswertungen zur V. femoralis (siehe Abbildung 19) zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der V. cava: Auch hier liegen bei allen verglichenen Stufen, außer der ersten, signifikante Unterschiede in der Zeit bis zum Erreichen des Peaks einer Kontraktion vor, auch hier dauert es bei der NA-Aktivierung mit jeder Stufe länger. Auffällig ist zudem die stark ausgeprägte Streuung bei NA 10^{-4} mol/l, ebenfalls ähnlich wie bei den Ergebnissen zur V. cava.

Bei der Aktivierung mit NA zeigte sich an der V. femoralis bei der Konzentration $NA10^{-7}$ mol/l ein Mittelwert von 57,1 (SD $\pm 20,9$) Sekunden bis zum Peak, bei der Konzentration $NA10^{-6}$ mol/l 80,8 (SD $\pm 17,7$) Sekunden, bei der Konzentration $NA10^{-5}$ mol/l 93,2 (SD $\pm 18,9$) Sekunden und bei der Konzentration $NA10^{-4}$ mol/l 100,9 (SD $\pm 49,1$) Sekunden. Bei der Aktivierung mit EFS zeigte sich bei der Frequenz 4 Hz ein Mittelwert von 52 (SD $\pm 14,5$) Sekunden bis zum Peak, bei der Frequenz 7 Hz 49,5 (SD $\pm 12,7$) Sekunden, bei der Frequenz 10 Hz 53 (SD $\pm 20,1$) Sekunden und bei der Frequenz 20 Hz 54,1 (SD $\pm 22,9$) Sekunden.

3.3 Kotransmission am glatten Muskel der Vene

Zur genaueren Untersuchung der Eigenschaften des Aktivierungsprozesses des glatten Venenmuskels wurden anschließend Experimente durchgeführt, die die Rolle der potentiell aktiven Kotransmitter genauer untersuchen. Die wichtigsten infrage kommenden konstringierend wirkenden Kotransmitter am glatten Muskel sind ATP und NPY (siehe 1.1).

Zunächst wurde durch die Blockade der für die Signalkaskade der jeweiligen Kotransmitter verantwortlichen Rezeptoren der Unterschied zwischen Aktivierungen aller Transmittersysteme per EFS und Aktivierungen mit Blockade eines Transmittersystems untersucht. Diese Experimente wurden mit jeweils einem Rezeptorblocker der beiden Transmittersysteme, zwei verschiedenen EFS-Aktivierungsprotokollen und an zwei verschiedenen Organen, V. cava und V. femoralis, durchgeführt.

Anschließend folgte zur genaueren Betrachtung der Kotransmitter an sich eine pharmakologische Versuchsreihe zur Auslösung von Kontraktionsantworten durch exogene Applikation der beiden untersuchten Kotransmitter. Auch diese Experimente wurden an zwei verschiedenen Organen, der V. cava und der V. femoralis, durchgeführt.

3.3.1 Experimente mit Antagonisten

Die Experimente mit Antagonisten wurden unter Verwendung von EFS durchgeführt. Dazu musste das Präparat nach Testung seiner Vitalität mittels K^+ -Kontraktur und einer Krafttestung mittels NA-Kontraktion so eingerichtet werden, dass eine Stimulation mittels EFS im neurogenen Spannungsbereich zu einer Kontraktionsantwort führte. War eine zuverlässige Kontraktionsantwort erreicht, wurde zum Sicherstellen der rein neurogenen Eigenschaft der Antwort ein Tetrodotoxin-Test (TTX, siehe 2.1.4.1) durchgeführt. Bestätigte dieser die neurogene Stimulation, wurden die zu dieser Reizantwort führenden Stimulationsparameter belassen. Nach dreifachem Auswaschen zur restlosen Entfernung des TTX wurde die EFS mit

den ermittelten Stimulationsparametern erneut durchgeführt. Bei regelmäßiger Antwort konnten nun die Antagonisten in aufsteigenden Konzentrationen hinzu pipettiert werden.

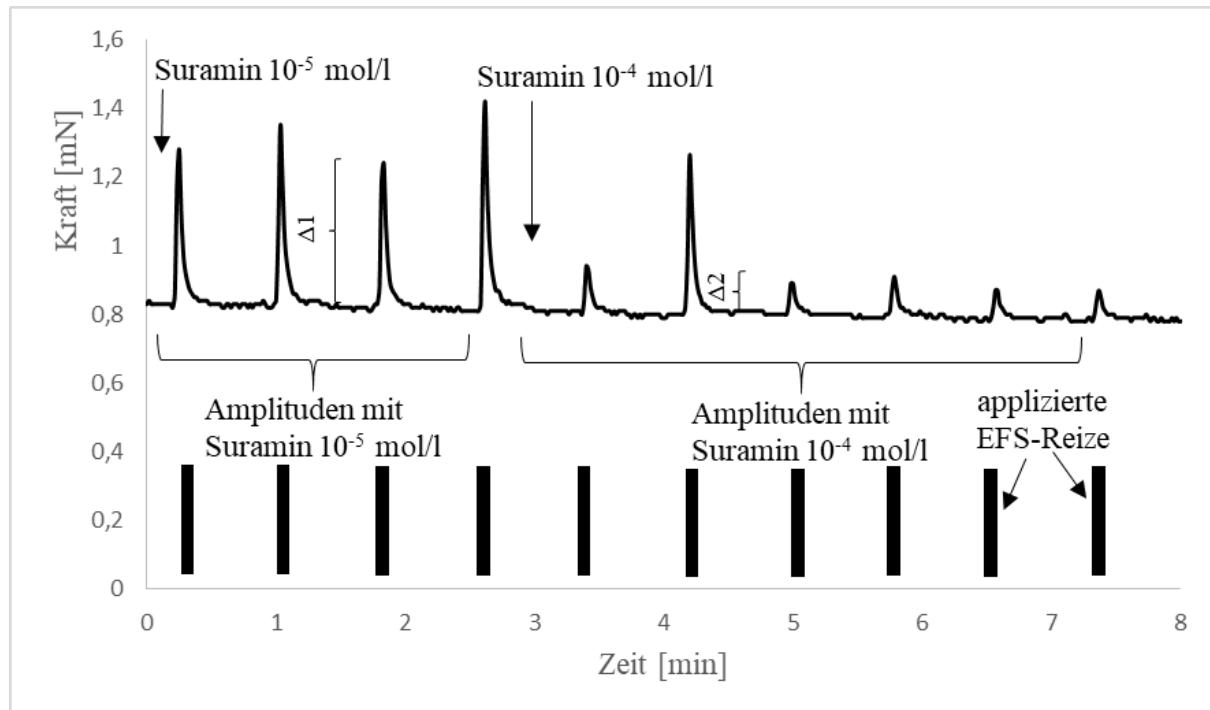


Abbildung 19: Darstellung der Auswertemethode der Antagonistenexperimente

am Beispiel eines Ausschnitts aus einer Originalaufzeichnung mit Suramin. Die schwarzen Balken zeigen die regelmäßig applizierten Spannungsreize der EFS, die Registrierung darüber die Kraftveränderung des untersuchten Präparats. $\Delta 1$ entspricht einer beispielhaften Amplitudenausmessung im Bereich der Kontraktionen mit Suramin 10^{-5} mol/l, $\Delta 2$ einer beispielhaften Amplitudenausmessung der Kontraktionen mit Suramin 10^{-4} mol/l. Um die Kontraktionsantworten der verschiedenen Konzentrationen zu vergleichen wurde der Mittelwert aller Amplituden einer Konzentrationsstufe (gekennzeichnet durch die horizontalen Klammern) gebildet.

Nach der Applikation jeder Konzentration einer Substanz fanden zwischen drei und sechs Stimulationen statt, bis dann die nächste Konzentration hinzugegeben wurde. Für die Auswertung wurden die Amplituden der auf diese Stimulationen folgenden einzelnen Kontraktionen unter Verwendung der Cursorfunktion des LabChart ausgemessen. Gemessen wurde jeweils, wie in Abbildung 20 gekennzeichnet, die Differenz zwischen dem vor der Kontraktion befindlichen Basaltonus und dem Peak der Kontraktion. Die erhobenen Daten wurden zunächst innerhalb der einzelnen Konzentrationen genauer beleuchtet. Dafür wurden die erste und die letzte Kontraktion jeder Konzentrationsstufe miteinander verglichen, um Veränderungen und Dynamiken innerhalb einer Konzentrationsstufe zu betrachten (Daten nicht

gezeigt). Hierbei ließen sich keine signifikanten Unterschiede der Kontraktionsantworten feststellen.

Der nächste Schritt bestand im Vergleichen der Konzentrationsstufen einer Substanz. Für diese Auswertung wurden für jedes Präparat der Mittelwert der Amplituden einer Konzentrationsstufe berechnet und die auf diese Art erhobenen Mittelwerte dann auf den Mittelwert der Kontraktionen, die ohne Einflüsse durch eine Substanz durchgeführt wurden, normiert, also die Quotienten gebildet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der normierten Daten wurden dann graphisch dargestellt.

Bei der Durchführung von langen und hochfrequenten (20 Hz, Stimulationsprotokolle siehe Tabelle 3 in 2.1.4.2) Stimulationen im Anschluss an die Experimente mit einzelnen Reizen befand sich bereits die höchste Konzentration der jeweiligen Substanz im Organbad. Da sich große Streuungen und lediglich graphisch sichtbare, nicht aber statistisch signifikante Unterschiede zeigten, sind diese Daten hier nicht gezeigt, teilweise aber im Anhang dargestellt.

3.3.1.1 *Suramin*

Die Experimente mit dem P2X-Rezeptorantagonisten Suramin wurden bei laufender EFS mit Kontrollpräparat ohne Suramingabe zur Erfassung von Zeiteffekten und den Konzentrationen 10^{-8} bis 10^{-4} mol/l an V. cava und V. femoralis durchgeführt.

Für die Auswertung wurden die Daten mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Es zeigte sich bei der V. cava für die Datensätze, in denen Suramin zur Anwendung gekommen war, keine Normalverteilung. Hier kamen der Wilcoxon-Test und der Kruskal-Wallis-Test zur Signifikanztestung in Gebrauch. Bei den Kontrollversuchen an Präparaten der V. cava und bei allen Experimenten an Präparaten der V. femoralis zeigte sich eine Normalverteilung. Hier wurde mit t-Test und einfaktorieller Varianzanalyse auf Signifikanzen getestet.

Bei den Experimenten mit Präparaten der V. cava zeigte sich ein unregelmäßiges Bild mit großer Streuung und weder einem graphisch sichtbaren, noch einem statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Daten der Experimente und denen der Kontrollpräparate zur Erfassung von Zeiteffekten. Dies war sowohl bei den Einzelstimulationen, als auch beim Versuchsprotokoll mit langen, hochfrequenten Stimulationen im Abstand von 5 Minuten der Fall (Stimulationsparameter siehe Tabelle 3 in 2.1.4.2). Bei der Versuchsreihe mit Einzelstimulationen zeigte sich wie in Abbildung 21 dargestellt bei der Konzentration Suramin 10^{-8} mol/l eine Kraftentwicklung von 94,1 % (SD $\pm 22,1$ %) von der Kraftentwicklung ohne

Suramin, bei der Konzentration 10^{-7} mol/l 97 % (SD $\pm 26,5$ %), bei der Konzentration 10^{-6} mol/l 91,4 % (SD $\pm 26,6$ %), bei der Konzentration 10^{-5} mol/l 93,7 % (SD $\pm 32,5$ %) und bei der Konzentration 10^{-4} mol/l 86,7 % (SD ± 45 %). Die parallel laufenden Kontrollstimulationen ohne Suraminzugabe zeigten zum Zeitpunkt der Gabe der Konzentration Suramin 10^{-8} mol/l im Experiment eine Kraftentwicklung von 74 % (SD $\pm 45,6$ %) von der Kraftentwicklung zum Zeitpunkt ohne Suramin im Experiment, bei der Konzentration 10^{-7} mol/l 102,3 % (SD $\pm 18,3$ %), bei der Konzentration 10^{-6} mol/l 97,5 % (SD ± 16 %), bei der Konzentration 10^{-5} mol/l 98,2 % (SD ± 20 %) und bei der Konzentration 10^{-4} mol/l 89,5 % (SD $\pm 18,3$ %).

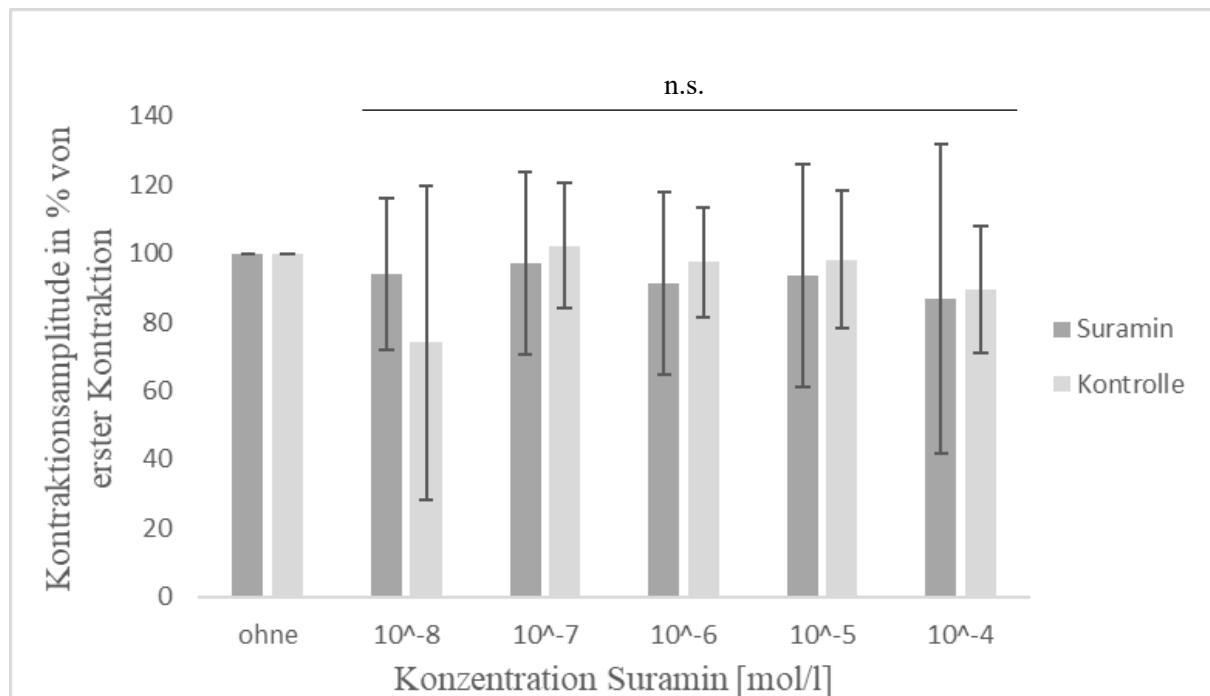


Abbildung 20: Durchschnittswerte der Kontraktionsamplituden der V. cava mit EFS-Einzelstimulationen und kumulativer Gabe von Suramin

sowie Kontrolle zur Erfassung von Zeiteffekten. Durch große Streuung und viele Unregelmäßigkeiten lässt sich mit dem Wilcoxon- bzw. Kruskal-Wallis-Test kein messbarer Unterschied zwischen Experiment und Kontrolle bzw. innerhalb einer Gruppe ausmachen. Suramin: $n=15$, Kontrolle: $n=8$

Die Durchschnittswerte der Kontraktionen bei Experimenten mit Präparaten der V. femoralis lassen graphisch eine erhöhte Streuung und einen inhibierenden Effekt des Suramins erahnen (siehe Abbildung 22). In einem t-Test für nicht verbundene Stichproben wurde jede einzelne Konzentrationsstufe der zeitgleich stattgefundenen Kontrolle ohne Substanzgabe gegenübergestellt. Hierbei zeigte sich lediglich bei der Stufe 10^{-6} mol/l ein signifikanter Unterschied ($*p<0,05$) zur Kontrollmessung. Alle anderen Stufen zeigten keine signifikanten

Unterschiede zwischen Daten mit Suramingabe und Kontrolldaten in den erreichten Durchschnittswerten der Amplituden. Es zeigte sich bei der Konzentration Suramin 10^{-8} mol/l eine Kraftentwicklung von 86,5 % (SD $\pm 19,4$ %) von der Kraftentwicklung ohne Suramin, bei der Konzentration 10^{-7} mol/l 84,3 % (SD $\pm 23,8$ %), bei der Konzentration 10^{-6} mol/l 76,7 % (SD $\pm 17,8$ %), bei der Konzentration 10^{-5} mol/l 77,3 % (SD $\pm 17,1$ %) und bei der Konzentration 10^{-4} mol/l 74,7 % (SD $\pm 28,5$ %). Die parallel laufenden Kontrollstimulationen ohne Suraminzugabe zeigten zum Zeitpunkt der Gabe der Konzentration Suramin 10^{-8} mol/l im Experiment eine Kraftentwicklung von 101,3 % (SD $\pm 11,5$ %) von der Kraftentwicklung zum Zeitpunkt ohne Suramin im Experiment, bei der Konzentration 10^{-7} mol/l 94,7 % (SD $\pm 11,2$ %), bei der Konzentration 10^{-6} mol/l 93,5 % (SD $\pm 10,9$ %), bei der Konzentration 10^{-5} mol/l 91,6 % (SD ± 10 %) und bei der Konzentration 10^{-4} mol/l 93,2 % (SD $\pm 7,8$ %)

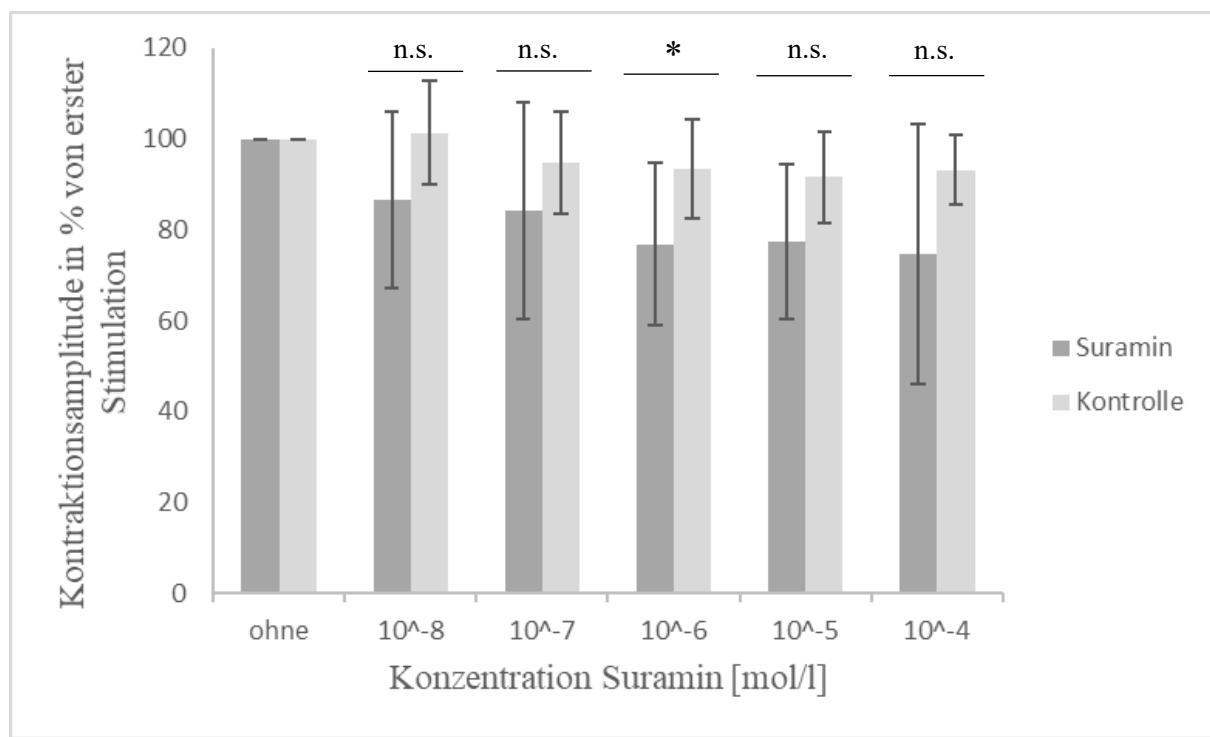


Abbildung 21: Durchschnittswerte der Kontraktionsamplituden der V. femoralis mit EFS-Einzelstimulationen und kumulativer Gabe von Suramin

sowie Kontrolle zur Erfassung von Zeiteffekten. Die graphisch sichtbare Verringerung der Kontraktionsamplitude durch Gabe von Suramin ergab im t-Test für nicht verbundene Stichproben nur bei der Konzentrationsstufe 10^{-6} mol/l im Vergleich zur zeitgleich stattgefundenen Kontrolle ohne Substanz eine Signifikanz ($*p<0,05$). Die Testung der Daten mit Suramin verpasste in der einfaktoriellen Varianzanalyse nur knapp das Signifikanzniveau ($p=0,06$). Die Varianzanalyse der Kontrolldaten zeigte keine signifikante Veränderung (Daten im Anhang). Suramin: $n=11$, Kontrolle: $n=7$

Aufgrund der großen Streuungen und der graphisch deutlich erkennbaren Abnahme der Kraftentwicklung im Vergleich zur Ausgangssituation bei den Experimenten bei Suramingabe wurde zum Vergleich der Dynamik beider Gruppen im zeitlichen Verlauf eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Diese verpasste bei den Durchschnittswerten der Kontraktionen mit Suramingabe knapp das Signifikanzniveau für eine signifikante Abnahme der Amplituden ($p=0,06$), die Kontrolldaten zeigten keine signifikante Veränderung.

Bei den intensiven Stimulationen (Stimulationsparameter siehe Tabelle 3 in 2.1.4.2) mit der höchsten Suraminkonzentration im Organbad zeigten sich wiederum graphisch erkennbare, aber in der nicht verbundenen Testung per t-Test nicht signifikante Unterschiede zwischen Daten mit Suramingabe und Kontrolldaten. Die Daten sind im Anhang dargestellt.

3.3.1.2 BIBP3226

Die Experimente mit dem Y1-Antagonisten BIBP3226 wurden in ähnlicher Weise wie die Experimente mit Suramin bei laufender EFS mit Kontrolle zur Erfassung von Zeiteffekten und der Konzentration BIBP3226 10^{-6} mol/l im Organbad an V. cava und V. femoralis durchgeführt. Auch wurden beide in 3.2.1 beschriebenen Aktivierungsprotokolle mit der EFS durchgeführt.

Die Experimente ergaben nicht bei der V. cava, jedoch bei der V. femoralis signifikante Ergebnisse einer Reduktion der EFS-Antwort bei Rezeptorblockade. Bei den Experimenten an V. cava-Präparaten zeigte sich wie in Abbildung 23 dargestellt eine Reduktion der Kraftentwicklung auf 87,5 % ($SD \pm 16,6$ %) der ohne BIBP3226 durchschnittlich erreichten Kraft. Die Kontrollexperimente ohne BIBP3226 zeigten bei Messung zum Zeitpunkt der Substanzgabe im Experiment eine Reduktion der Kraftentwicklung auf 79 % ($SD \pm 21,4$ %). Der gepaarte t-Test zwischen den Messungen vor und nach Substanzgabe zeigte ebenso wie der ungepaare t-Test zwischen den Messungen mit Substanzgabe und den zeitgleich erhobenen Daten von Kontrollpräparaten ohne Substanzgabe keine signifikante Veränderung der Kraftentwicklung.

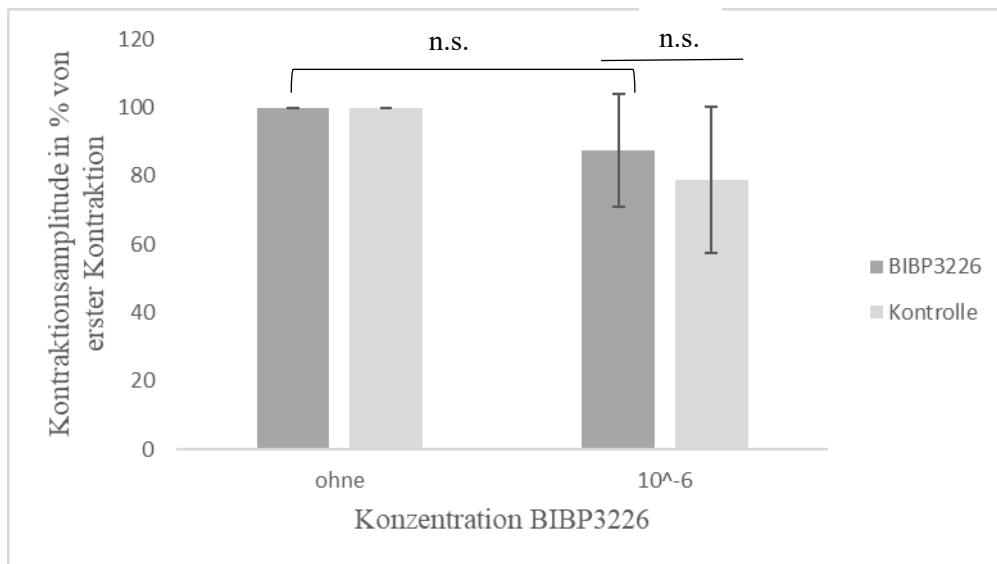


Abbildung 22: Durchschnittswerte der Kontraktionsamplituden der V. cava mit EFS-Einzelstimulationen und Gabe von BIBP3226

sowie Kontrolle zur Erfassung von Zeiteffekten. Es lässt sich mit dem t-Test kein messbarer Unterschied zwischen Experiment und Kontrolle bzw. innerhalb einer Gruppe ausmachen. BIBP3226: $n=15$, Kontrolle: $n=11$.

Bei den Experimenten an V. femoralis-Präparaten (siehe Abbildung 24) zeigte sich eine Reduktion der Kraftentwicklung auf 78,9 % ($SD \pm 18\%$) der ohne BIBP3226 durchschnittlich erreichten Kraft. Die Kontrollexperimente ohne BIBP3226 zeigten bei Messung zum Zeitpunkt der Substanzgabe im Experiment eine Zunahme der Kraftentwicklung auf 122 % ($SD \pm 24,9\%$). Der gepaarte t-Test zwischen den Messungen vor und nach BIBP3226-Gabe zeigte eine signifikante Reduktion der Kraftentwicklung nach Substanzgabe ($*p<0,05$). Bei den Kontrolldaten, die zu den gleichen Zeitpunkten ohne Substanzgabe erhoben wurden, zeigte der gepaarte t-Test keine signifikante Veränderung der Kraftentwicklung. Der ungepaarte t-Test zwischen den Messungen nach Substanzgabe und den Messungen an Kontrollpräparaten zum gleichen Zeitpunkt zeigte einen signifikanten Unterschied ($*p<0,05$).

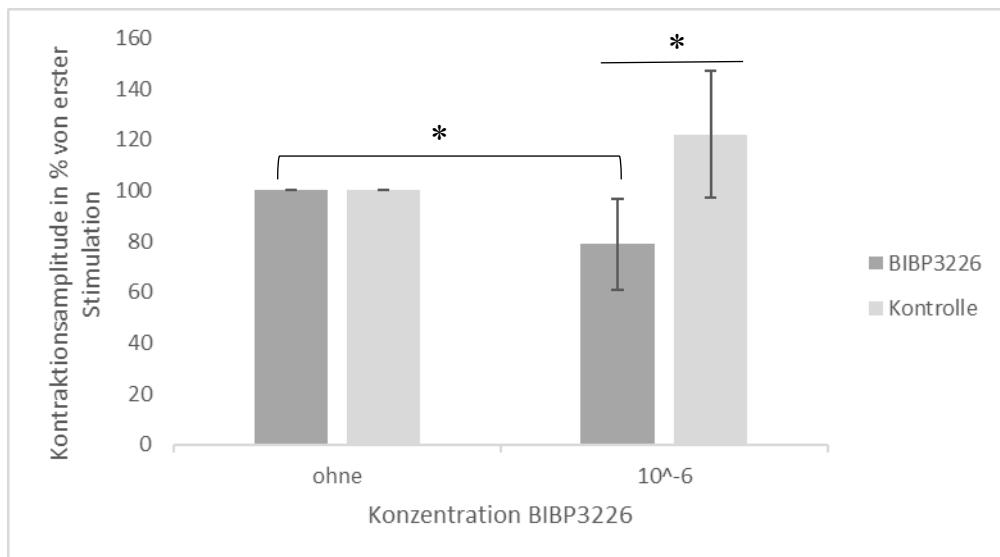


Abbildung 23: Durchschnittswerte der Kontraktionsamplituden der V. femoralis mit EFS-Einzelstimulationen und Gabe von BIBP3226

sowie Kontrolle zur Erfassung von Zeiteffekten. Der *t*-Test für nicht verbundene Stichproben zeigte einen signifikanten Unterschied in der Kraftentwicklung zwischen Experiment und Kontrolle ($*p<0,05$). Im *t*-Test für verbundene Stichproben zeigte sich zudem eine signifikante Reduktion der Kraftentwicklung zwischen den Kontraktionen mit und ohne Substanz ($*p<0,05$). Die Kontrolldaten unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. BIBP3226: $n=6$, Kontrolle: $n=4$.

An der V. cava zeigte sich ein unregelmäßiges, schwer zu interpretierendes Bild, welches eine Rolle von NPY als Transmitter an venösen Gefäßen unwahrscheinlich erscheinen lässt, an der V. femoralis hingegen ist trotz geringer Stichprobengröße ein Effekt nachweisbar. Aufgrund der großen Streuung (siehe 4.1.2 und 4.2.2.2) und der Wahrscheinlichkeit, dass mögliche geringe Effekte an der V. cava aus diesem Grund nicht nachgewiesen werden konnten, wurde NPY jedoch ebenso wie ATP an beiden Organen in die nachfolgenden Experimente mit Rezeptoragonisten aufgenommen.

Die Daten mit langer und hochfrequenter Stimulation (Stimulationsparameter siehe Tabelle 3 in 2.1.4.2) zeigten bei beiden Organen ein unregelmäßiges Bild und sind im Anhang dargestellt.

3.3.2 Experimente mit Agonisten

Die Experimente wurden im Organbad nach einer Testung ihrer Vitalität mittels K^+ -Kontraktur und einer Krafttestung mittels NA-Kontraktion mit aufsteigenden Konzentrationen durchgeführt.

Graphisch dargestellt sind jeweils die Kraftentwicklungen des sbt (standard basal tone, Wert der Vorspannung des Präparats ohne äußere Einflüsse unmittelbar vor der ersten Applikation einer Substanz) und aller kumulativ applizierten Agonistenkonzentrationen.

3.3.2.1 Adenosintriphosphat (ATP)

Die Testung auf ATP-Effekte wurde, basierend auf publizierten Konzentrations-Wirkungsdaten (siehe 2.1.5.6) im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-3} mol/l durchgeführt. Sie wurden kumulativ im Abstand von etwa 100 Sekunden zugegeben. Wie in der beispielhaften originalen Messaufzeichnung sichtbar (siehe Abbildung 25), löste ATP besonders im höher konzentrierten Bereich eine Reaktion des Präparats aus.

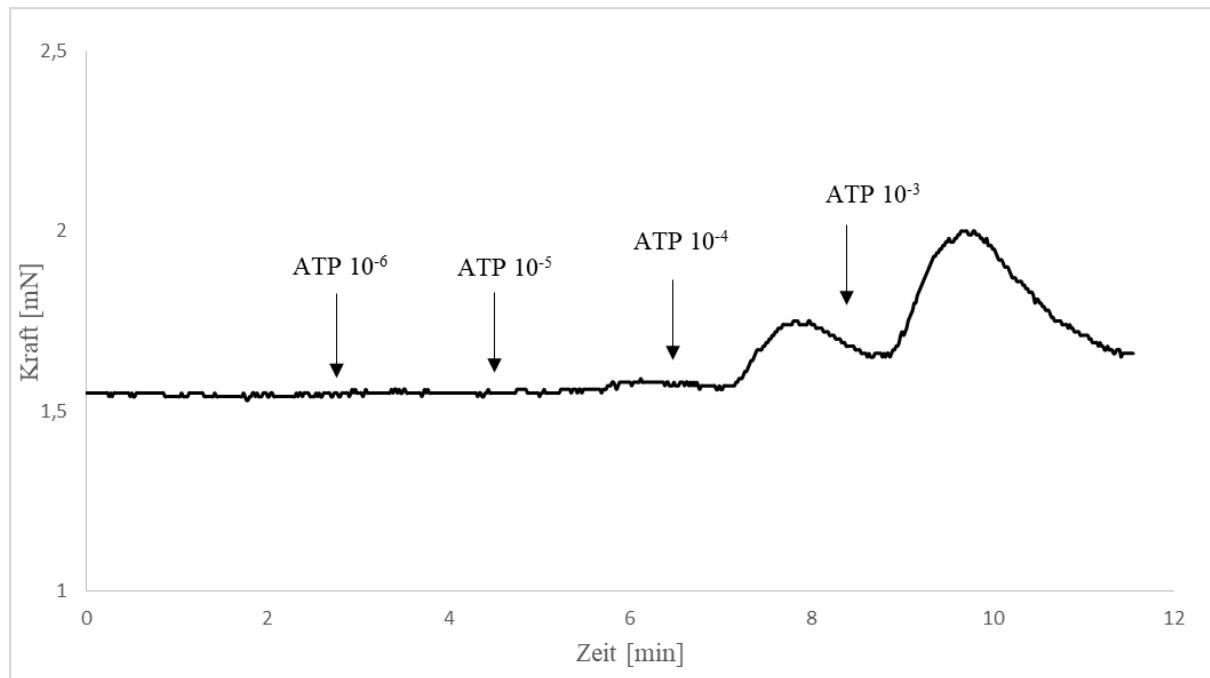


Abbildung 24: Originalaufzeichnung einer V. femoralis bei Gabe von ATP

in vier verschiedenen Konzentrationsstufen, angegeben in mol/l. Eine Veränderung im Kraftniveau des Präparats ist ab der Applikation der Konzentration 10^{-5} mol/l zu beobachten.

Untersucht wurden Präparate der V. cava und der V. femoralis. Es wurden die Ergebnisse der Höchstkonzentration von ATP 10^{-3} mol/l und jene vom Basaltonus gegenübergestellt und abhängig vom Vorhandensein einer Normalverteilung in den Daten per t-Test bzw. Wilcoxon-Test auf signifikante Unterschiede im erreichten Tonus untersucht. Des Weiteren wurden die

Daten mit einfaktorieller Varianzanalyse und Friedman-Test auf eine signifikante Veränderung des erreichten Tonus im Verlauf der verschiedenen Kontraktionsstufen untersucht. Hierbei wurde bei den laut Shapiro-Wilk-Test normalverteilten Daten der V. cava die einfaktorielle Varianzanalyse angewendet, während bei den im Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilten Daten der V. femoralis der Friedman-Test zum Einsatz kam.

Bei den Experimenten an V. cava-Präparaten (siehe Abbildung 26) zeigt sich ohne ATP eine erreichte Kraftentwicklung mit einem Median von 1,11 mN (IQR 0,9 mN), was dem Basaltonus entspricht, bei der Konzentration ATP 10^{-6} mol/l 1,14 mN (IQR 0,9 mN), bei der Konzentration ATP 10^{-5} mol/l 1,13 mN (IQR 0,9 mN), bei der Konzentration ATP 10^{-4} mol/l 1,15 mN (IQR 0,8 mN) und bei der Konzentration ATP 10^{-3} mol/l 1,22 mN (IQR 0,7 mN).

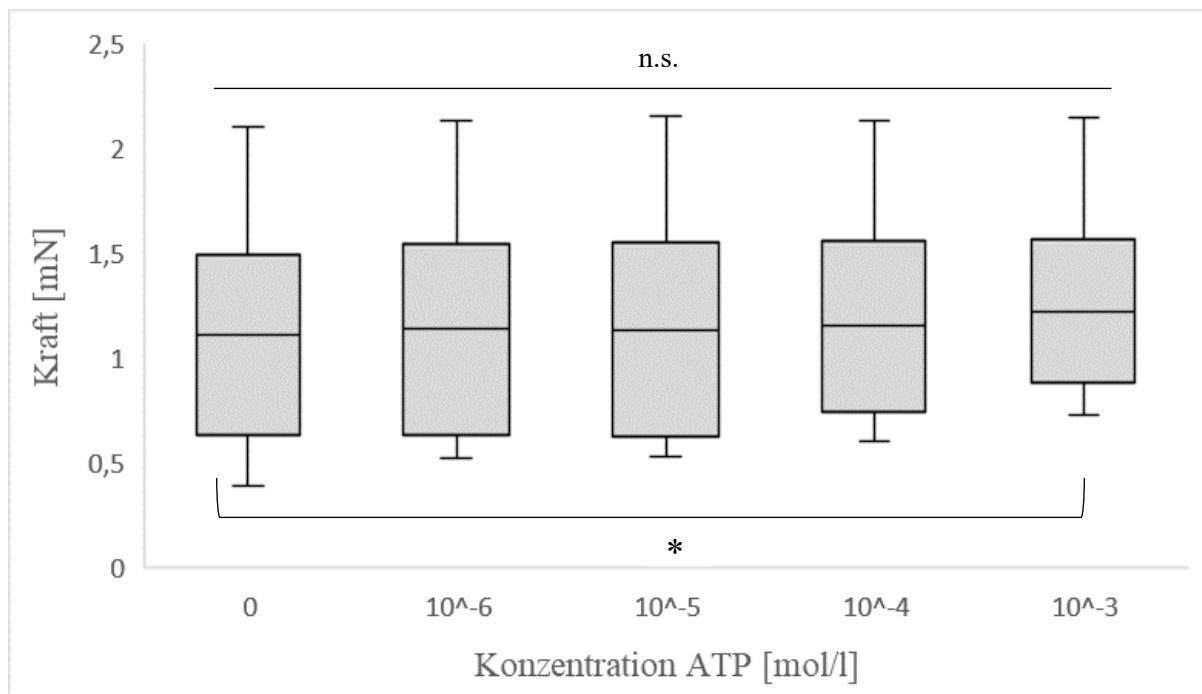


Abbildung 25: Darstellung der durchschnittlich erreichten Kontraktionsamplituden der V. cava-Präparate mit verschiedenen ATP-Konzentrationen und des Basaltonus

Der t-Test für verbundene Stichproben zwischen Basaltonus und Maximalkonzentration ergab für die höchste getestete Konzentration im Vergleich zum Ausgangswert und Kontrollbedingungen einen signifikanten Unterschied im erreichten Tonus ($*p<0,05$). Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte aufgrund der Streuung trotz graphisch sichtbarer Tendenz keine Signifikanz. $n=6$.

Der t-Test für verbundene Stichproben zeigt bei der V. cava einen signifikanten Unterschied in der Kraftentwicklung zwischen dem Basaltonus und der Konzentration ATP 10^{-3} mol/l mit

einem Signifikanzniveau von $*p<0,05$. Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigt keine signifikant andere Kraftentwicklung.

Die Auswertungen der Daten von Experimenten mit V. femoralis-Präparaten (siehe Abbildung 27) zeigen deutlichere Ergebnisse. Es besteht nicht nur eine deutliche graphisch sichtbare Tendenz, sondern es sind auch signifikante Unterschiede in der Kraftentwicklung nachweisbar. Weil die Daten im Shapiro-Wilk-Test nicht für alle Konzentrationen eine Normalverteilung aufwiesen, wurde in diesem Fall der Friedman-Test angewendet.

Es zeigte sich ohne ATP eine erreichte Kraftentwicklung mit einem Median von 1,34 mN (IQR 0,2 mN), was dem Basaltonus entspricht, bei der Konzentration ATP 10^{-6} mol/l 1,47 mN (IQR 0,1 mN), bei der Konzentration ATP 10^{-5} mol/l 1,48 mN (IQR 0,2 mN), bei der Konzentration ATP 10^{-4} mol/l 1,46 mN (IQR 0,3 mN) und bei der Konzentration ATP 10^{-3} mol/l 1,57 mN (IQR 0,4 mN).

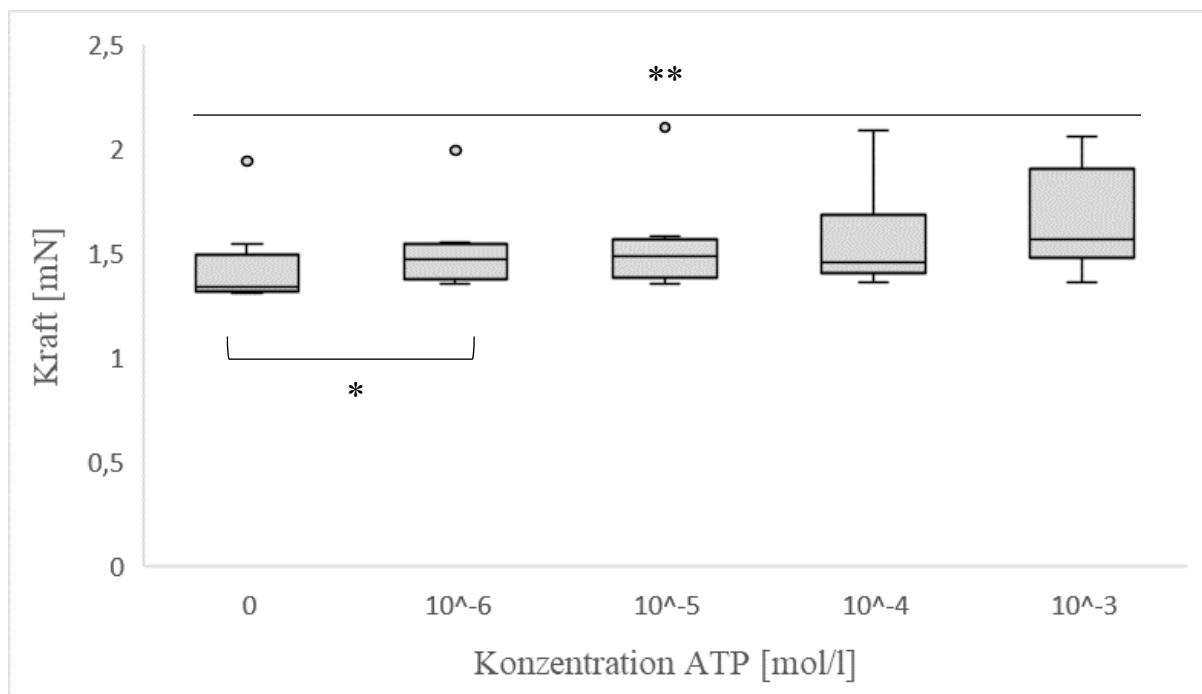


Abbildung 26: Darstellung der durchschnittlich erreichten Kontraktionsamplituden der V. femoralis-Präparate mit verschiedenen ATP-Konzentrationen und des Basaltonus

Der Friedman-Test zeigt einen signifikanten Unterschied im erreichten Tonus ($**p<0,01$). Der Wilcoxon-Test zeigt, dass der Tonus bereits zwischen dem Basaltonus und der Minimalkonzentration ATP 10^{-6} mol/l signifikant unterschiedlich ist ($*p<0,05$). $n=6$.

Es wurde ein Wilcoxon-Test durchgeführt, welcher an der V. femoralis bereits zwischen der Konzentration ATP 10^{-6} mol/l und dem Basaltonus einen signifikanten Unterschied mit einem

Signifikanzniveau von $*p<0,05$ zeigt. Der Friedman-Test zeigt ebenfalls einen signifikanten Unterschied in der Kraftentwicklung ($**p<0,01$).

3.3.2.2 Neuropeptid Y (NPY)

Die Testung auf NPY-Effekte wurde, basierend auf publizierten Konzentrations-Wirkungsdaten (siehe 2.1.5.7) im Bereich von 10^{-11} bis $3*10^{-8}$ mol/l durchgeführt. Sie wurden im Abstand von etwa fünf Minuten kumulativ zugegeben. In der beispielhaften Originalaufzeichnung (Abbildung 28) eines Experiments mit NPY ist eine geringfügige kontraktile Wirkung der Substanz zu beobachten.

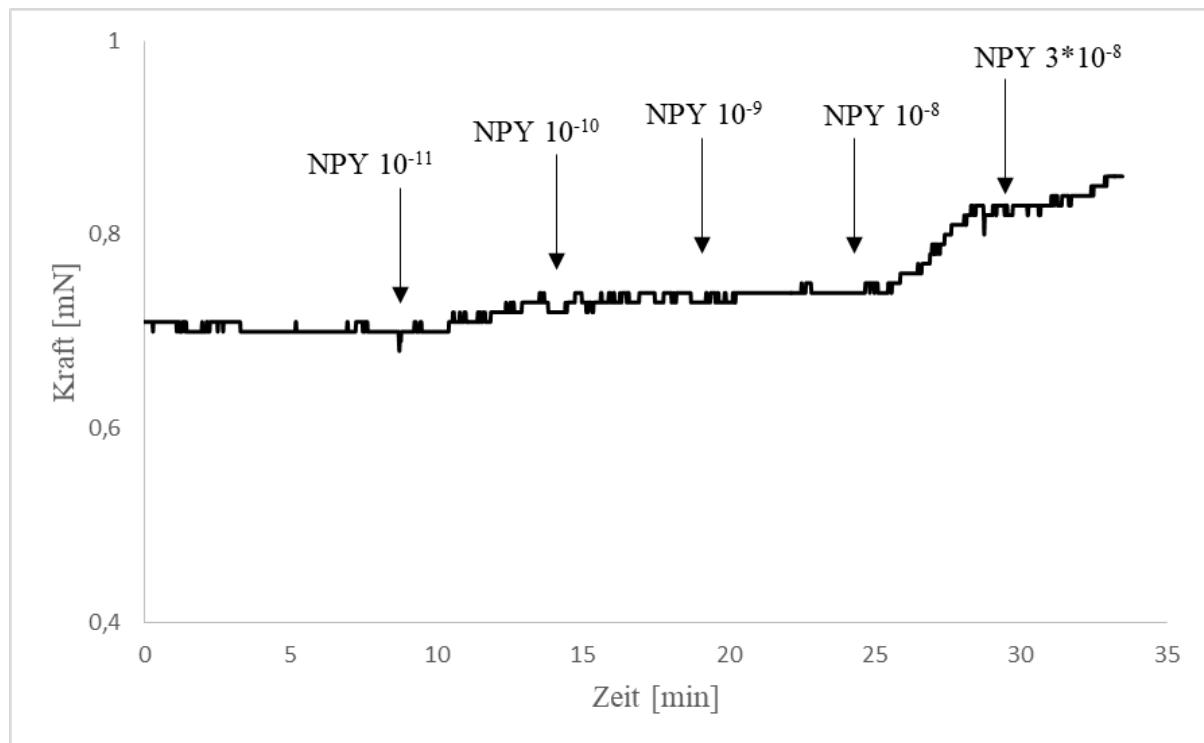


Abbildung 27: Originalaufzeichnung einer V. cava bei Gabe von NPY

in fünf verschiedenen Konzentrationsstufen, angegeben in mol/l. Bereits ab der niedrigsten Konzentration ist in diesem Experiment eine Änderung des Kraftniveaus zu beobachten.

Wie bei den Experimenten mit ATP wurden V. cava und V. femoralis der Ratte untersucht, auch die Vorgehensweise war die gleiche: Mittels Shapiro-Wilk-Test wurde für alle Datensätze eine Normalverteilung festgestellt, dementsprechend wurden die Ergebnisse der Höchstkonzentration von NPY $3*10^{-8}$ mol/l jenen des Basaltonus gegenübergestellt und per t-Test für verbundene Stichproben auf signifikante Unterschiede im erreichten Tonus untersucht. Die Veränderung des erreichten Tonus im Verlauf wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse untersucht.

An der V. cava (siehe Abbildung 29) zeigt sich ohne NPY eine erreichte Kraftentwicklung mit einem Median von 1 mN (IQR 0,5 mN), was dem Basaltonus entspricht, bei der Konzentration NPY 10^{-11} mol/l 0,9 mN (IQR 0,5 mN), bei der Konzentration NPY 10^{-10} mol/l 0,8 mN (IQR 0,5 mN), bei der Konzentration NPY 10^{-9} mol/l 0,8 mN (IQR 0,5 mN), bei der Konzentration NPY 10^{-8} mol/l 1,1 mN (IQR 0,8 mN), und bei der Konzentration NPY $3 \cdot 10^{-8}$ mol/l 1 mN (IQR 0,6 mN).

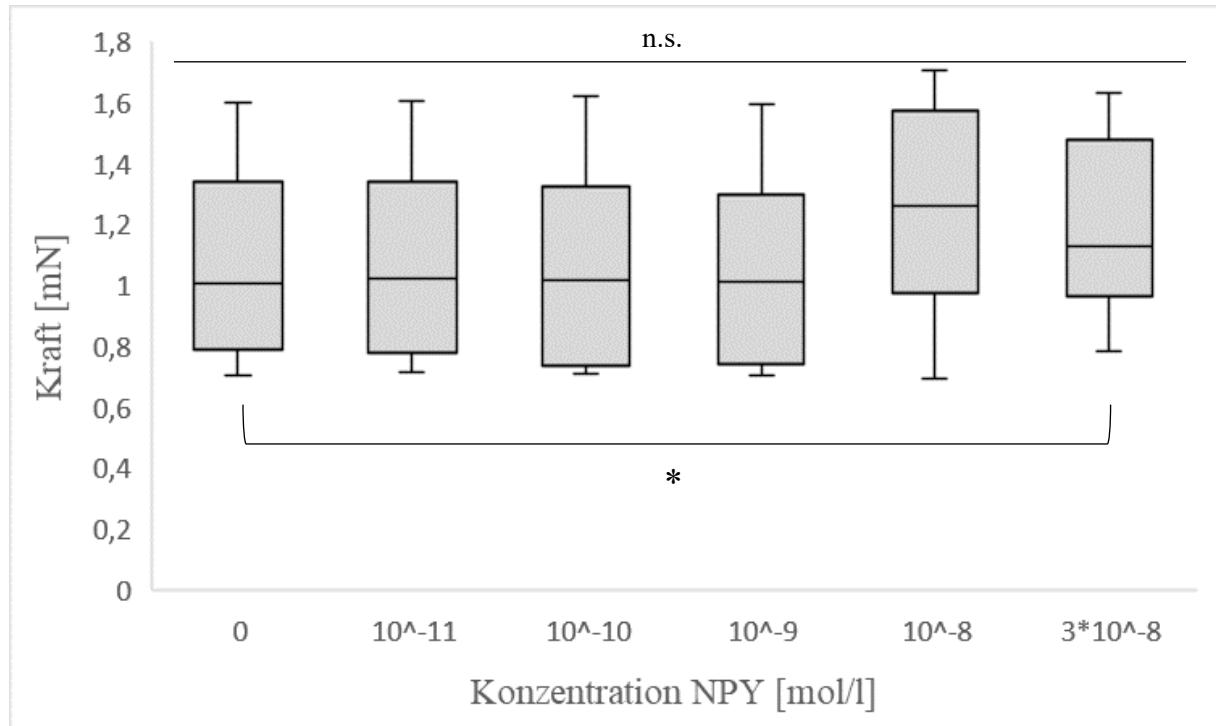


Abbildung 28: Darstellung der durchschnittlich erreichten Kontraktionsamplituden der V. cava-Präparate mit verschiedenen NPY-Konzentrationen und des Basaltonus

Der t-Test für verbundene Stichproben zwischen Basaltonus und Maximalkonzentration ergab einen signifikanten Unterschied im erreichten Tonus ($*p < 0,05$). Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte trotz graphisch sichtbarer Tendenz keine Signifikanz. $n=8$

Der t-Test für verbundene Stichproben zeigt an der V. cava einen signifikanten Unterschied beim Vergleich des erreichten Tonus bei Gabe der Höchstkonzentration von NPY, $3 \cdot 10^{-8}$ mol/l, im Vergleich zum Basaltonus. Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigt keine Signifikanz.

An der V. femoralis (siehe Abbildung 30) zeigt sich ohne NPY eine erreichte Kraftentwicklung mit einem Median von 1,4 mN (IQR 0,2 mN), was dem Basaltonus entspricht, bei der Konzentration NPY 10^{-11} mol/l 1,3 mN (IQR 0,1 mN), bei der Konzentration NPY 10^{-10} mol/l 1,3 mN (IQR 0,1 mN), bei der Konzentration NPY 10^{-9} mol/l 1,3 mN (IQR 0,2 mN), bei der Konzentration NPY 10^{-8} mol/l 1,3 mN (IQR 0,3 mN), und bei der Konzentration NPY $3 \cdot 10^{-8}$

mol/l 1,3 mN (IQR 0,3 mN). Insgesamt zeigt sich ein unregelmäßiges Bild mit vielen Ausreißern.

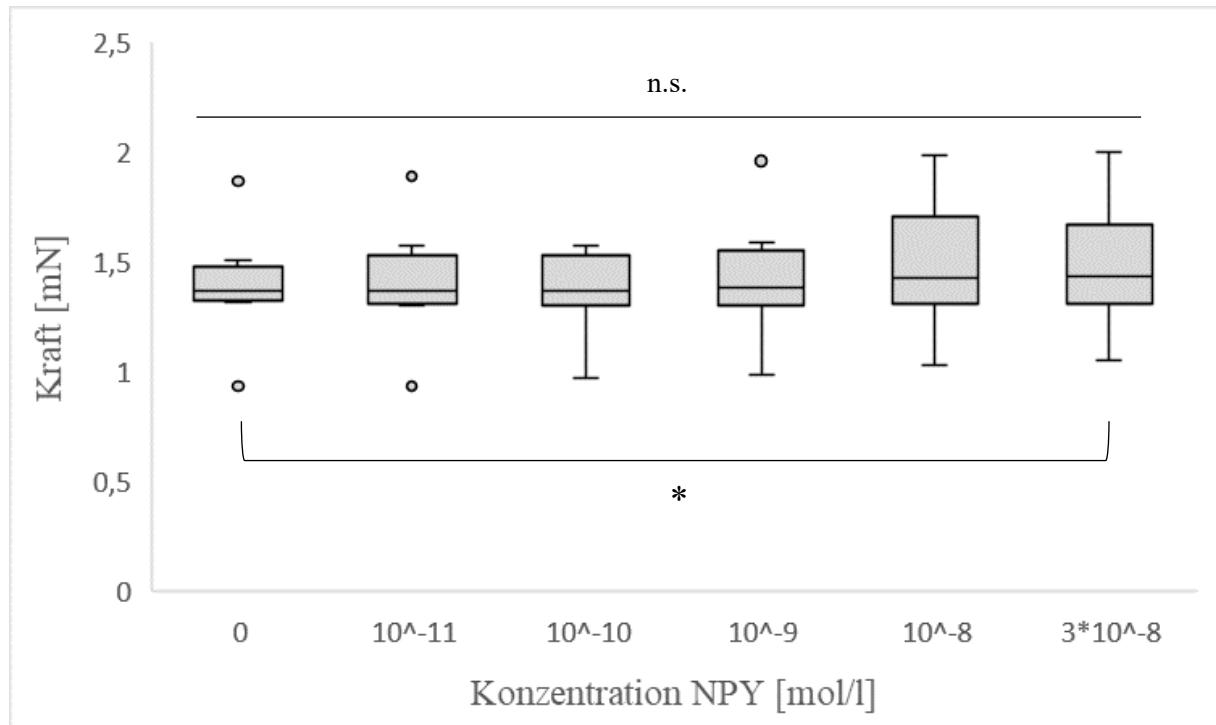


Abbildung 29: Durchschnittlich erreichte Kontraktionsamplitude der *V. femoralis*-Präparate mit verschiedenen NPY-Konzentrationen und des Basaltonus

Der *t*-Test für verbundene Stichproben zwischen Basaltonus und Maximalkonzentration ergab einen signifikanten Unterschied im erreichten Tonus (* $p<0,05$). Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte keine Signifikanz. $n=7$

Es wurde wie bei den Präparaten der *V. cava* unter Betrachtung der Höchstkonzentration NPY $3 \cdot 10^{-8}$ mol/l im Vergleich zum Basaltonus ein *t*-Test für verbundene Stichproben durchgeführt, der einen signifikanten Unterschied mit einem Signifikanzniveau von * $p<0,05$ zeigt. Die Varianzanalyse zeigt keine Signifikanz.

Zur Untersuchung der in der Literatur beschriebenen synergistischen Wirkung von NPY im Zusammenspiel mit NA (siehe 1.1.3) wurden Experimente durchgeführt, in denen die kontraktile Wirkung von reiner NA-Gabe der NA-Anwendung nach NPY-Applikation gegenübergestellt wird. Dazu wurde die standardmäßig in jedem Protokoll durchgeführte treppenförmige NA-Kontraktion mit den Konzentrationen 10^{-7} mol/l bis 10^{-4} mol/l mit einer gleichartig nach den NPY-Versuchen durchgeführten NA-Kontraktion verglichen. Das NPY war kumulativ in den oben aufgeführten Konzentrationen nach Auswaschen der ersten NA-Kontraktion gegeben worden und wurde für die zweite NA-Kontraktion in der Lösung belassen.

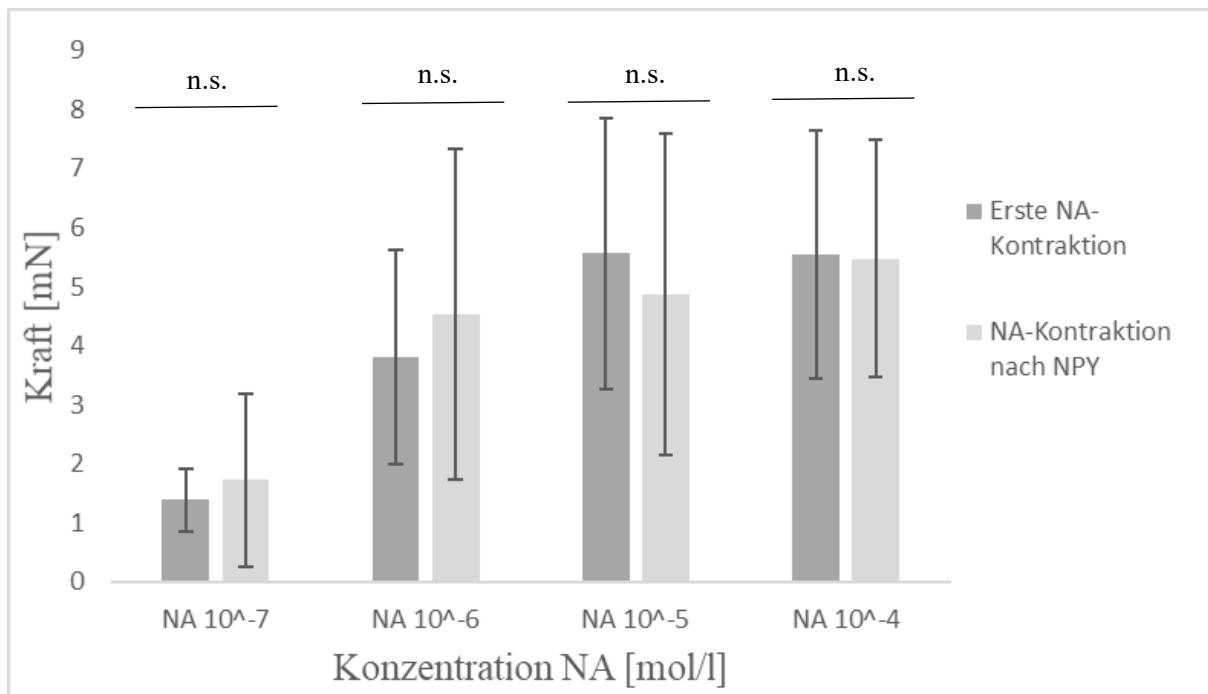


Abbildung 30: NA-Kontraktionen mit und ohne Anwesenheit von NPY an der V. cava

Im Wilcoxon-Test zeigen sich bei keiner der Konzentrationsstufen signifikante Unterschiede. $n=10$

Bei den Experimenten mit V. cava-Präparaten (siehe Abbildung 31) zeigt sich bei der ersten NA-Kontraktion mit der Konzentration NA 10^{-7} mol/l eine Kraftentwicklung von 1,4 mN (SD $\pm 0,5$ mN), bei der Konzentration NA 10^{-6} mol/l 3,8 mN (SD $\pm 1,8$ mN), bei der Konzentration NA 10^{-5} mol/l 5,6 mN (SD $\pm 2,3$ mN) und bei der Konzentration NA 10^{-4} mol/l 5,6 mN (SD $\pm 2,1$ mN). Die NA-Kontraktion unter Anwesenheit von NPY zeigt bei der ersten NA-Kontraktion mit der Konzentration NA 10^{-7} mol/l eine Kraftentwicklung von 1,7mN (SD $\pm 1,5$ mN), bei der Konzentration NA 10^{-6} mol/l 4,5 mN (SD $\pm 2,8$ mN), bei der Konzentration NA 10^{-5} mol/l 4,9 mN (SD $\pm 2,7$ mN) und bei der Konzentration NA 10^{-4} mol/l 5,5 mN (SD ± 2 mN).

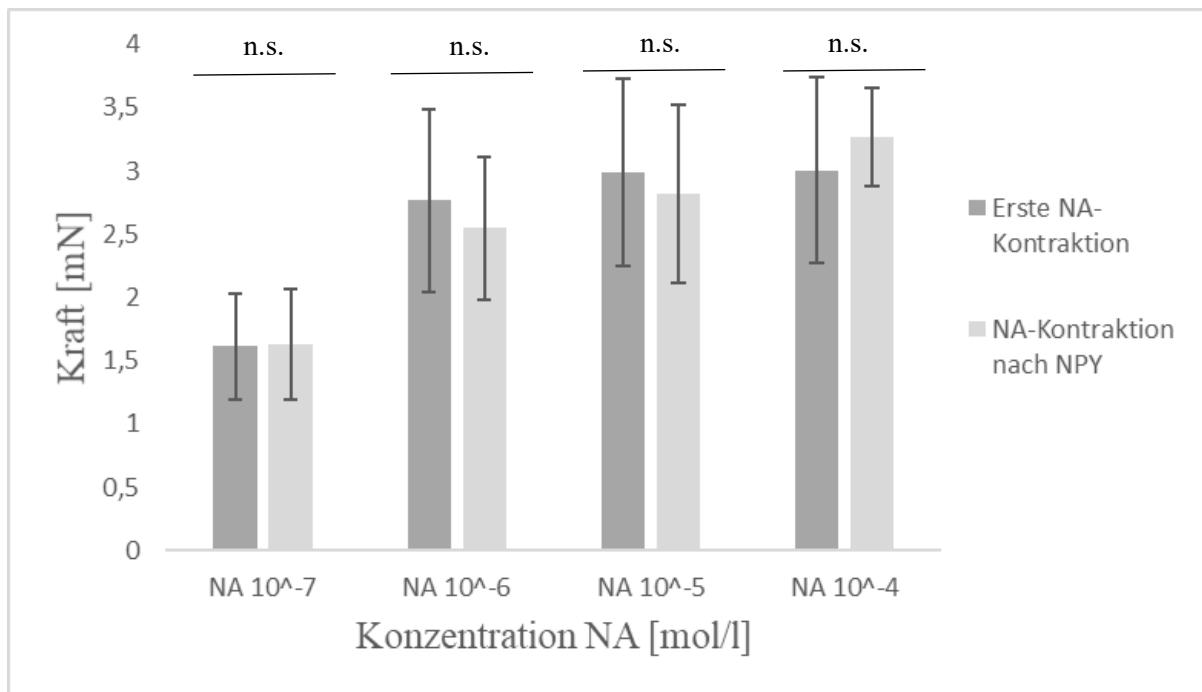


Abbildung 31: NA-Kontraktionen mit und ohne Anwesenheit von NPY an der V. femoralis

Im Wilcoxon-Test zeigen sich bei keiner der Konzentrationsstufen signifikante Unterschiede. $n=9$

Bei den Experimenten mit V. femoralis-Präparaten (siehe Abbildung 32) zeigt sich bei der ersten NA-Kontraktion mit der Konzentration NA 10^{-7} mol/l eine Kraftentwicklung von 1,6 mN (SD $\pm 0,4$ mN), bei der Konzentration NA 10^{-6} mol/l 2,8 mN (SD $\pm 0,7$ mN), bei der Konzentration NA 10^{-5} mol/l 3 mN (SD $\pm 0,7$ mN) und bei der Konzentration NA 10^{-4} mol/l 3 mN (SD $\pm 0,7$ mN). Die NA-Kontraktion unter Anwesenheit von NPY zeigt bei der ersten NA-Kontraktion mit der Konzentration NA 10^{-7} mol/l eine Kraftentwicklung von 1,6 mN (SD $\pm 0,4$ mN), bei der Konzentration NA 10^{-6} mol/l 2,5 mN (SD $\pm 0,6$ mN), bei der Konzentration NA 10^{-5} mol/l 2,8 mN (SD $\pm 0,7$ mN) und bei der Konzentration NA 10^{-4} mol/l 3,3 mN (SD $\pm 0,4$ mN).

Bei beiden Gefäßen deuten sich Unterschiede im Kontraktionsverhalten bei NA-Aktivierung mit und ohne NPY an: Die Aktivierungen ohne NPY scheinen früher in Sättigung zu gehen, während bei Anwesenheit von NPY bis zu NA-Höchstkonzentration eine Steigerung zu beobachten ist. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Gruppeneffekte.

3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie schloss sich den Versuchen im Organbad an, um die strukturellen Voraussetzungen für die aufgestellten und untersuchten Thesen genauer zu betrachten. Mit Hilfe von primären Antikörpern gegen die ATP-spezifischen P2X1 und P2X2-Rezeptoren, sowie gegen NPY wurde das Vorhandensein, die Dichte und die Lage dieser Strukturen sichtbar gemacht.

3.4.1 P2X1-Rezeptor

Der ATP-spezifische P2X1-Rezeptor ist der dominierende Rezeptor hinsichtlich der konstriktiv wirkenden purinergen Transmission durch ATP am glatten Gefäßmuskel (siehe 1.1.2). Zur Darstellung wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz in Kryoschnitten gewählt. Aufgrund der guten Datenlage wurde bei der Untersuchung des P2X1-Rezeptors auf eine Positivkontrolle verzichtet. In den Kontrollfärbungen ohne Applikation des primären Antikörpers (Negativkontrollen) zeigen sich weder Antikörperbindungen noch unspezifische Fluoreszenzen.

3.4.1.1 Ergebnisse an *V. cava* und *V. femoralis*

Es wurden von beiden Gefäßen sowohl längs aufgeschnittene und aufgespannte als auch Kryo-Schnittpräparate angefertigt und angefärbt. Daraufhin wurden Aufnahmen mit Lichtmikroskopie und verschiedenen Fluoreszenz-Kanälen angefertigt. Gezeigt ist eine Auswahl.

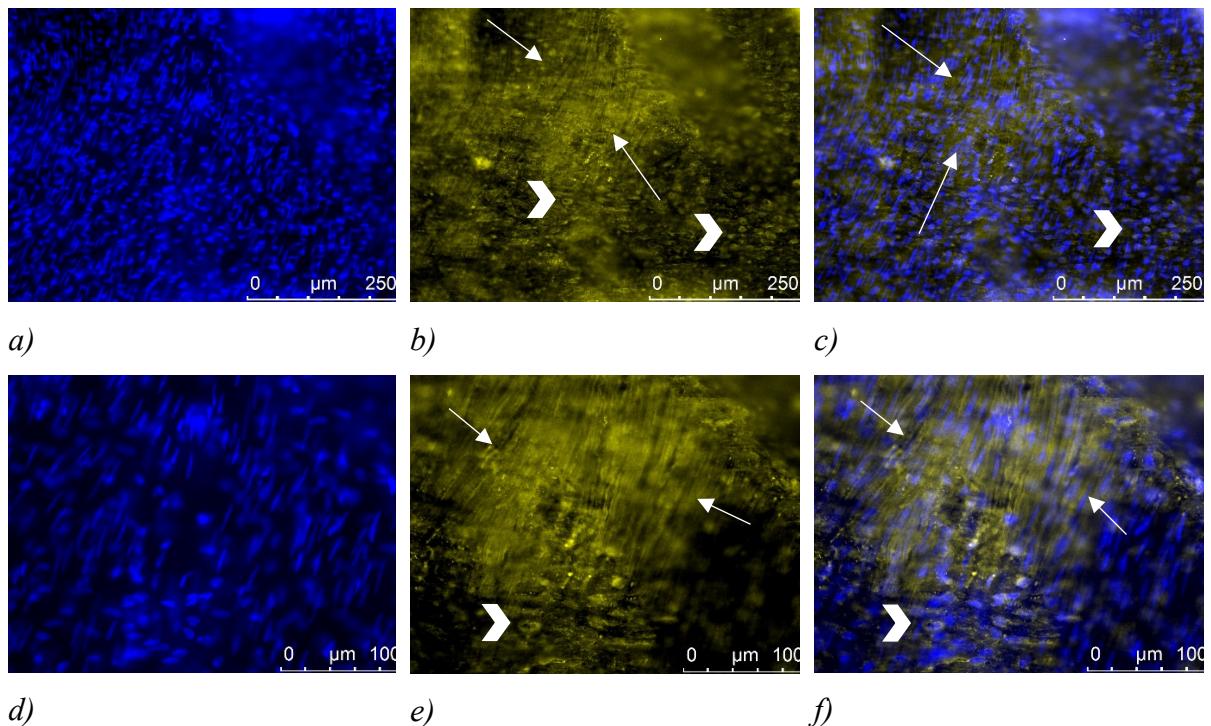


Abbildung 32: Immunfluoreszenzmikroskopie von Whole Mount-Präparaten der V. cava mit Anti-P2X1-Antikörper

Gefrierschnitte,

a) - c) Pfeile: Streifige Struktur des fluoreszenzmarkierten glattmuskulären Gewebes, Pfeilspitzen: Auch die mit angeschnittenen Endothelzellen zeigen eine Fluoreszenz, Dicke 20µm, 200fach vergrößert, a) DAPI-kanal, b) Cy3-Kanal, c) Overlay

d) – f) Pfeile: Streifige Struktur des fluoreszenzmarkierten glattmuskulären Gewebes Pfeilspitzen: Auch die mit angeschnittenen Endothelzellen zeigen eine Fluoreszenz, Dicke 20µm, 400fach vergrößert, d) DAPI-kanal, e) Cy3-Kanal, f) Overlay

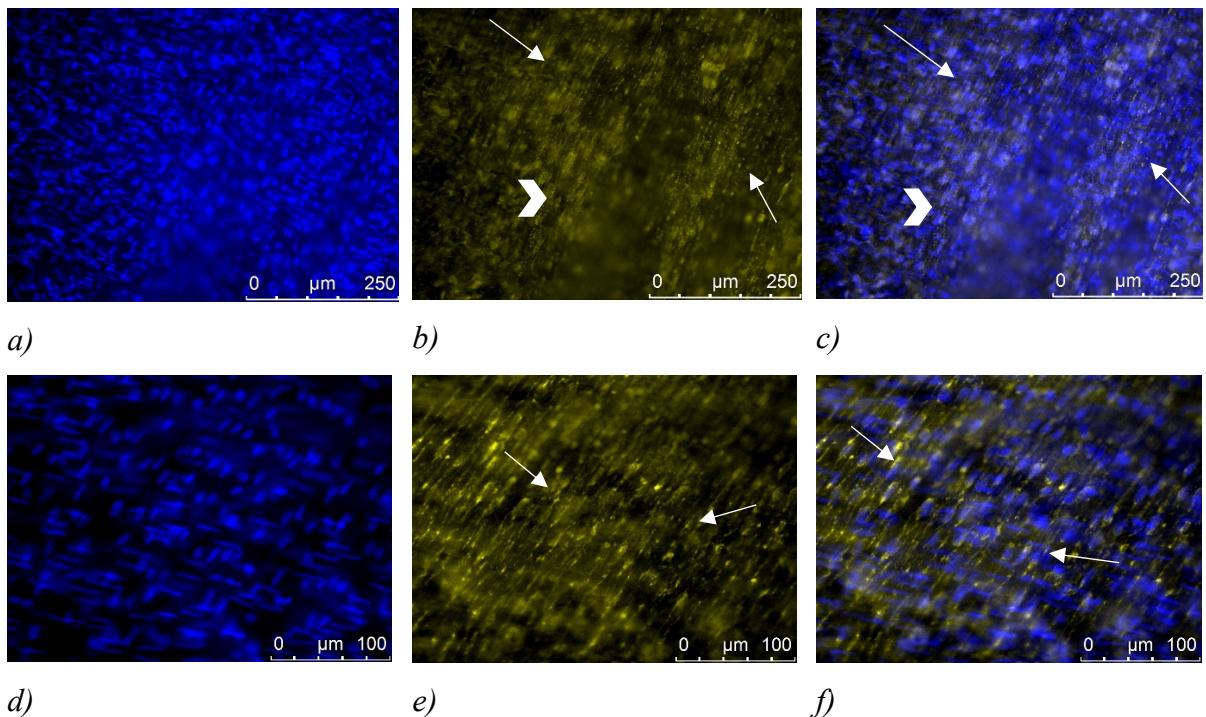


Abbildung 33: Immunfluoreszenzmikroskopie von Whole Mount-Präparaten der V. femoralis mit Anti-P2X1-Antikörper

Gefrierschnitte,

a) - c) Pfeile: Streifige Struktur des fluoreszenzmarkierten glattmuskulären Gewebes, Pfeilspitzen: Auch die mit angeschnittenen Endothelzellen zeigen eine Fluoreszenz, Dicke 20 μ m, 200fach vergrößert, a) DAPI-kanal, b) Cy3-Kanal, c) Overlay

d) – f) Pfeile: Streifige Struktur des fluoreszenzmarkierten glattmuskulären Gewebes, Dicke 20 μ m, 400fach vergrößert, d) DAPI-kanal, e) Cy3-Kanal, f) Overlay

An beiden untersuchten Gefäßen zeigt sich bei Anfärbung mit P2X1-spezifischem Antikörper eine Anreicherung in den Wandstrukturen der Venen (siehe Abbildungen 33 und 34).

Deutlich lässt sich die streifige Anordnung mit länglichen Zellkernen im Bereich der Media abgrenzen. Somit kann morphologisch das Vorhandensein der zuvor funktionell untersuchten Rezeptoren dargestellt werden.

Zusätzlich zeigte sich jedoch an beiden untersuchten Gefäßen auch perizellulär an Endothelzellen im Intima-Bereich eine deutliche Fluoreszenzmarkierung.

3.4.2 P2X2-Rezeptor

Der ATP-spezifische P2X2-Rezeptor kommt in geringerer Dichte am glatten Gefäßmuskel vor (siehe 1.1.2). Zur Darstellung wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz in Kryoschnitten gewählt.

3.4.2.1 Positivkontrolle am Mesenterialgefäßpräparat

Der P2X2-Rezeptor kommt an Mesenterialgefäß vor (Phillips et al. 1998; Hansen et al. 1999). Zum sicheren Nachweis einer Bindung der Antikörper an die Zielstruktur wurde folglich eine Positivkontrolle mittels Färbung und Mikroskopie von Mesenterialgefäßen durchgeführt. Diese wurde zum Ausschluss von unspezifischen Bindungen mit einer Negativkontrolle komplettiert.

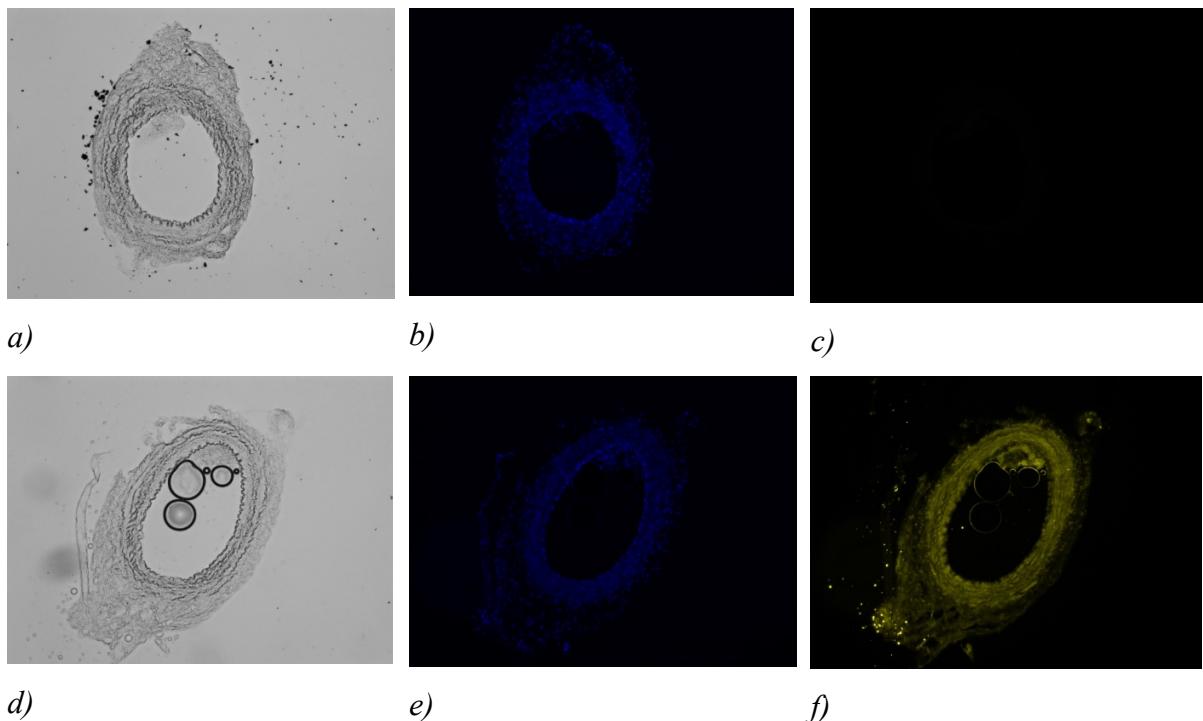


Abbildung 34: Immunfluoreszenzmikroskopie eines Mesenterialgefäßes ohne und mit Anti-P2X2-Antikörper

Gefrierschnitte,

a) - c): Kontrollfärbung ohne Applikation des primären Antikörpers, Dicke 20 μ m, 100fach vergrößert, a) lichtmikroskopische Aufnahme, b) DAPI-Kanal, c) Cy3-Kanal

d) - f) indirekte Immunfluoreszenzfärbung, Dicke 20 μ m, 100fach vergrößert, d) lichtmikroskopische Aufnahme, e) DAPI-Kanal, f) Cy3-Kanal

Es zeigt sich eine weitgehend gleichmäßige Anreicherung des fluoreszenzmarkierten Antikörpers in der Gefäßwand des Mesenterialarterienpräparats. In der Kontrollfärbung zeigt sich keine unspezifische Fluoreszenz (Abbildung 35).

3.4.2.2 Negativkontrolle

Zum Nachweis der spezifischen Bindung des Antikörpers und der suffizienten Blockade unspezifischer Strukturen durch die Applikation des entsprechenden Serums wurde eine Negativkontrolle durchgeführt. Es wurde kein primärer Antikörper appliziert, alle anderen Schritte des Protokolls wurden identisch zum Färbevorgang durchgeführt. Durch das Fehlen des primären Antikörpers besteht keine Bindungsstruktur für den sekundären Antikörper, welcher somit in der Fluoreszenz nicht sichtbar gemacht werden kann.

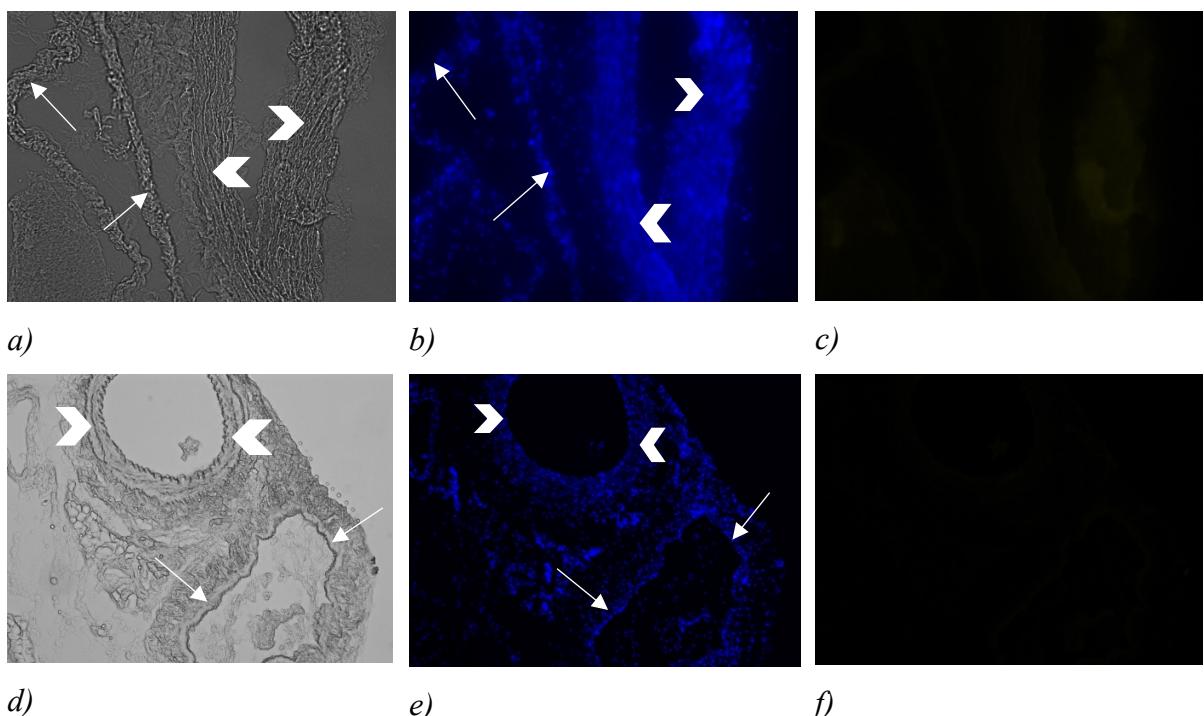


Abbildung 35: Immunfluoreszenzmikroskopie einer Kontrollfärbung ohne Applikation des primären Antikörpers von V. cava und Aorta bzw. A. und V. femoralis

Gefrierschnitte,

a) - c) Pfeilspitzen: Die durch den Schneidevorgang kollabierte Aorta mit kräftiger, faserreicher Wandstruktur, Pfeile: die kompakte, dünne Wand der kollabierten V. cava, Dicke 20µm, 200fach vergrößert, a) lichtmikroskopische Aufnahme, b) DAPI-Kanal, c) Cy3-Kanal

d) – f) Pfeilspitzen: Angeschnitten die Arterie mit kräftiger Wandstruktur und rundem Lumen, Pfeile: Die kompakte, dünne Wand der Vene mit ovalem Lumen, Dicke 20µm, 100fach vergrößert, d) lichtmikroskopische Aufnahme, e) DAPI-Kanal, f) Cy3-Kanal

In den Kontrollfärbungen ohne Applikation des primären Antikörpers zeigen sich keine unspezifischen Fluoreszenzen (Abbildung 36).

3.4.2.3 Ergebnisse an *V. cava* und *V. femoralis*

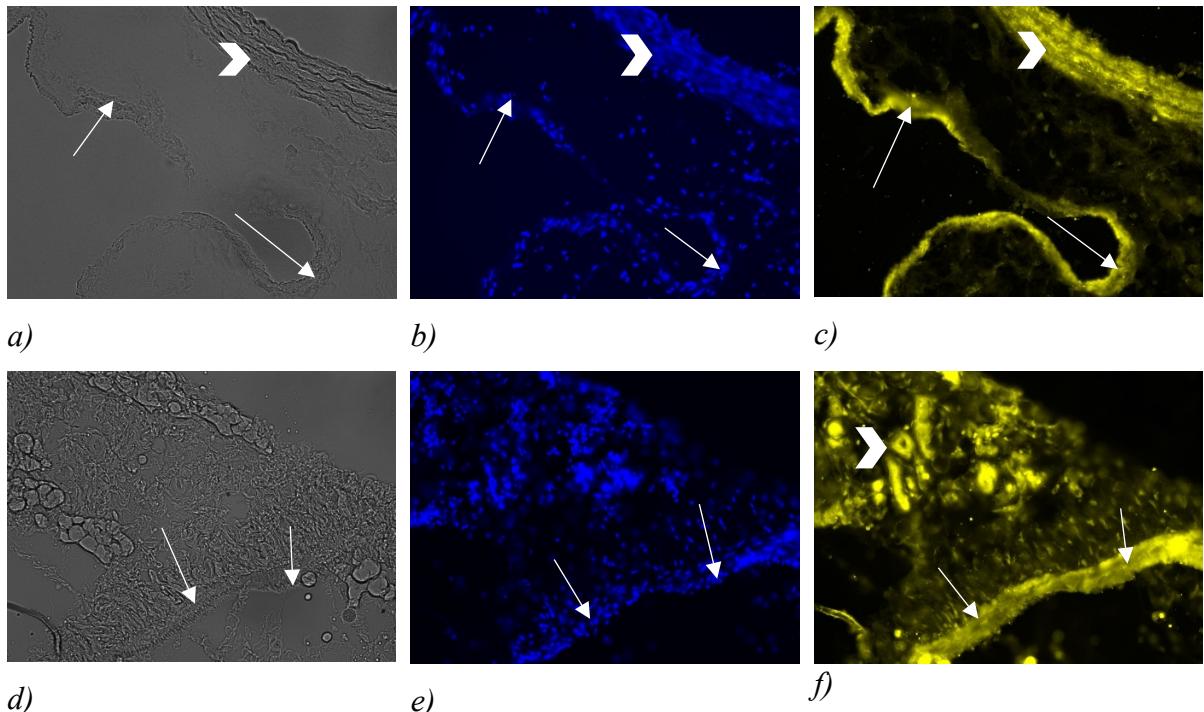


Abbildung 36: Immunfluoreszenzmikroskopie mit Anti-P2X2-Antikörper von *V. cava* und *Aorta* bzw. *V. femoralis*

Gefrierschnitte,

a) - c) Pfeilspitze: Aorta mit kräftiger Wandstruktur, Pfeile: Die kompakte, dünne Wand der *V. cava*, Dicke 20 μ m, 200fach vergrößert, a) lichtmikroskopische Aufnahme, b) DAPI-Kanal, c) Cy3-Kanal

d) – f) Pfeile: Die Wand der *V. femoralis*, Pfeilspitze: ebenfalls fluoreszierende Anschnitte kleinerer Gefäße, Dicke 20 μ m, 200fach vergrößert, d) lichtmikroskopische Aufnahme, e) DAPI-Kanal, f) Cy3-Kanal

An beiden untersuchten Gefäßen zeigt sich bei Anfärbung mit P2X2-spezifischem Antikörper eine gleichmäßige Anreicherung in den Wandstrukturen der Venen. Im Vergleich zu den lichtmikroskopischen Aufnahmen wird deutlich, dass alle drei Wandschichten fluoreszenzmarkiert darstellbar sind (Abbildung 37). Somit kann morphologisch das Vorhandensein der zuvor funktionell untersuchten Rezeptoren dargestellt werden. In den Aufnahmen der *V. femoralis* erscheint die Anreicherung des Antikörpers im äußeren Drittel der Gefäßwand kräftiger.

3.4.3 Neuropeptid Y (NPY)

Das im Gewebe vermutete NPY wurde mit spezifischen Antikörpern (siehe 2.2.1) angefärbt. Zur Darstellung wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz in Kryoschnitten gewählt.

3.4.3.1 Positivkontrolle am Hippocampuspräparat

NPY kommt im Hippocampus vor (St-Pierre et al. 1998). Zum sicheren Nachweis einer Bindung der Antikörper an die Zielstruktur wurde folglich eine Positivkontrolle mittels Färbung und Mikroskopie von Hippocampusschnitten durchgeführt. Diese wurde zum Ausschluss von unspezifischen Bindungen mit einer Negativkontrolle komplettiert.

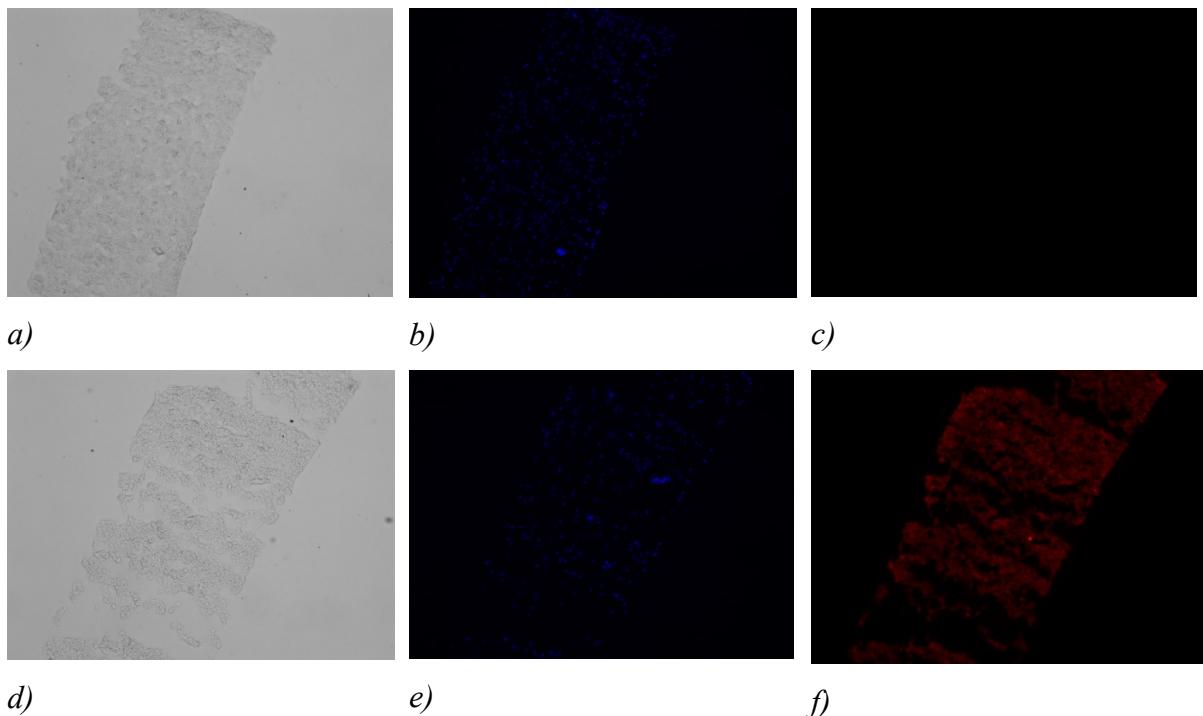


Abbildung 37: Immunfluoreszenzmikroskopie des Hippocampus ohne und mit Anti-NPY-Antikörper

Gefrierschnitte,

a) – c) Kontrollfärbung ohne Applikation des primären Antikörpers, Dicke 20 μ m, 100fach vergrößert, a) lichtmikroskopische Aufnahme, b) DAPI-Kanal, c) Cy5-Kanal

d) – f) Indirekte Immunfluoreszenzfärbung, Dicke 20 μ m, 100fach vergrößert, a) lichtmikroskopische Aufnahme, b) DAPI-Kanal, c) Cy5-Kanal

Es zeigt sich eine zarte, weitgehend gleichmäßige Anreicherung des fluoreszenzmarkierten Antikörpers im Hippocampus-Schnitt. In der Kontrollfärbung ohne Applikation des primären Antikörpers zeigt sich keine unspezifische Fluoreszenz (Abbildung 38).

3.4.3.2 Negativkontrolle

Zum Nachweis der spezifischen Bindung des Antikörpers und der suffizienten Blockade unspezifischer Strukturen durch die Applikation des entsprechenden Serums wurde eine Negativkontrolle durchgeführt. Es wurde kein primärer Antikörper appliziert, alle anderen Schritte des Protokolls wurden identisch zum Färbevorgang durchgeführt. Durch das Fehlen des primären Antikörpers besteht keine Bindungsstruktur für den sekundären Antikörper, welcher somit in der Fluoreszenz nicht sichtbar gemacht werden kann.

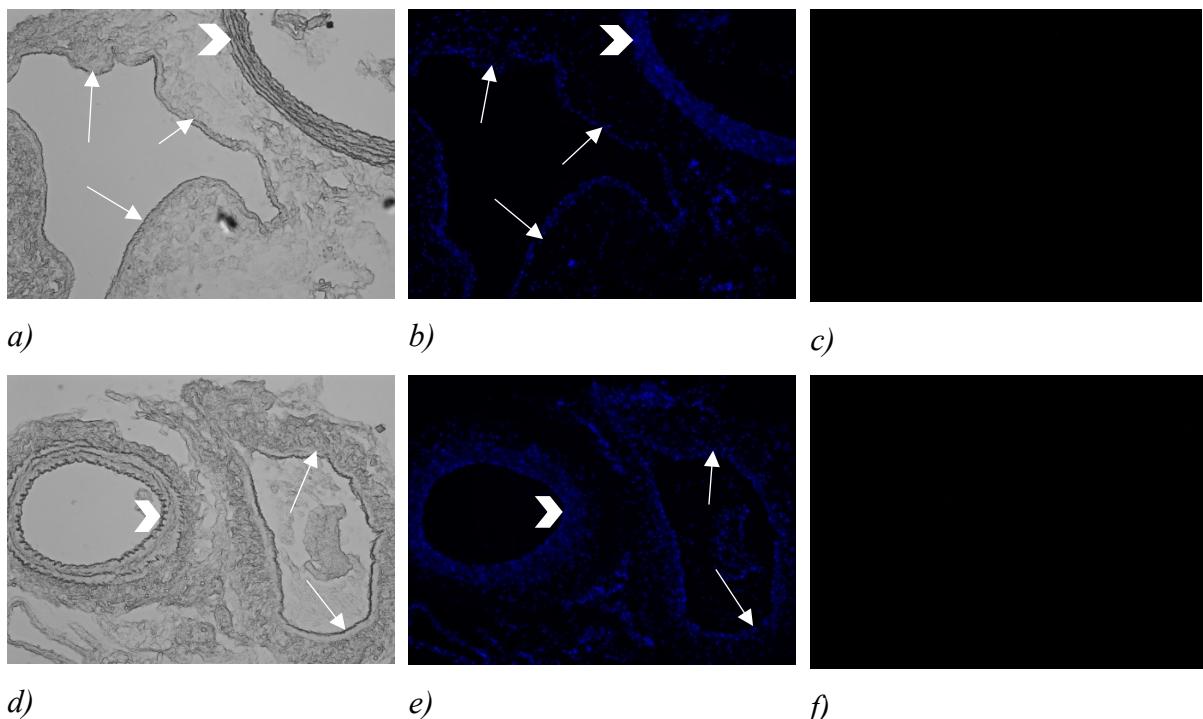


Abbildung 38: Immunfluoreszenzmikroskopie einer Kontrollfärbung ohne Applikation des primären Antikörpers von V. cava und Aorta bzw. A. und V. femoralis

Gefrierschnitte,

a) - c) Pfeilspitze: Die angeschnittene Aorta mit kräftiger, faserreicher Wandstruktur, Pfeile: die kompakte, dünne Wand der kollabierten V. cava, Dicke 20µm, 100fach vergrößert, a) lichtmikroskopische Aufnahme, b) DAPI-Kanal, c) Cy5-Kanal

d) – f) Pfeilspitze: Arterie mit kräftiger Wandstruktur und rundem Lumen, Pfeile: Die kompakte, dünne Wand der V. femoralis mit ovalem Lumen, Dicke 20µm, 100fach vergrößert, d) lichtmikroskopische Aufnahme, e) DAPI-Kanal, f) Cy5-Kanal

In den Kontrollfärbungen ohne Applikation des primären Antikörpers zeigen sich keine unspezifischen Fluoreszenzen (Abbildung 39).

3.4.3.3 Ergebnisse an *V. cava* und *V. femoralis*

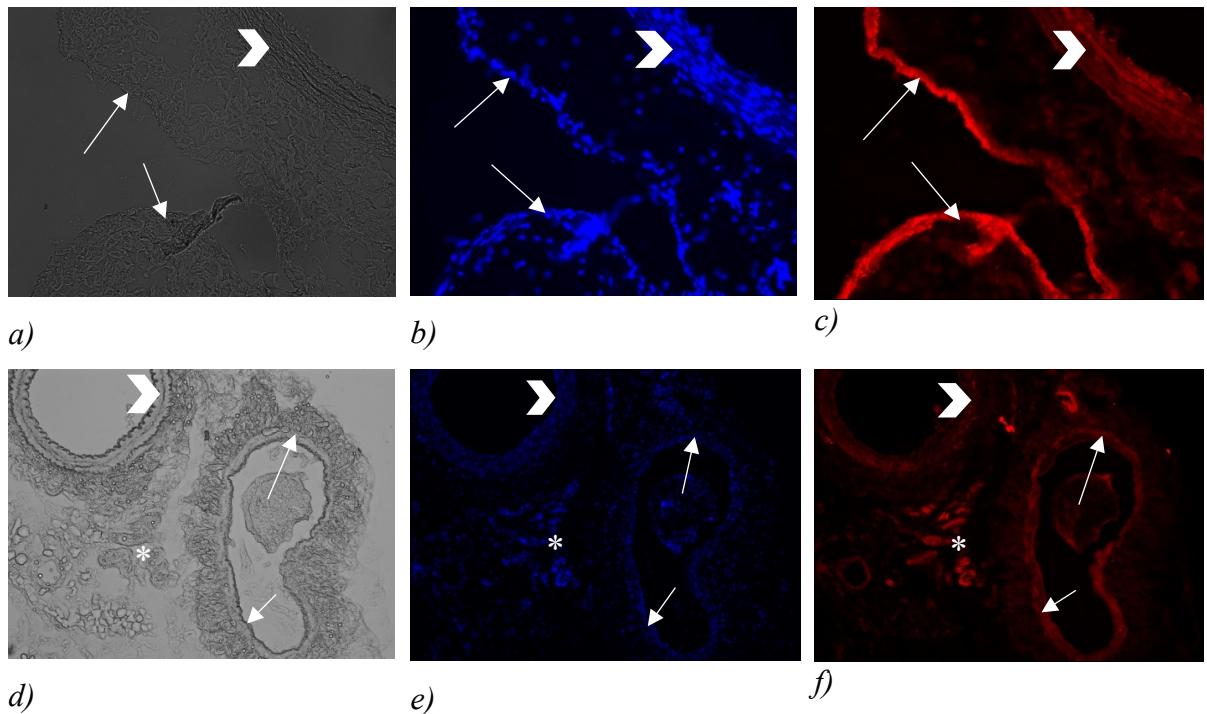


Abbildung 39: Immunfluoreszenzmikroskopie mit Anti-NPY-Antikörper von *V. cava* und *Aorta* bzw. *A.* und *V. femoralis*

Gefrierschnitte,

a) - c) Pfeilspitze: Die angeschnittene Aorta mit kräftiger, faserreicher Wandstruktur, Pfeile: die kompakte, dünne Wand der kollabierten *V. cava*, Dicke 20 μ m, 200fach vergrößert, a) lichtmikroskopische Aufnahme, b) DAPI-Kanal, c) Cy5-Kanal

d) - f) Pfeilspitze: Angeschnittene Arterie mit kräftiger Wandstruktur und rundem Lumen, Pfeile: Die kompakte, dünne Wand der *V. femoralis* mit ovalem Lumen, Sternchen: Fluoreszierende Anschnitte kleinerer Gefäße, Dicke 20 μ m, 100fach vergrößert, d) lichtmikroskopische Aufnahme, e) DAPI-Kanal, f) Cy5-Kanal

An beiden untersuchten Gefäßen zeigt sich bei Anfärbung mit NPY-spezifischem Antikörper eine ungleichmäßige Anreicherung in den Wandstrukturen der Venen. Im Vergleich zu den lichtmikroskopischen Aufnahmen wird deutlich, dass vor allem die Adventitia fluoreszenzmarkiert darstellbar ist und sich dort eine unregelmäßige Verteilung zeigt (Abbildung 40). Somit kann morphologisch das natürliche Vorkommen und Vorhandensein der zuvor funktionell untersuchten Substanz dargestellt werden.

4 Diskussion

4.1 Methodendiskussion

4.1.1 Organbad

Zur Darstellung und Untersuchung eines vollständigen Organs ist das Organbad eine geeignete Methode, weil es nah an die Bedingungen *in vivo* anknüpft. Jedoch bedeutet die Untersuchung eines vollständigen Organs auch, dass jeder darin vorhandene Gewebetyp seinen physiologischen Einfluss auf das Geschehen ausübt. Im Falle der Untersuchung der Kraftentwicklung von Gefäßen ist als wichtiger Einflussfaktor das Gefäßendothel zu berücksichtigen. Die Bewertung und Interpretation der erhobenen Daten zum neurogenen Tonus der Gefäßmuskulatur ist demnach unter der Prämisse zu betrachten, dass insbesondere die in der Einführung (siehe 1.2) beschriebenen relaxierenden, also vasodilatativen Effekte und Funktionen des Endothels parallel zu den in dieser Arbeit in den Fokus gestellten Prozessen von statthen gehen und das Resultat aller stattfindenden Prozesse schließlich die gezeigten Messergebnisse sind. Wenngleich eine Einflussnahme des Endothels sehr wahrscheinlich ist, so fand diese aufgrund des bei allen untersuchten Präparaten intakt belassenen Endothels in allen Experimenten im gleichen Maße statt. Somit ist sie zwar zu bedenken und zu berücksichtigen, lässt aber dennoch eine Interpretation der Daten hinsichtlich des Zusammenspiels zwischen autonomem Nervengeflecht und glatter Gefäßmuskulatur zu.

Auch hier könnte jedoch eine Quelle für die in den meisten Experimenten festgestellten großen Streuungen sein: Zwar wurde das Endothel prinzipiell belassen, jedoch ist nicht auszuschließen, dass es im Rahmen des Einfädelns der kleinen Drahthaken (siehe 2.1.1) zu kleinen Traumata im Endothel kam und die folgenden Experimente aufgrund des verminderten relaxierenden Einflusses der Endothelfunktion eine ausgeprägtere Kraftentwicklung gezeigt haben könnten (Vanhoutte und Scott-Burden 1994). Da sich diese aber auch in allen Modi der Gefäßkontraktion zeigen würde, hätte sie auf die Vergleichbarkeit der einzelnen Aktivierungen keinen verfälschenden Einfluss. Auf Endothelfunktionstestungen wurde verzichtet, um eine möglichst geringe Zahl von Spülstufen im Messprotokoll zu haben, da diese die für die Durchführung der EFS benötigte Stabilität des Präparats im Organbad beeinträchtigen.

4.1.2 Elektrische Feldstimulation (EFS)

Die EFS wurde in dieser Studie als Aktivierungsmodalität zur Induktion endogener Transmitterausschüttung angewendet. Dieses Vorgehen ermöglicht einen Vergleich zwischen

quasi-physiologischer endogener Aktivierung der glatten Gefäßmuskulatur und Aktivierung durch exogen applizierte einzelne Transmitter.

Die Anwendung der Methode birgt jedoch auch Schwierigkeiten. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, ist eine genaue Einstellung des Abstands zwischen Präparat und Stimulationselektroden zwingend erforderlich: Ein zu großer Abstand führt zu einer unzureichenden Aktivierung und fehlenden Kontraktionen, eine zu dichte Positionierung hingegen führt aufgrund des entstehenden Kontakts zwischen Elektrode und Muskelgewebe zu myogenen Kontraktionen, die im TTX-Test (siehe 2.1.4.1) nicht unterdrückbar und somit für Transmissionsexperimente nicht verwendbar sind. Potentiell verfälschende Faktoren bei der Positionierung sind die Einstellung der Vorspannung, die Tendenz der Drahthaken sich schwer kontrollierbar zu drehen und die Bewegung der das Präparat umgebenden Flüssigkeit, die durch das Durchperlen mit Carbogengas entsteht. Hinzu kommt die einseitig positionierte Stimulation (siehe 2.1.4), die durch das entstehende elektrische Feld zwar die ganze Zirkumferenz der untersuchten Ringpräparate erreichen konnte, dafür jedoch abermals eine hohe Genauigkeit in der Positionierung des Präparats erforderte.

Aufgrund der multiplen Einflüsse auf die Position des Präparats entstanden auch bei exakter Einstellung Unregelmäßigkeiten, die die zuverlässige Reproduzierbarkeit der Experimente beeinträchtigten und sich in entsprechend großen Streuungen in den Messergebnissen zeigen. Das Erzielen signifikanter Daten wurde dadurch erschwert. Dies gilt aufgrund des kleinen Gefäßkalibers insbesondere für Experimente mit V. femoralis-Präparaten.

4.1.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Methode der Fluoreszenzmikroskopie eignet sich durch die Anwendung spezifischer Antikörper zur Darstellung histologischer Strukturen, deren Vorhandensein Grundlage für untersuchte Funktionen ist. Sie wurde in dieser Studie zum Nachweis der zuvor funktionell untersuchten P2X1- und P2X2-Rezeptoren angewendet. Der korrespondierende Transmitter ATP war als sehr kleines und ferner ubiquitär vorhandenes Molekül für den Nachweis mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nicht geeignet. Im Gegensatz hierzu ist der zweite untersuchte Transmitter, NPY, als Peptidhormon aufgrund seiner Molekülgröße und seiner spezifischen Lokalisation in entsprechenden sympathischen Neuronen einem immunhistologischen Nachweis zugänglich und wurde entsprechend mit der Methode der Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

In dieser Studie wurden die relevanten Strukturen der zwei untersuchten Kotransmissionssysteme sowie Negativ- und Positivkontrollpräparate

fluoreszenzmikroskopisch dargestellt, nicht jedoch der das Kontraktionsgeschehen dominierende $\alpha 1$ -Rezeptor. Es handelt sich folglich nicht um einen quantitativen Vergleich des Rezeptorvorkommens, sondern um einen qualitativen, kontrollierten Nachweis des Vorhandenseins vom P2X1-, P2X2- und NPY im Gewebe als Korrelat der jeweiligen Innervation. Die Verwendung der unterschiedlichen Whole Mount Technik und Kryoschnitten wurde pragmatisch unter der Vorstellung vorgenommen, dass ein qualitativer Nachweis mit beiden Methoden möglich ist, diese jedoch sich ergänzende Einblicke in die gewebsspezifische Lokalisation bieten: Der Kryoschnitt mit einer günstigeren räumlichen Trennung der Zellen bei geringerer Überlagerung, die Whole Mount Technik mit einer stärkeren Betonung der anatomischen *in situ* Architektur durch die Vermeidung von Schnittartefakten.

4.2 Ergebnisdiskussion

4.2.1 Referenzkontraktionen

Die Referenzkontraktionen mit Kalium zeigen bei beiden untersuchten Gefäßen eine signifikant kleinere Kraftentwicklung als die Aktivierung mit NA oder EFS. Die Effektivität der Aktivierung durch Transmitterausschüttung im Vergleich zur Kaliumkontraktur ist an der V. femoralis als noch größer zu bewerten, als an der V. cava.

4.2.2 Der Venentonus

In den Experimenten zum Kraftvergleich (siehe 3.1.1) wird insgesamt deutlich, dass die Kontraktionsantwort bei den beiden Aktivierungsmechanismen erhebliche Unterschiede aufweist. Die trotz erhöhter Schwankungsbreite deutliche Tendenz zur größeren Kraftentwicklung bei der Aktivierung durch EFS, insbesondere bei der V. femoralis, lässt sich nicht allein durch die Aktivität von endogen ausgeschüttetem NA erklären. Es ist davon auszugehen, dass durch die EFS weitere Transmitter ausgeschüttet werden. Hinzu kommt, dass die technischen Voraussetzungen der beiden gegenübergestellten Effekte Differenzen aufweisen: Die mit NA durchgeführten Experimente sind durch die Applikation in die das Präparat umgebende Lösung und die Diffusion ins Gewebe sehr gut reproduzierbar und es ist anzunehmen, dass dieser Vorgang sich zwischen den Experimenten nicht unterscheidet. Die EFS jedoch erfordert eine genaue räumliche Einstellung des Präparats zu den Elektroden und ist somit auch durch die Bewegung, in die das Präparat durch die Begasung der umgebenden Lösung automatisch kommt, anfälliger für eventuell methodisch bedingte Schwankungen im erreichten Kraftniveau (siehe 4.1.1). Möglicherweise verhindern diese Schwankungen ein noch deutlicheres Ergebnis bei der V. cava. In der Zusammenschau erscheinen komplexere Vorgänge

bei der endogenen Aktivierung des glatten Gefäßmuskels an der V. cava möglich, an der V. femoralis wahrscheinlich.

Die Daten zur Kraftentwicklung im Zeitverlauf (siehe 3.2.2) zeigen eine frequenzunabhängig gleiche Dauer bis zum Peak bei den EFS-induzierten Kontraktionen am glatten Muskel der untersuchten Venen während die NA-induzierten Kontraktionen konzentrationsabhängige Unterschiede in der Dauer bis zur maximal erreichten Kraft zeigen. Diese Unterschiede lassen komplexere Vorgänge in den Steuerungsmechanismen vermuten, die zu einer vom Zeitablauf stabileren Kontraktion des glatten Gefäßmuskels bei endogener Aktivierung führen. Dies gilt in dieser Untersuchung nicht nur für die V. femoralis, die bereits in Kapitel 3.2.1 durch die signifikant größere Kraftentwicklung bei kontinuierlicher EFS-Aktivierung auf weitere Mechanismen abgesehen von NA hindeutete, sondern auch für die V. cava, die in der Messung zum Zeitverlauf ebenso deutliche Signifikanzen in den Unterschieden zwischen EFS- und NA-Aktivierung zeigte.

Als Grund für die höhere zeitliche Stabilität bei endogener Aktivierung mittels EFS kommt im Rahmen der Vermutung weiterer Aktivierungswege über andere Transmitter als NA eine größere Transmissionskapazität aufgrund des breiteren Spektrums der am Aktivierungsprozess beteiligten Rezeptoren in Frage. Bei reiner NA-Aktivierung hingegen stellt sich bei kumulativer Gabe durch sukzessive mehr besetzte $\alpha 1$ -Rezeptoren nach und nach ein Sättigungseffekt ein, wodurch sich die kontraktile Wirkung später einstellt bzw. bei weiterer NA-Gabe schließlich ausbleiben würde.

Die endogene Aktivierung mittels EFS wurde mit im TTX-Test angewendeten Parametern durchgeführt und ist somit gesichert neurogen. Dass es bei der Veränderung der Frequenz im Rahmen der Untersuchungen zur Kraftentwicklung zu myogenen Aktivierungen der Muskelzellen kommt, ist angesichts der gleichförmigen Kontraktionsantwort und der gleichen Zeitspanne bis zum Peak bei allen getesteten Frequenzen unwahrscheinlich. Im Rahmen der Laborarbeit zu dieser Studie wurden auch orientierende Versuche durchgeführt, in denen gezeigt werden konnte, dass laufende Stimulationen mit dem $\alpha 1$ -Antagonisten Urapidil weitgehend geblockt werden können.

4.2.3 Antagonisten

4.2.3.1 Suramin

Bei den Experimenten mit Gabe von Suramin (siehe 3.3.1.1) lässt sich insgesamt bei jenen Präparaten mit Suramin im Vergleich zu den zeitgleich durchgeföhrten Kontrollexperimenten eine große Streuung zu beobachten. Die Ursache hierfür können die vielfältigen Wirkungen

der Substanz Suramin sein (siehe 2.1.5.8). An der V. cava zeigt sich kein Hinweis auf einen Effekt der Rezeptorblockade. Obschon durch die großen Schwankungsbreiten in der Varianzanalyse bei der V. femoralis ein nur knapp nicht signifikanter Unterschied zu den Daten der Kontrollexperimente besteht, wurde durch den t-Test der einzelnen Datenpaare deutlich, dass sich bei der Konzentration 10^{-6} mol/l Suramin im Vergleich zu der ohne Substanzgabe durchgeführten Referenzkontraktion eine signifikante Reduktion der Kraftentwicklung ergab. Ein Ermüdungseffekt ist hier aus zwei Gründen unwahrscheinlich: Erstens weist die zeitgleich erfasste Kontraktion des Kontrollexperiments zum Zeitpunkt dieser Konzentrationsstufe noch eine kaum verminderte Kraftentwicklung auf. Zweitens folgen auf die Konzentration 10^{-6} mol/l noch die Konzentrationsstufen, 10^{-5} und 10^{-4} mol/l mitsamt zeitgleich stattgefundenen Kontrollexperimenten, die aufgrund der chronologischen Abfolge im Falle von Ermüdungseffekten ebenfalls eine signifikant geringere Kraftentwicklung aufweisen müssten. Dies ist nicht der Fall, vielmehr zeigen sich eine fehlende Signifikanz und insbesondere bei 10^{-4} mol/l eine große Streuung, welche vermutlich auf die auch konzentrationsabhängigen Eigenschaften von Suramin zurückzuführen sind und einen Signifikanznachweis an dieser Stelle verhindern. Mit einer spezifischeren Rezeptorblockade sind vermutlich eindeutigere Ergebnisse erzielbar.

4.2.3.2 BIBP3226

Die Ergebnisse der Experimente mit BIBP3226 an der V. cava zeigen keine Signifikanzen und große Streuungen, was zunächst als Hinweis auf eine untergeordnete Rolle des Transmitters NPY am glatten Muskel der V. cava gewertet wurde. Diese Interpretation ist kongruent zur in der Literatur beschriebenen sehr geringen Dichte von NPY-positiven perivaskulären Nervenfasern an Venen im Vergleich zu Arterien (Ekblad et al. 1984). Zur Bestätigung dieser These wurden die Experimente mit dem Agonisten NPY durchgeführt (siehe 3.3.2.2). Wider Erwarten ließ sich hier jedoch ein geringer kontraktiler Effekt nachweisen. Als Grund für die fehlende Nachweisbarkeit eines Effekts von BIBP3226 kommen methodisch bedingte Schwankungen (siehe 4.1.1 und 4.1.2) in Kombination mit geringer Stichprobengröße in Betracht.

Die Experimente an der V. femoralis zeigen hingegen trotz geringer Stichprobengröße eine signifikante Reduktion des Tonus durch die Rezeptorblockade mit BIBP3226 im Vergleich zur Kontrollmessung. Es ist somit von einem EFS-getriggerten kontraktilen Effekt von NPY auszugehen. Die im Anschluss durchgeführten Agonisten-Experimente zeigen, ähnlich wie

bei der V. cava, einen geringen kontraktilen Effekt. In Zusammenschau ist neben dem eigenständigen Effekt von NPY ein synergistischer Effekt mit NA möglich.

Die Kombination der Ergebnisse an der V. cava widerspricht jedoch der These, dass NPY lediglich als Kotransmitter bei Aktivierung des glatten Gefäßmuskels durch NA einen deutlichen kontraktilen Effekt erzielen kann und als eigenständiger Transmitter kaum eine kontraktile Wirkung zeigt (Wier et al. 2009). Vielmehr bestätigt sich die Beobachtung, dass NPY an der V. femoralis auch ohne NA-Beteiligung eine Kontraktion hervorruft (Ekblad et al. 1984). In dieser Studie konnte dieses Phänomen auch an der V. cava gezeigt werden, die als großes venöses Gefäß laut Ekblad et al. eine noch geringere Dichte an NPY-positiven Nervenfasern besitzt als Venen mittleren Kalibers.

Im Fall einer reinen Wirkung von NPY als Kotransmitter und Verstärker der Wirkung von NA hätten die Ergebnisse bei endogener Aktivierung mit Ausschüttung aller vorhandener Transmitter sich deutlich von denen mit Rezeptorblocker BIBP3226 und damit Blockade der synergistischen Wirkung unterscheiden müssen, die pharmakologische Aktivierung nur mit NPY hätte hingegen keinen Effekt zeigen dürfen. An der V. cava war jedoch das Gegenteil der Fall, trotz von Ekblad et al postulierter geringer Dichte NPY-positiver Nervenfasern an Venen. Die Dichte der Nervenfasern scheint also eine wenig ausschlaggebende Größe zu sein, möglicherweise ist vielmehr die Rezeptordichte ein wichtiges Kriterium. Eine hohe Expressionsdichte des Y1-Rezeptors bei gleichzeitig geringer NPY-positiver Innervation könnte den fehlenden synergistischen Effekt bei endogener Aktivierung bzw. dessen fehlende Unterdrückbarkeit mit BIBP3226 und auch den nachweisbaren Effekt bei exogener NPY-Gabe erklären. Ersteres könnte des Weiteren auf eine fehlende Ausschüttung von NPY bei den genutzten EFS-Protokollen zurückzuführen sein, was angesichts der Ergebnisse mit EFS und Rezeptorblockade mittels BIBP3226 an der V. femoralis aber unwahrscheinlich ist.

4.2.4 Agonisten

4.2.4.1 Adenosintriphosphat (ATP)

Zwischen dem Basaltonus und der höchsten ATP-Konzentration von ATP 10^{-3} mol/l ist eine signifikante Tonussteigerung nachzuweisen, was eine funktionelle Bedeutung des Transmitters ATP an beiden Organen nahelegt.

Zusätzlich lässt sich sagen, dass bei Einzeltestungen zur weiteren Differenzierung bei beiden Venen bereits ab der Konzentration ATP 10^{-6} mol/l ein signifikanter Unterschied zur Messung ohne Substanz besteht und somit ab dieser Konzentration ein kontraktiler Effekt des Transmitters ATP anzunehmen ist. Diese Vorgehensweise der wiederholten Einzeltestungen ist

für eine Reihentestung mit Vergleichen zwischen mehr als zwei Stichproben jedoch statistisch aufgrund der Akkumulation des Alpha-Fehlers nicht zulässig und kann deshalb nicht auf den gesamten Datensatz angewendet werden, sondern dient hier lediglich als Differenzierungshilfe zur Abschätzung des Erreichens einer pharmakologisch wirksamen Konzentration von ATP.

4.2.4.2 *Neuropeptid Y (NPY)*

Zwischen dem Basaltonus und der höchsten NPY-Konzentration von $3 \cdot 10^{-8}$ mol/l ist eine signifikante Tonussteigerung nachzuweisen, was eine funktionelle Bedeutung des Transmitters NPY an beiden Organen nahelegt. Basierend auf den Ergebnissen von Einzeltestungen ist zu vermuten, dass die Wirksamkeit von NPY an beiden Venen ab einer Konzentration von NPY 10^{-8} mol/l eintritt. Entgegen Wier et al. konnte an beiden der untersuchten Organe also ein eigenständiger konstriktiver Effekt von NPY nachgewiesen werden, wenn auch auf niedrigem Niveau. Zu eventuellen weiteren (geringeren) Effekten im niedrigeren Konzentrationsbereich kann auf Grundlage dieser Experimente keine Aussage getroffen werden. Wie bei der Darstellung der Experimente mit ATP erklärt, dient auch hier das Vorgehen der Einzeltestungen lediglich als Differenzierungshilfe zur Abschätzung des Erreichens einer pharmakologisch wirksamen Konzentration von NPY.

Die von Wier et al. und Ekblad et al. beschriebene synergistische Wirkung auf eine Aktivierung des glatten Muskels durch NA konnte an den untersuchten Organen nicht nachgewiesen werden, es zeigten sich keine Unterschiede zwischen reiner NA-Gabe und NA-Aktivierung bei Anwesenheit von NPY, allerdings lässt sich graphisch beobachten, dass beide untersuchten Venen bei reiner NA-Aktivierung früher in Sättigung zu gehen scheinen. Es besteht die Möglichkeit, dass die offenbar bestehende größere kontraktile Kapazität bei Anwesenheit von NPY auf dessen synergistische Wirkung zurückgeht.

4.2.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die angefertigten Fluoreszenzbilder weisen das Vorhandensein des P2X1- und P2X2-Rezeptors und das Vorkommen von NPY an beiden untersuchten Gefäßen nach. Bei den Aufnahmen mit P2X2-spezifischem Antikörper lässt eine kräftige Anreicherung im äußeren Drittel der Gefäßwand auf eine hohe Rezeptordichte im Übergangsbereich der Adventitia zur Media schließen. Für eine detaillierte Aussage zu eventuellen Unterschieden in der Konzentration des Vorkommens von P2X2-Rezeptoren und NPY in den einzelnen Gefäßwandschichten reicht die hier verwendete Vergrößerung und Auflösung jedoch nicht aus. Bei den Aufnahmen mit spezifischem Anti-P2X1-Antikörper zeigte sich zusätzlich zur erwarteten Fluoreszenzmarkierung im Bereich der Media auch eine Fluoreszenzmarkierung

im Randbereich von Endothelzellen. Das Vorhandensein von P2X1-Rezeptoren im Endothel arterieller Gefäße wurde in der Literatur bereits thematisiert. Es wird eine dilatative Funktion ähnlich der Wirkung von P2Y-Rezeptoren beschrieben (Harrington und Mitchell 2005). Für venöse Gefäße existieren kaum Daten, ein ähnlich dem an arteriellen Gefäßen beschriebener Mechanismus ist anzunehmen.

4.2.6 Unterschiede zwischen V. cava und V. femoralis

Die Ergebnisse von V. cava und V. femoralis zeigen deutliche Unterschiede: Insgesamt ist bei den Experimenten mit der V. femoralis zu beobachten, dass die Rolle von Transmittern jenseits von NA, insbesondere von ATP, eine größere Rolle zu spielen scheint, als bei der V. cava. Dies wird in allen Daten der Organbadexperimente deutlich:

Beim Vergleich der maximal erreichten Kraft besteht bei der V. femoralis eine signifikant größere Kraftentwicklung bei endogener Transmitterausschüttung durch EFS, als bei exogener NA-Gabe, bei der V. cava hingegen ist lediglich ein nicht signifikanter, dezenter graphischer Unterschied zu beobachten.

Bei Gabe des P2X-Rezeptorantagonisten Suramin zeigen die V. femoralis-Experimente ebenfalls zumindest stellenweise signifikante Reduktion der Kraftentwicklung im Vergleich zu den Kontrollexperimenten, während sich bei der V. cava kein Hinweis auf eine Wirkung von Suramin auf die Kraftentwicklung ergibt.

Auch bei den Experimenten mit dem Y1-Rezeptorblocker BIBP3226 zeigt sich nur an der V. femoralis eine signifikante Reduktion des erreichten Tonus, nicht an der V. cava.

Bei Gabe von ATP besteht bei der V. femoralis nicht nur beim Vergleich zwischen Basaltonus und Höchstkonzentration, wie bei der V. cava, ein signifikanter Unterschied in des Tonus, sondern zusätzlich im Friedman-Test eine signifikante Kraftentwicklung im Verlauf der unterschiedlichen Konzentrationen. Da der Wilcoxon-Test hier bereits zwischen Basaltonus und der Minimalkonzentration von 10^{-6} mol/l einen signifikanten Tonusanstieg zeigte, ist der Wirksamkeitseintritt von ATP an der V. femoralis bereits in diesem geringen Konzentrationsbereich zu vermuten.

Lediglich bei Gabe von NPY zeigen beide Organe ähnliche Ergebnisse. Trotz der signifikanten Ergebnisse an der V. femoralis bei Gabe des Y1-Rezeptorantagonisten BIBP3226, die eine Beteiligung von NPY an der neurogenen Kontraktionssteuerung vermuten lassen, war ein kontraktiler Effekt bei NPY-Gabe nicht unbedingt erwartbar, da in der Literatur teilweise der Effekt von NPY als abhängig von NA beschrieben wird (Wier et al.

2009). Jedoch ist ein NA-unabhängiger Effekt bei beiden Organen in geringem Maße nachweisbar, auch bei der V. cava, bei der sich kein Effekt von BIBP3226 zeigt.

Die beobachteten Unterschiede deuten auf verschiedene Eigenschaften der beiden Venen hin, die auf die unterschiedliche embryonale Genese der Gewebe zurückzuführen sein könnte. Auch innerhalb des Verlaufs der V. cava lassen sich Abschnitte unterschiedlicher embryonaler Entstehung beschreiben (Ichikawa et al. 1979). Es ist anzunehmen, dass die dadurch bedingten Unterschiede hinsichtlich Aufbau und Innervation der verschiedenen V. cava-Abschnitte ein Grund für Streuungen in den Ergebnissen sind. Das ebenfalls von Ichikawa et al. an Teilen der V. cava als sehr spärlich beschriebene sympathische Nervengeflecht könnte ein Grund für eine insgesamt geringere Reaktivität des glatten Muskels sein, wobei die geringen Anteile von ATP und NPY an der Kraftentwicklung der Aufzeichnung dann entgehen. Insgesamt und vor allem aufgrund der Ergebnisse zur maximal erreichten Kraft ist zu vermuten, dass die sympathische Innervation zentral in größerem Maße NA-abhängig geschieht, als weiter peripher an der V. femoralis, wo das Nervengeflecht vermutlich zu einem größeren Anteil NPY- und ATP-positiv ist.

4.3 Ausblick

Zur genaueren Betrachtung der Kontraktionseigenschaften von Venen bei neurogener Aktivierung könnten sich als nächster Differenzierungsschritt Experimente mit entferntem Endothel anschließen. Diese würden sich zwar grundlegend von den Bedingungen *in vivo* entfernen, jedoch bestünde durch das Ausschalten der vielfältigen Einflüsse des Endothels ein präziserer Blick auf die Charakteristika des Zusammenspiels zwischen Nervengeflecht und Gefäßmuskel. Hierbei wären deutlichere Ergebnisse zu erwarten, weil die Überlappung oder Auslöschung der kontraktilen Effekte durch die relaxierenden Einflüsse des Endothels ausgeschaltet werden würde. So könnte im Detail festgestellt werden, welche Bedeutung dem relaxierend wirkenden P2Y-Rezeptor am Endothel von Venen zukommt, indem die reine P2X-assoziierte Wirkung bei Versuchen ohne Endothel mit der gemischten Wirkung bei intaktem Endothel verglichen würde. Zur reinen Aktivierung von P2X-Rezeptoren könnte zudem der spezifische Agonist $\alpha\beta\text{meATP}$ zum Einsatz kommen (Kur und Newman 2014; Warland und Burnstock 1987).

Ein weiterer logischer Schritt, um die kontraktile Wirkung der identifizierten Transmitter weiter zu quantifizieren, wäre die Durchführung von Experimenten mit Blockade der NA-Wirkung, also mit $\alpha 1$ -Rezeptorantagonisten wie Prazosin, wie bereits an glattmuskulärem Gewebe anderer Organe getestet (Warland und Burnstock 1987). Auch kombinierte

Rezeptorblockaden und anschließende neurogene Aktivierung könnten weitere Erkenntnisse zur Aktivität und Rolle in der Tonusregulation der einzelnen Transmitter liefern, wie im Rahmen dieser Arbeit beginnend mit dem α 1-Rezeptorantagonisten Urapidil getestet. Im Rahmen von Experimenten mit Rezeptorantagonisten könnten auch spezifischere Substanzen wie zum Beispiel der spezifische P2X-Antagonist NF023 weitere Erkenntnisse liefern (Kur und Newman 2014).

Um deutliche Ergebnisse zu erzielen und die Bedeutung der entstehenden Streuung zu reduzieren, wären Experimente mit größerer Stichprobenzahl geeignet. Diese wurde in dieser Arbeit dadurch geschränkt, dass nur etwa 70 % der Präparate und Experimente die Bedingungen zum Einschluss in die Auswertung erfüllten.

Im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie wäre im nächsten Schritt der Nachweis des Y1-Rezeptors von Interesse.

Zur Differenzierung der einzelnen Gewebetypen (siehe 1.3) und ihrer Charakteristika im Hinblick auf die neurogene Steuerung wäre des Weiteren die Untersuchung anderer Venentypen interessant. Zu nennen sind hier die Splanchnikusvenen, die für ihre sehr große Compliance bekannt sind, daher sehr große Blutvolumina aufnehmen und mobilisieren können (Gelman 2008). Angesichts ihrer Lage und Aufgabe spielen sie eine völlig andere Rolle als V. cava und Extremitätenvenen mit ihrer Funktion der Rückführung des Blutvolumens zum Herzen. Auch die besonders Temperaturgesteuerten Hautvenen (Rusch et al. 1981) und kleinere, periphere, muskelstärkere Venen und ihre Mechanismen der neurogenen Tonuskontrolle sind für ein besseres Verständnis des venösen Blutgefäßsystems interessant. Mit dem Mulvany-Myographen ist das Organbad auch zur Untersuchung isolierter Gefäße kleineren Kalibers als Methode geeignet.

5 Zusammenfassung

Am glatten Muskel verschiedener Gewebe konnten in bisherigen Forschungsergebnissen ATP und NPY als konstriktiv wirkende Transmitter neben NA nachgewiesen und damit ihre Rolle in der neurogen gesteuerten Tonuskontrolle beschrieben werden. Insbesondere der glatte Muskel von Arterien und seine Mechanismen der Tonuskontrolle und somit der Gefäßweiteneinstellung wurde bereits umfassend beforscht.

Zur neurogenen Tonuskontrolle von Venen hingegen finden sich wenige Arbeiten und Daten, obwohl auch hier die Gefäßweiteneinstellung mit ihrer Steuerung des venösen Rückstroms und der Aufrechterhaltung des ZVD einen maßgeblichen Einfluss auf die Stabilität des Kreislaufs hat. In dieser Arbeit konnte bei Experimenten im Organbad festgestellt werden, dass die Kontraktionseigenschaften der V. cava und V. femoralis von Wistar-Ratten bei reiner NA-Aktivierung und bei Aktivierung durch per EFS induzierte endogene Transmission am glatten Gefäßmuskel signifikante Unterschiede in der Kraftentwicklung und Stabilität aufweisen. Die auf dieser Grundlage vermuteten weiteren Transmissionsmechanismen wurden unter Verwendung von Rezeptorantagonisten und -agonisten untersucht, wobei sich sowohl für ATP als auch für NPY eine eigenständige Wirksamkeit als Transmitter nachweisen ließ. Die Ergebnisse an Präparaten der V. femoralis fielen deutlicher aus als bei der V. cava. Diese Ergebnisse sind möglicherweise auf die unterschiedlichen Eigenschaften der Venentypen zurückzuführen und entsprechen den bisherigen Erkenntnissen zu Struktur und Beschaffenheit dieser Organe in der Literatur. Weitere Experimente untersuchten mögliche synergistische Effekte im Zusammenspiel der Transmitter NA und NPY, welche jedoch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnten.

Um neben der funktionellen Ebene auch die morphologischen Grundvoraussetzungen zu beleuchten, wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz das Vorhandensein der untersuchten Rezeptoren, P2X1 und P2X2 sowie von NPY, bildlich nachgewiesen und damit die Plausibilität der Ergebnisse aus den Organbad-Experimenten untermauert. Hierbei zeigte sich neben den erwarteten Ergebnissen im Bereich der Media zusätzlich der Nachweis von P2X1-Rezeptoren im Bereich des Endothels beider untersuchter Gefäße.

6. Literaturverzeichnis

- Birmingham, A. T.; Ernest, K.; Newcombe, J. F. (1969): Antagonism of the response of human isolated arteries to noradrenaline. In: *British journal of pharmacology* 35 (1), S. 127–131. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1969.tb07973.x.
- Blaylock, N. A.; Wilson, V. G. (1995): Pharmacological characterization of noradrenaline-induced contractions of the porcine isolated palmar lateral vein and palmar common digital artery. In: *British journal of pharmacology* 114 (3), S. 694–702. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1995.tb17194.x.
- Bradley, Eamonn; Law, Andrea; Bell, David; Johnson, Christopher D. (2003): Effects of varying impulse number on cotransmitter contributions to sympathetic vasoconstriction in rat tail artery. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 284 (6), H2007-14. DOI: 10.1152/ajpheart.01061.2002.
- Brown, Simon G. A. (2007): The pathophysiology of shock in anaphylaxis. In: *Immunology and allergy clinics of North America* 27 (2), 165-75, v. DOI: 10.1016/j.iac.2007.03.003.
- Burnstock, G. (1987): Mechanisms of interaction of peptide and nonpeptide vascular neurotransmitter systems. In: *Journal of cardiovascular pharmacology* 10 Suppl 12, S74-81.
- Burnstock, Geoffrey (2012): Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 34 (3), S. 218–225. DOI: 10.1002/bies.201100130.
- Burnstock, Geoffrey (2018): Purine and purinergic receptors. In: *Brain and neuroscience advances* 2, 2398212818817494. DOI: 10.1177/2398212818817494.
- Burnstock, Geoffrey; Ralevic, Vera (1994): New insights into the local regulation of blood flow by perivascular nerves and endothelium. In: *British Journal of Plastic Surgery* 47 (8), S. 527–543. DOI: 10.1016/0007-1226(94)90136-8.
- Campos Munoz, Alejandro; Vohra, Shekhar; Gupta, Mohit (2021): StatPearls. Orthostasis. *Treasure Island* (FL).
- Cines, D. B.; Pollak, E. S.; Buck, C. A.; Loscalzo, J.; Zimmerman, G. A.; McEver, R. P. et al. (1998): Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. In: *Blood* 91 (10), S. 3527–3561.
- Edvinsson, L.; Ekblad, E.; Håkanson, R.; Wahlestedt, C. (1984): Neuropeptide Y potentiates the effect of various vasoconstrictor agents on rabbit blood vessels. In: *British journal of pharmacology* 83 (2), S. 519–525. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1984.tb16516.x.
- Ekblad, E.; Edvinsson, L.; Wahlestedt, C.; Uddman, R.; Håkanson, R.; Sundler, F. (1984): Neuropeptide Y co-exists and co-operates with noradrenaline in perivascular nerve fibers. In: *Regulatory Peptides* 8 (3), S. 225–235. DOI: 10.1016/0167-0115(84)90064-8.
- Enouri, Saad; Monteith, Gabrielle; Johnson, Ron (2011): Characteristics of myogenic reactivity in isolated rat mesenteric veins. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 300 (2), R470-8. DOI: 10.1152/ajpregu.00491.2010.
- Enrique, N.; Rebolledo, A.; Martín, P.; Roldán Palomo, A. R.; Tanzi, F.; Milesi, V. (2012): Extracellular ATP induces fast and transient non-selective cationic currents and cytosolic Ca²⁺ changes in human umbilical artery smooth muscle cells. In: *Purinergic signalling* 8 (2), S. 199–206. DOI: 10.1007/s11302-011-9264-5.

- Feigofsky, Suzanne; Fedorowski, Artur (2020): Defining Cardiac Dysautonomia - Different Types, Overlap Syndromes; Case-based Presentations. In: *Journal of atrial fibrillation* 13 (1), S. 2403. DOI: 10.4022/jafib.2403.
- Gelman, Simon (2008): Venous function and central venous pressure: a physiologic story. In: *Anesthesiology* 108 (4), S. 735–748. DOI: 10.1097/ALN.0b013e3181672607.
- Golbasi, İlhan; Tasatargil, Arda; Aksoy, Nazif Hikmet; Sadan, Gulay; Karasu, Edibe; Turkay, Cengiz; Bayezid, Omer (2005): A functional and histopathological comparison of proximal and distal saphenous vein contractility and morphology. In: *Texas Heart Institute journal* 32 (3), S. 287–293.
- Goldberger, Jeffrey J.; Arora, Rishi; Buckley, Una; Shivkumar, Kalyanam (2019): Autonomic Nervous System Dysfunction: JACC Focus Seminar. In: *Journal of the American College of Cardiology* 73 (10), S. 1189–1206. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.12.064.
- Goldman, David E. (1943): Potential, Impedance, and Rectification in *Membranes*.
- Grundemar, Lars; Kahl, Ulrika; Callréus, Torbjörn; Langel, Ülo; Bienert, Michael; Beyermann, Michael (1996): Ligand binding and functional effects of systematic double d-amino acid residue substituted neuropeptide Y analogs on Y1 and Y2 receptor types. In: *Regulatory Peptides* 62 (2-3), S. 131–136. DOI: 10.1016/0167-0115(96)00011-0.
- Gutterman, David D.; Chabowski, Dawid S.; Kadlec, Andrew O.; Durand, Matthew J.; Freed, Julie K.; Ait-Aissa, Karima; Beyer, Andreas M. (2016): The Human Microcirculation: Regulation of Flow and Beyond. In: *Circulation research* 118 (1), S. 157–172. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.305364.
- Guyton, Arthur C.; Hall, John Edward (2000): *Textbook of medical physiology*. 10th ed. Philadelphia, Pa.: Saunders.
- Guyton, A. C.; Lindsey, A. W.; Abernathy, B.; Richardson, T. (1957): Venous return at various right atrial pressures and the normal venous return curve. In: *The American journal of physiology* 189 (3), S. 609–615. DOI: 10.1152/ajplegacy.1957.189.3.609.
- Hansen, M.A; Dutton, J.L; Balcar, V.J; Barden, J.A; Bennett, M.R (1999): P2X (Purinergic) receptor distributions in rat blood vessels. In: *Journal of the Autonomic Nervous System* 75 (2-3), S. 147–155. DOI: 10.1016/S0165-1838(98)00189-1.
- Harrington, L. S.; Mitchell, J. A. (2005): P2X1 receptors and the endothelium. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 100 Suppl 1, S. 111–112. DOI: 10.1590/s0074-02762005000900019.
- Hearon, Christopher M.; Kirby, Brett S.; Luckasen, Gary J.; Larson, Dennis G.; Dinenno, Frank A. (2016): Endothelium-dependent vasodilatory signalling modulates α 1 -adrenergic vasoconstriction in contracting skeletal muscle of humans. In: *The Journal of physiology* 594 (24), S. 7435–7453. DOI: 10.1113/JP272829.
- Hoyle, C. H.; Knight, G. E.; Burnstock, G. (1990): Suramin antagonizes responses to P2-purinoceptor agonists and purinergic nerve stimulation in the guinea-pig urinary bladder and taenia coli. In: *British journal of pharmacology* 99 (3), S. 617–621. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1990.tb12979.x.
- Ichikawa, T.; Ishikawa, N.; Shigei, T. (1979): Innervation of the canine inferior vena cava. Distribution of adrenergic and cholinergic excitatory fibers among the embryologically distinct segments. In: *Blood vessels* 16 (3), S. 155–162.
- Jacques, Danielle; Cadieux, Alain; Dumont, Yvan; Quirion, Rémi (1995): Apparent affinity and potency of BIBP3226, a non-peptide neuropeptide Y receptor antagonist, on purported neuropeptide Y Y1, Y2 and Y3 receptors. In: *European Journal of Pharmacology* 278 (1), R3-R5. DOI: 10.1016/0014-2999(95)00179-O.

- Kalmar, A. F.; Allaert, S.; Pletinckx, P.; Maes, J-W; Heerman, J.; Vos, J. J. et al. (2018): Phenylephrine increases cardiac output by raising cardiac preload in patients with anesthesia induced hypotension. In: *Journal of clinical monitoring and computing* 32 (6), S. 969–976. DOI: 10.1007/s10877-018-0126-3.
- Karim, F.; Hainsworth, R. (1976): Responses of abdominal vascular capacitance to stimulation of splanchnic nerves. In: *The American journal of physiology* 231 (2), S. 434–440. DOI: 10.1152/ajplegacy.1976.231.2.434.
- Klinke, Rainer; Pape, Hans-Christian; Kurtz, Armin; Silbernagl, Stefan; Baumann, Rosemarie; Brenner, Bernhard et al. (Hg.) (2010): *Physiologie*. 6., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Knight, Gillian E.; Oliver-Redgate, Rachel; Burnstock, Geoffrey (2003): Unusual absence of endothelium-dependent or -independent vasodilatation to purines or pyrimidines in the rat renal artery. In: *Kidney international* 64 (4), S. 1389–1397. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2003.00233.x.
- Kur, Joanna; Newman, Eric A. (2014): Purinergic control of vascular tone in the retina. In: *The Journal of physiology* 592 (3), S. 491–504. DOI: 10.1113/jphysiol.2013.267294.
- Lambertucci, Catia; Dal Ben, Diego; Buccioni, Michela; Marucci, Gabriella; Thomas, Ajiroghene; Volpini, Rosaria (2015): Medicinal chemistry of P2X receptors: agonists and orthosteric antagonists. In: *Current medicinal chemistry* 22 (7), S. 915–928.
- Leitermann, Randy J.; Rostkowski, Amanda B.; Urban, Janice H. (2016): Neuropeptide Y input to the rat basolateral amygdala complex and modulation by conditioned fear. In: *The Journal of comparative neurology* 524 (12), S. 2418–2439. DOI: 10.1002/cne.23960.
- Li, Ling-Zhi; Yue, Li-Hui; Zhang, Zhi-Min; Zhao, Jing; Ren, Lei-Ming; Wang, Hong-Jie; Li, Lu (2020): Comparison of mRNA Expression of P2X Receptor Subtypes in Different Arterial Tissues of Rats. In: *Biochemical genetics* 58 (5), S. 677–690. DOI: 10.1007/s10528-020-09968-9.
- Lorentz, Max N.; Stokes, Amber N.; Rößler, Daniela C.; Lötters, Stefan (2016): Tetrodotoxin. In: *Current biology : CB* 26 (19), R870-R872. DOI: 10.1016/j.cub.2016.05.067.
- Lundberg, J. M.; Modin, A. (1995): Inhibition of sympathetic vasoconstriction in pigs in vivo by the neuropeptide Y-Y1 receptor antagonist BIBP 3226. In: *British journal of pharmacology* 116 (7), S. 2971–2982. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1995.tb15952.x.
- Malmström, R. E. (1997): Neuropeptide Y Y1 receptor mechanisms in sympathetic vascular control. In: *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum* 636, S. 1–55.
- Marshall, Janice M. (2007): The roles of adenosine and related substances in exercise hyperaemia. In: *The Journal of physiology* 583 (Pt 3), S. 835–845. DOI: 10.1113/jphysiol.2007.136416.
- Marshall, Janice M. (2015): Interactions between local dilator and sympathetic vasoconstrictor influences in skeletal muscle in acute and chronic hypoxia. In: *Experimental physiology* 100 (12), S. 1400–1411. DOI: 10.1113/EP085139.
- Modin, A. (1994): Non-adrenergic, non-cholinergic vascular control with reference to neuropeptide Y, vasoactive intestinal polypeptide and nitric oxide. In: *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum* 622, S. 1–74.
- Nakazato, Y.; Ohga, A.; Shigei, T.; Uematsu, T. (1982): Extrinsic innervation of the canine abdominal vena cava and the origin of cholinergic vasoconstrictor nerves. In: *The Journal of physiology* 328, S. 191–203. DOI: 10.1113/jphysiol.1982.sp014259.
- Nichols, Claire M.; Povstyan, Oleksandr V.; Albert, Anthony P.; Gordienko, Dmitry V.; Khan, Omar; Vasilikostas, Georgios et al. (2014): Vascular smooth muscle cells from small human omental arteries

- express P2X1 and P2X4 receptor subunits. In: *Purinergic signalling* 10 (4), S. 565–572. DOI: 10.1007/s11302-014-9415-6.
- Noble, B. J.; Drinkhill, M. J.; Myers, D. S.; Hainsworth, R. (1998): Blood mobilization from the liver of the anaesthetized dog. In: *Experimental physiology* 83 (4), S. 513–522. DOI: 10.1113/expphysiol.1998.sp004134.
- North, R. Alan (2016): P2X receptors. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 371 (1700). DOI: 10.1098/rstb.2015.0427.
- Nway, Nay Chi; Sitticharoon, Chantacha; Chatree, Saimai; Maikaew, Pailin (2016): Correlations between the expression of the insulin sensitizing hormones, adiponectin, visfatin, and omentin, and the appetite regulatory hormone, neuropeptide Y and its receptors in subcutaneous and visceral adipose tissues. In: *Obesity research & clinical practice* 10 (3), S. 256–263. DOI: 10.1016/j.orcp.2015.05.007.
- Patel, Amish; Rhodes, Andrew; Beale, Richard (2008): Assessment of Cardiac Filling and Blood Flow. In: *Critical Care Medicine* Elsevier, S. 39–52.
- Pernow, J. (1988): Co-release and functional interactions of neuropeptide Y and noradrenaline in peripheral sympathetic vascular control. In: *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum* 568, S. 1–56.
- Persson, P. B. (1996): Modulation of cardiovascular control mechanisms and their interaction. In: *Physiological reviews* 76 (1), S. 193–244. DOI: 10.1152/physrev.1996.76.1.193.
- Phillips, J. K.; McLean, A. J.; Hill, C. E. (1998): Receptors involved in nerve-mediated vasoconstriction in small arteries of the rat hepatic mesentery. In: *British journal of pharmacology* 124 (7), S. 1403–1412. DOI: 10.1038/sj.bjp.0701976.
- Ralevic, Vera; Dunn, William R. (2015): Purinergic transmission in blood vessels. In: *Autonomic neuroscience : basic & clinical* 191, S. 48–66. DOI: 10.1016/j.autneu.2015.04.007.
- Ramelet, Albert-Adrien (2011): Venoactive Drugs. In: *Sclerotherapy* Elsevier, S. 369–377.
- Ricci, Stefano (2017): Anatomy. In: *Sclerotherapy* Elsevier, S. 1–26.
- Rivasi, Giulia; Ungar, Andrea (2020): Orthostatic hypotension in older adults: the role of medications. In: *Monaldi archives for chest disease = Archivio Monaldi per le malattie del torace* 90 (4). DOI: 10.4081/monaldi.2020.1254.
- Rothe, C. F. (1983): Reflex control of veins and vascular capacitance. In: *Physiological reviews* 63 (4), S. 1281–1342. DOI: 10.1152/physrev.1983.63.4.1281.
- Rowell, L. B. (1977): Reflex control of the cutaneous vasculature. In: *The Journal of investigative dermatology* 69 (1), S. 154–166. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12497938.
- Rusch, N. J.; Shepherd, J. T.; Vanhoutte, P. M. (1981): The effect of profound cooling on adrenergic neurotransmission in canine cutaneous veins. In: *The Journal of physiology* 311, S. 57–65. DOI: 10.1113/jphysiol.1981.sp013572.
- Sheng, Yulan; Zhu, Li (2018): The crosstalk between autonomic nervous system and blood vessels. In: *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology* 10 (1), S. 17–28.
- Shigei, T.; Ishikawa, N.; Ichikawa, T.; Tsuru, H. (1978): Differences in the response of three embryologically distinct segments of the isolated canine posterior vena cava to vasoactive substances. In: *Blood vessels* 15 (1-3), S. 157–169. DOI: 10.1159/000158161.

Sim, Joan A.; Broomhead, Helen E.; North, R. Alan (2008): Ectodomain lysines and suramin block of P2X1 receptors. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (44), S. 29841–29846. DOI: 10.1074/jbc.M802523200.

Smith, Nicholas; Lopez, Richard A.; Silberman, Michael (2021): StatPearls. Distributive Shock. *Treasure Island* (FL).

St-Pierre, J. A.; Dumont, Y.; Nouel, D.; Herzog, H.; Hamel, E.; Quirion, R. (1998): Preferential expression of the neuropeptide Y Y1 over the Y2 receptor subtype in cultured hippocampal neurons and cloning of the rat Y2 receptor. In: *British journal of pharmacology* 123 (2), S. 183–194. DOI: 10.1038/sj.bjp.0701589.

Tsuru, Hiromichi; Tanimitsu, Noriaki; Hirai, Tomohisa (2002): Role of perivascular sympathetic nerves and regional differences in the features of sympathetic innervation of the vascular system. In: *Japanese journal of pharmacology* 88 (1), S. 9–13. DOI: 10.1254/jjp.88.9.

Tsurumaki, Tatsuru; Yamaguchi, Tsuyoshi; Higuchi, Hiroshi (2002): Marked neuropeptide Y-induced contractions via NPY-Y1 receptor and its desensitization in rat veins. In: *Vascular pharmacology* 39 (6), S. 325–333. DOI: 10.1016/s1537-1891(03)00044-2.

Tucker, William D.; Shrestha, Ribesh; Burns, Bracken (2021): StatPearls. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Inferior Vena Cava. *Treasure Island* (FL).

Turner, C. M.; Vonend, O.; Chan, C.; Burnstock, G.; Unwin, R. J. (2003): The pattern of distribution of selected ATP-sensitive P2 receptor subtypes in normal rat kidney: an immunohistological study. In: *Cells, tissues, organs* 175 (2), S. 105–117. DOI: 10.1159/000073754.

Uhl, Jean-François; Gillot, Claude; Chahim, Maxime (2010): Anatomical variations of the femoral vein. In: *Journal of vascular surgery* 52 (3), S. 714–719. DOI: 10.1016/j.jvs.2010.04.014.

Vanhoutte, P. M.; Scott-Burden, T. (1994): The endothelium in health and disease. In: *Texas Heart Institute journal* 21 (1), S. 62–67. DOI: Review.

Warland, J. J.; Burnstock, G. (1987): Effects of reserpine and 6-hydroxydopamine on the adrenergic and purinergic components of sympathetic nerve responses of the rabbit saphenous artery. In: *British journal of pharmacology* 92 (4), S. 871–880. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1987.tb11393.x.

Wegener, Jörg W.; Loga, Florian; Stegner, David; Nieswandt, Bernhard; Hofmann, Franz (2014): Phospholipase D1 is involved in α 1-adrenergic contraction of murine vascular smooth muscle. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28 (3), S. 1044–1048. DOI: 10.1096/fj.13-237925.

Wiedemar, Natalie; Graf, Fabrice E.; Zwyer, Michaela; Ndomba, Emilia; Kunz Renggli, Christina; Cal, Monica et al. (2018): Beyond immune escape: a variant surface glycoprotein causes suramin resistance in *Trypanosoma brucei*. In: *Molecular microbiology* 107 (1), S. 57–67. DOI: 10.1111/mmi.13854.

Wier, W. Gil; Zang, Wei-Jin; Lamont, Christine; Raina, Hema (2009): Sympathetic neurogenic Ca²⁺ signalling in rat arteries: ATP, noradrenaline and neuropeptide Y. In: *Experimental physiology* 94 (1), S. 31–37. DOI: 10.1113/expphysiol.2008.043638.

Yang, X. P.; Chiba, S. (2000): Effects of a selective neuropeptide Y Y(1) receptor antagonist BIBP 3226 on double peaked vasoconstrictor responses to periarterial nerve stimulation in canine splenic arteries. In: *British journal of pharmacology* 130 (7), S. 1699–1705. DOI: 10.1038/sj.bjp.0703484.

Ziyal, R.; Ziganshin, A. U.; Nickel, P.; Ardanuy, U.; Mutschler, E.; Lambrecht, G.; Burnstock, G. (1997): Vasoconstrictor responses via P2X-receptors are selectively antagonized by NF023 in rabbit isolated

aorta and saphenous artery. In: *British journal of pharmacology* 120 (5), S. 954–960. DOI: 10.1038/sj.bjp.0700984.

7 Anhang

7.1 Weitere Abbildungen

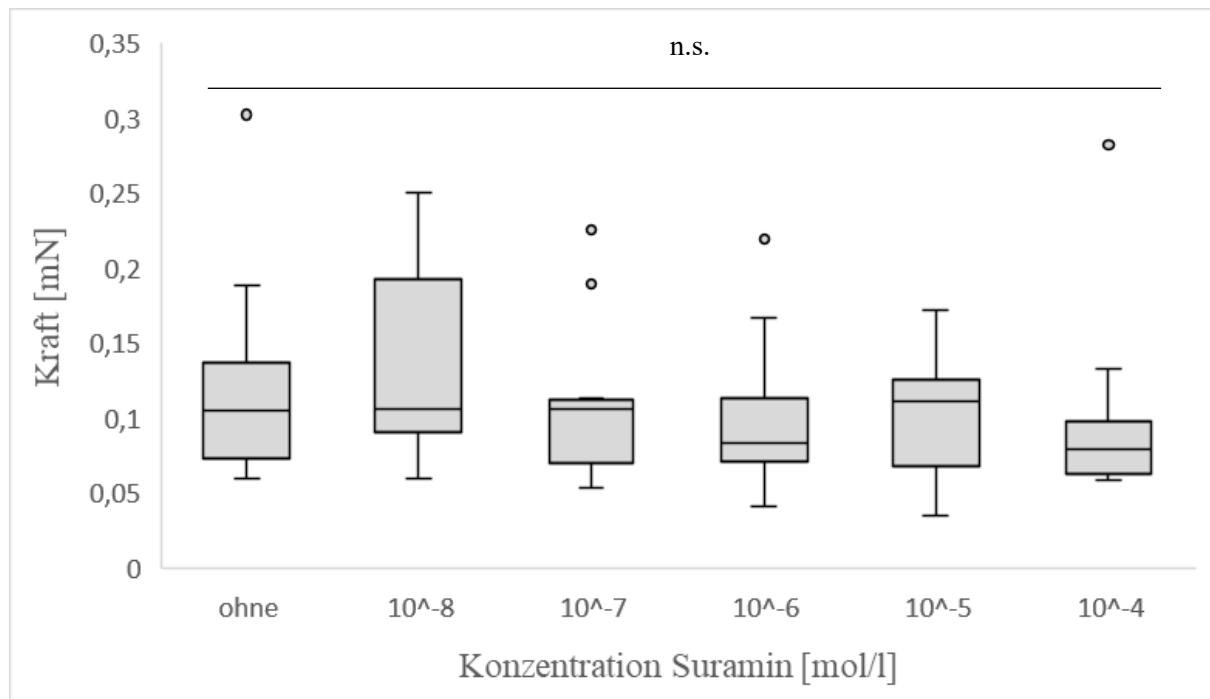


Abbildung 40: Durchschnittswerte der Kontraktionsamplituden der *V. femoralis* mit EFS-Einzelstimulationen und kumulativer Gabe von Suramin. Es zeigte sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse ein knapp verfehltes Signifikanzniveau ($p=0,06$). $n=11$

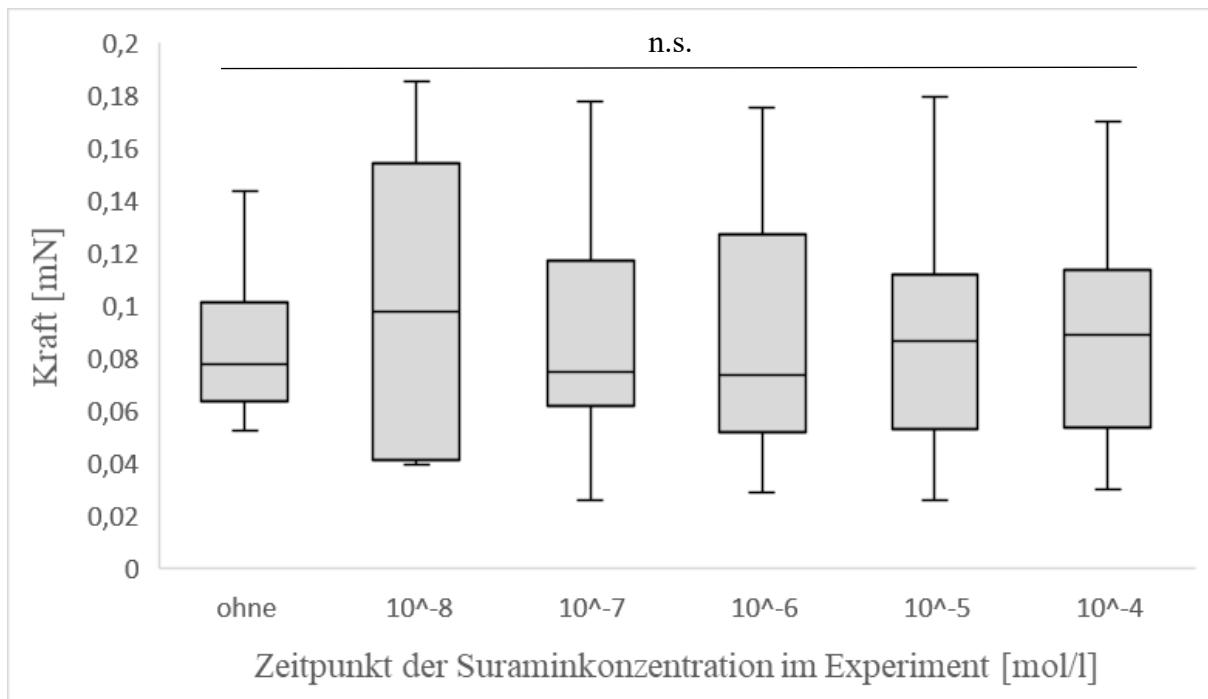


Abbildung 41 Durchschnittswerte der Kontraktionsamplituden der *V. femoralis* mit EFS-Einzelstimulationen an Kontrollpräparaten zur Erfassung von Zeiteffekten. Die Konzentrationsangaben von Suramin stellen die Zeitpunkte dar, zu denen im parallel laufenden Experiment Suramin appliziert wurde. Die Varianzanalyse dieser Kontrolldaten zeigte keine signifikante Veränderung. $n=7$

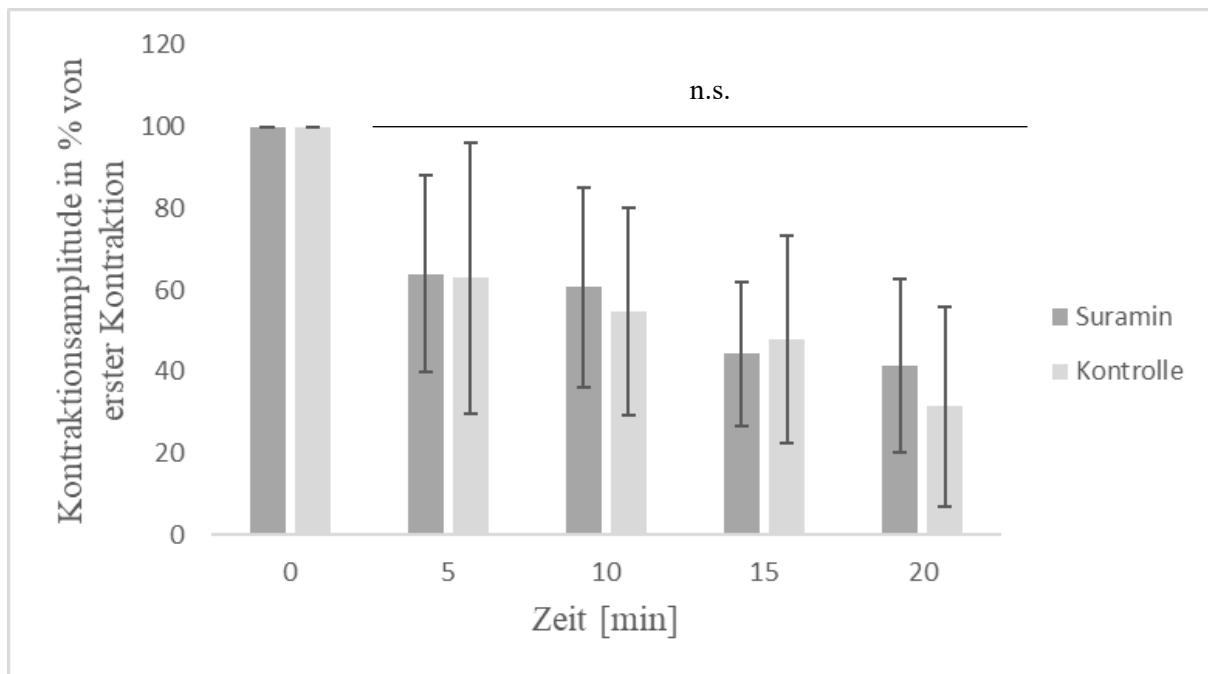


Abbildung 42 Durchschnittswerte der Kontraktionsamplituden der *V. cava* mit 30 Sekunden langer, hochfrequenter (20Hz) EFS und Suramin, sowie Kontrolle zur Erfassung von Zeiteffekten. Die Stimulationen wurden im Abstand von fünf Minuten durchgeführt. Die höchste Konzentration Suramin ($3*10^{-8}$ mol/l) befindet sich bei den Testpräparaten von Beginn an im Organbad. Nach einer initialen Muskelermüdung lässt sich in den weiteren Stimulationen eine starke Streuung und Unregelmäßigkeit, nicht aber ein im Wilcoxon-Test messbarer Unterschied zwischen Experiment und Kontrolle ausmachen. Suramin: $n=13$, Kontrolle: $n=9$

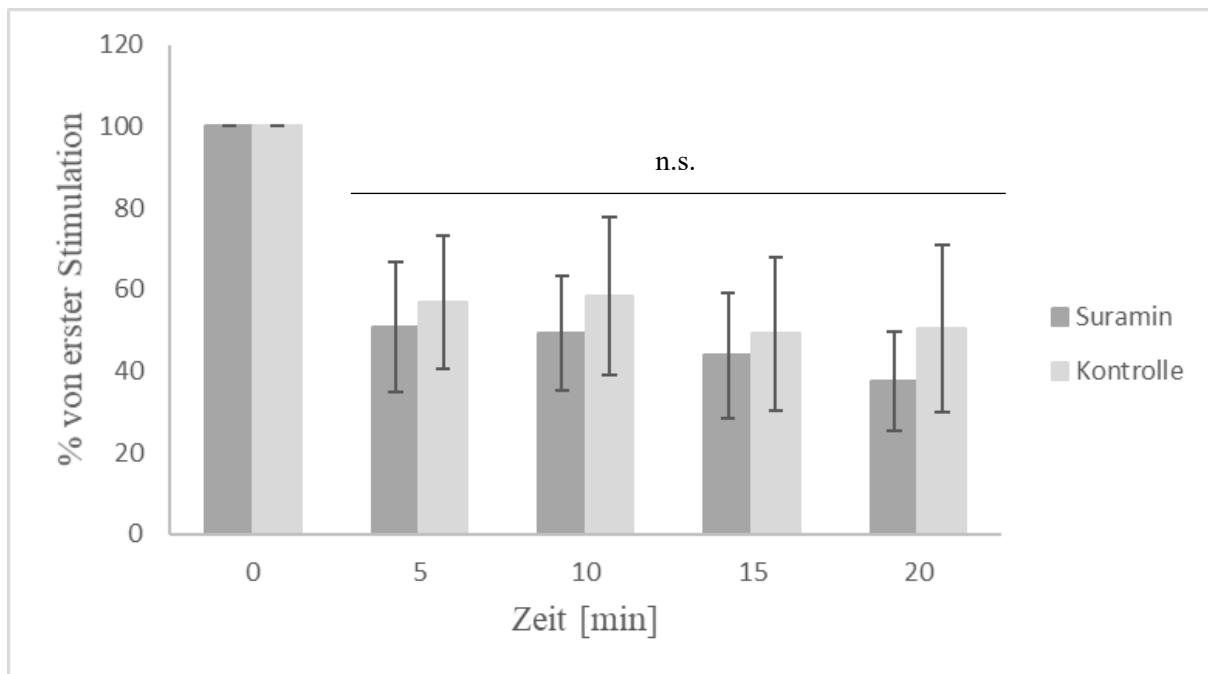


Abbildung 43 Durchschnittswerte der Kontraktionsamplituden der *V. femoralis* mit 30 Sekunden langer, hochfrequenter (20Hz) EFS und Suramin, sowie Kontrolle zur Erfassung von Zeiteffekten. Die Stimulationen wurden im Abstand von fünf Minuten durchgeführt. Die höchste Konzentration Suramin ($3*10^{-8}$ mol/l) befindet sich bei den Testpräparaten von Beginn an im Organbad. Nach einer initialen Muskelermüdung lässt sich in den weiteren Stimulationen eine graphisch sichtbare Verringerung des Tonus bei Anwesenheit von Suramin beobachten, im t-Test für nicht verbundene Stichproben ist der Unterschied zwischen Suramingabe und Kontrolle jedoch nicht statistisch signifikant. Suramin: $n=11$, Kontrolle: $n=8$

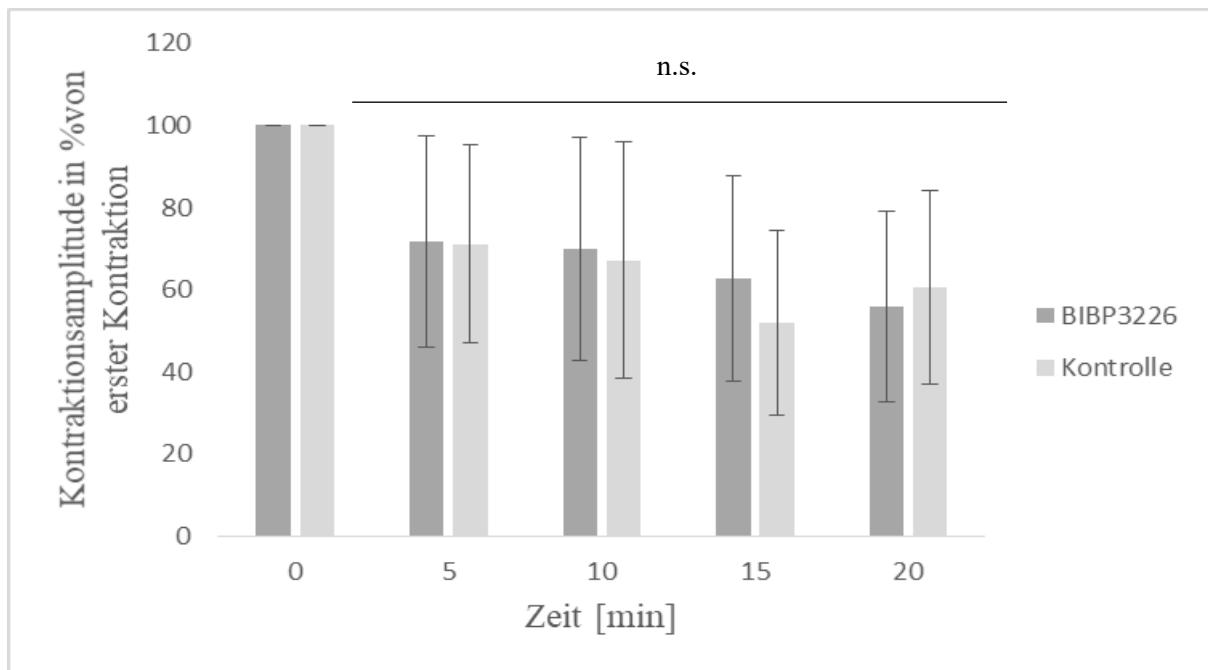


Abbildung 44 Durchschnittswerte der Kontraktionsamplituden der V. cava mit 30 Sekunden langer, hochfrequenter (20Hz) EFS und BIBP3226, sowie Kontrolle zur Erfassung von Zeiteffekten. Die Stimulationen wurden im Abstand von fünf Minuten durchgeführt. Die höchste Konzentration BIBP3226 (10^{-6} mol/l) befindet sich bei den Testpräparaten von Beginn an im Organbad. Nach einer initialen Muskelermüdung lässt sich in den weiteren Stimulationen eine starke Streuung und Unregelmäßigkeit, nicht aber ein im Wilcoxon-Test messbarer Unterschied zwischen Experiment und Kontrolle ausmachen.

BIBP3226: $n=14$, Kontrolle: $n=14$

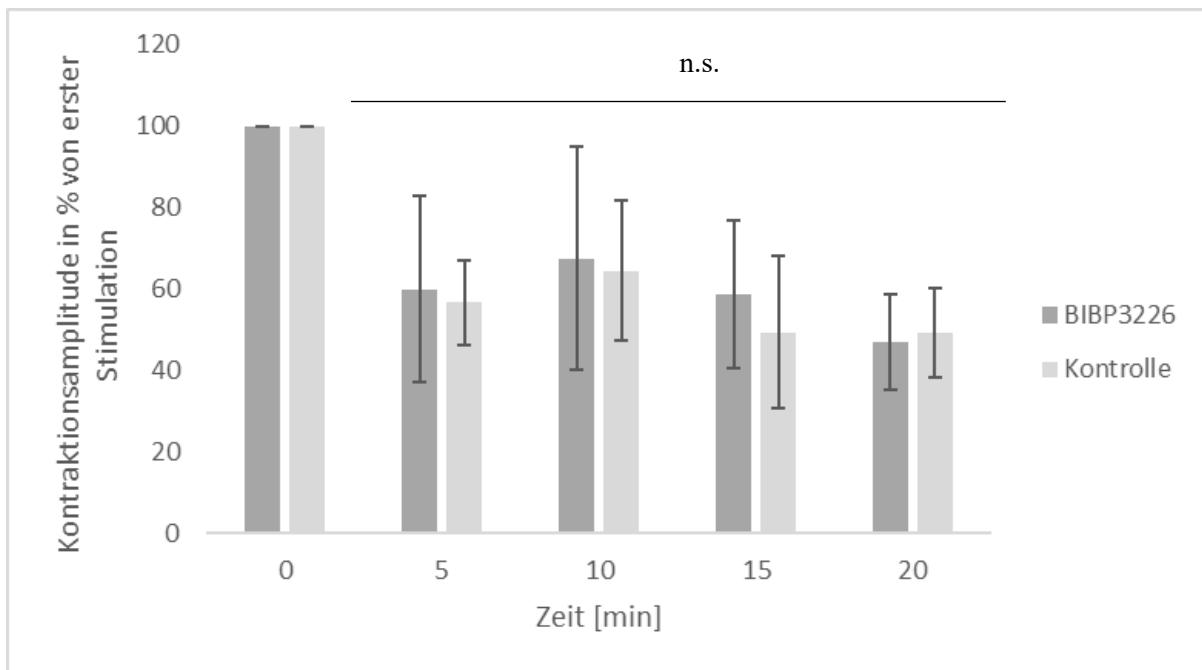


Abbildung 45: Durchschnittswerte der Kontraktionsamplituden der *V. femoralis* mit 30 Sekunden langer, hochfrequenter (20Hz) EFS und BIBP3226, sowie Kontrolle zur Erfassung von Zeiteffekten. Die Stimulationen wurden im Abstand von fünf Minuten durchgeführt. Die höchste Konzentration BIBP3226 (10^{-6} mol/l) befindet sich bei den Testpräparaten von Beginn an im Organbad. Nach einer initialen Muskelermüdung lässt sich in den weiteren Stimulationen eine starke Streuung und Unregelmäßigkeit, nicht aber ein im Wilcoxon-Test messbarer Unterschied zwischen Experiment und Kontrolle ausmachen.

BIBP3226: $n=6$, Kontrolle: $n=5$

7.2 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Professor Patejdl für das Überlassen des Forschungsthemas, für seine umfängliche und professionelle Betreuung, die Begeisterung für das Themengebiet und die Bereitschaft, sich jederzeit meinen Fragen und Unsicherheiten zu widmen. Außerdem möchte ich mich bei Professor Noack für die Unterstützung mit seiner wissenschaftlichen Expertise und die Hilfe bei der Konkretisierung der Fragestellung bedanken. Auch möchte ich mich bei den Mitarbeitenden des Oscar-Langendorff-Instituts für Physiologie für ihre Mithilfe und geduldige Einarbeitung in die Methoden der Laborarbeit sowie für die Unterstützung im Labor bedanken. Dies gilt insbesondere für Tina Sellmann.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freundinnen und Freunden für die bedingungslose Unterstützung und die ermunternden und motivierenden Worte. Ganz besonders gilt dies für meinen Mann und meinen Vater.

8 Thesen

1. Die neurogene Steuerung des Gefäßtonus der V. cava und V. femoralis von Wistar-Ratten erfolgt zusätzlich zu Noradrenalin (NA) auch über weitere Kotransmitter.
2. Die Aktivierung der intramuralen Varikositäten durch elektrische Feldstimulation (EFS) erzeugt in Präparaten der V. femoralis von Wistar-Ratten eine stärkere Kontraktionsantwort als die Aktivierung mit exogen appliziertem NA.
3. Bei durch aufsteigende EFS-Frequenzen bzw. aufsteigende NA-Konzentrationen induzierten Kontraktionen zeigen erstere eine frequenzunabhängig gleichbleibende time to peak, bei NA ist die Kontraktionsdauer konzentrationsabhängig.
4. Suramin, ein Antagonist an ionotropen P2X-Rezeptoren, ruft bei der V. femoralis von Wistar-Ratten eine Verringerung des durch EFS induzierten Tonus hervor.
5. Ein Antagonist an Neuropeptid Y (NPY) – Rezeptoren vom Subtyp Y1, BIBP3226, ruft bei der V. femoralis von Wistar-Ratten eine Verringerung des durch EFS induzierten Tonus hervor.
6. Der P2X-Rezeptoragonist ATP führt bei exogener Applikation zu einer Tonuserhöhung der V. cava und der V. femoralis von Wistar-Ratten.
7. Der kontraktile Effekt von ATP über P2X-Rezeptoren in der Media übersteigt im eingesetzten Modell an der V. cava und der V. femoralis von Wistar-Ratten den in der Literatur beschriebenen relaxierenden Effekt von ATP über endotheliale P2Y-Rezeptoren.
8. Exogen appliziertes NPY erhöht den Tonus der V. cava und der V. femoralis von Wistar-Ratten.
9. Exogen appliziertes NPY bewirkt an der isolierten V. cava und V. femoralis von Wistar-Ratten keine Verstärkung der kontraktilen Wirkung von NA im Sinne eines synergistischen Effekts.
10. P2X1- und P2X2-Rezeptoren sind morphologisch im glatten Muskelgewebe und im Endothel der V. cava und V. femoralis von Wistar-Ratten darstellbar.
11. Das Vorkommen von NPY-positiven Strukturen ist v.a. in der Adventitia von V. cava und V. femoralis von Wistar-Ratten darstellbar und kann als Korrelat einer Innervation durch entsprechende Varikositäten angenommen werden.