

**Endothelabhängige Steuerung von Kaliumkanälen
glatter Muskelzellen intakter kleiner Arterien**

Dissertation



zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Thomas Weidelt

geb. am 08.06.1966 in Halle (Saale)

Gutachterin/ Gutachter:

1. Prof. Dr. F. Markwardt
2. Prof. Dr. H.-J. Ferenz
3. Prof. Dr. U. Klöckner (Köln)

Öffentliche Verteidigung am 29.11.2000 in Halle (Saale)

*„Das Licht der Wissenschaft birgt die Gefahr, dass man glauben kann,
die Welt und man selbst seien ganz erfasst,
während man in Wirklichkeit von der Lichtquelle geblendet ist
und deshalb seine Umgebung dunkel und unverständlich sieht,
während die eigene Nase strahlend hell erleuchtet ist.“*

Peter Høeg: „Von der Liebe und ihren Bedingungen in der Nacht des 19. März 1929“.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	4
1. Einleitung	5
2. Methoden	8
2.1. Versuchslösungen.....	8
2.2. Präparation.....	9
2.3. Versuchsaufbau, Versuchsablauf.....	11
2.4. Datenerfassung, Datenverarbeitung, Auswertung, grafische Darstellung.....	13
3. Ergebnisse	14
3.1. Passive elektrische Eigenschaften glatter Muskelzellen von Mesenterialarterien.....	14
3.2. Elektrische Kopplung glatter Muskelzellen von Mesenterialarterien.....	16
3.3. Experimente an Mesenterialarterien mit intaktem Endothel.....	18
3.3.1. ACh-induzierte endothelabhängige Leitfähigkeitserhöhung.....	18
3.3.2. Beteiligung der löslichen Guanylatzyklase.....	20
3.3.3. Statistik (1).....	20
3.4. Experimente an Mesenterialarterien bei entferntem Endothel.....	22
3.4.1. Simulation der ACh-Wirkung durch SNP – Wirkung von K ⁺ -Kanalblockern.....	22
3.4.2. Variation der extrazellulären K ⁺ -Konzentration.....	27
3.4.3. Beteiligung der löslichen Guanylatzyklase.....	27
3.4.4. Statistik (2).....	28
4. Diskussion	30
4.1. Experimentelle Rahmenbedingungen.....	30
4.2. Passives elektrisches Verhalten.....	30
4.3. Wirkung von ACh.....	33
4.4. Beteiligung von NO bei der Induktion eines hyperpolarisierenden Stromes.....	35
4.5. Endothelabhängige Hyperpolarisation.....	37
5. Zusammenfassung	39
Literaturverzeichnis	41
Danksagung	
Eidesstattliche Erklärung	
Tabellarischer Lebenslauf	
Publikationsliste	

Verzeichnis der Abkürzungen

AC	Adenylatzyklase
ACh	Azetylcholin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
C	elektrische Kapazität, Zellmembrankapazität
$[Ca^{2+}]$	freie Kalziumkonzentration
$[Ca^{2+}]_i$	Kalziumkonzentration im Zytosol
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CTX	Charybdotoxin
DIDS	4,4'-Diisothiozyanat-Stilbene-2,2'-Disulfonsäure
EDRF	endothelabhängiger relaxierender Faktor (endothelium-derived relaxing factor)
EDHF	endothelabhängiger hyperpolarisierender Faktor (endothelium-derived hyperpolarizing factor)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-1,2-bis-(2-aminoethoxyethan)-N, N, N', N'-tetraessigsäure
g	elektrische Leitfähigkeit ($g=1/R$)
GC	Guanylatzyklase
Glib	Glibenclamid
GTP	Guanosintriphosphat
I, i	elektrischer Strom, Strom durch Zellmembran
I_{CaL}	Ca-Strom (L-Typ)
I_{KATP}	ATP-abhängiger Kaliumstrom
I_{KCa}	Ca-abhängiger Kaliumstrom
I_{ns}	nichtselektiver Kationenstrom
IP_3	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
$[K^+]_{ez}$	extrazelluläre K^+ -Konzentration
L-Arg	L-Arginin
L-NAME	N ω -Nitro-L-Arginin-Methylester
MB	Methylenblau
MP	Membranpotenzial
NA	Noradrenalin
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
R_E	Eingangswiderstand einer Zelle
SNP	Nitroprussid-Natrium (sodium nitroprusside)
t, t_{hyp} , t_{rep}	Zeit, Startzeiten von Hyperpolarisation bzw. Repolarisation
τ , τ_{hyp} , τ_{rep}	Zeitkonstanten von Hyperpolarisation bzw. Repolarisation
V, V_0 , V_1 , V_2	elektrische Spannungen bzw. Potenziale
V_m	Membranspannung, Membranpotenzial
V_u	Umkehrpotenzial

1. Einleitung

Kleine Arterien und Arteriolen spielen bei der peripheren Blutdruckregulation eine bedeutende Rolle. In diesem Bereich des Gefäßsystems erfolgt der wesentliche Abfall des Blutdruckes. Dabei haben kleine Änderungen des Gefäßquerschnittes einen großen Einfluss auf den arteriellen Blutdruck und die Durchströmung der peripheren Strombahn. Im Normalzustand sind diese Arterien teilweise kontrahiert. Eine weitere Kontraktion führt zu einer Erhöhung des arteriellen Blutdrucks. Andererseits wird durch eine Dilatation die Blutversorgung des entsprechenden Organs verbessert. Verantwortlich für Konstriktion oder Dilatation eines Gefäßes sind die glatten Gefäßmuskelzellen, deren Kontraktion oder Relaxation u. a. über die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration kontrolliert wird. Die Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol kann durch zwei Mechanismen erhöht werden (Cohen, Weisbrod, Gericke, Yaghoubi, Bierl & Bolotina, 1999). Einmal kann ein Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum in die Muskelzelle u.a. durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle des Sarkolemmes (Mulvany & Aalkjaer, 1990) erfolgen. Dabei wird das Öffnungs- und Schließungsverhalten dieser Ca^{2+} -Kanäle über das Membranpotenzial gesteuert, welches wiederum u.a. durch Aktivierung oder Hemmung von K^+ -Kanälen reguliert wird. Weiterhin kommt es zur Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Organellen, z. B. über Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3) –abhängige Ca^{2+} -Freisetzungskanäle im sarkoplasmatischen Retikulum.

Eine komplexe Wechselwirkung zwischen humoralen, nervösen und metabolischen Faktoren reguliert den Tonus und damit den Querschnitt des Gefäßes. Die glatten Muskelzellen werden direkt über kontrahierende Faktoren (z. B. Noradrenalin-Freisetzung aus sympathischen Nervenendigungen) beeinflusst. Indirekt über das Endothel wirken konstriktiv Endothelin und dilatatorisch der endothelabhängige relaxierende Faktor (EDRF), der endothelabhängige hyperpolarisierende Faktor (EDHF) und Prostazyklin (PGI_2). Die genannten Faktoren können über die Beeinflussung von Ionenkanälen der Zellmembran wirken. Eine Hyperpolarisation der Membran, z. B. durch Öffnung von K^+ -Kanälen, wird insbesondere spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle schließen und zur Relaxation der Muskelzelle führen (Nelson, Patlak, Worley & Standen, 1990; Daut, Standen & Nelson, 1994; Kuriyama, Kitamura & Nabata, 1995; Nelson & Quayle, 1995; Edwards & Weston, 1998).

Einer der Mechanismen bei der Änderung des Membranpotenzials glatter Gefäßmuskelzellen ist die endothelabhängige Hyperpolarisation. Sie entsteht durch Substanzen, die vom Endothel nach dessen Stimulation freigesetzt werden. Der intravasale Blutfluss, Hypoxie oder Substanzen wie Azetylcholin (ACh), ATP, Histamin, Bradykinin oder Thrombin können sol-

che Stimulatoren sein. Abhängig von der Spezies, dem untersuchten Organ, Gefäß oder Gefäßabschnitt und der Art der Stimulation kann der hyperpolarisierende Wirkstoff Stickstoffmonoxid (NO, gleichzusetzen mit EDRF), PGI₂ oder EDHF sein (Garland, Plane, Kemp & Cocks, 1995; Edwards & Weston, 1998; Faraci & Heistad, 1998; Bracamonte, Burnett & Miller, 1999; Félétou & Vanhoutte, 1999; Fleming & Busse, 1999; Pohl & de Wit, 1999). Substanzen, die sich von NO oder von Prostaglandinen unterscheiden, können als EDHF agieren. Im Gespräch sind Zytochrom-P-450-abhängige Metabolite der Arachidonsäure (Garland et al., 1995; Harder, Campbell & Roman, 1995; Edwards & Weston, 1998; Campbell & Harder, 1999). In Mesenterialarterien von Ratten wird eine leichte Erhöhung der extrazellulären K⁺-Konzentration als EDHF angesehen (Edwards, Dora, Gardener, Garland & Weston, 1998).

Die Hyperpolarisation scheint sich hauptsächlich über die Aktivierung von K⁺-Kanälen in der Membran der Muskelzellen zu vollziehen. Welcher spezielle K⁺-Kanal-Typ dabei durch das Endothel stimuliert wird, ist z. T. noch unklar und kann außerdem je nach untersuchtem Präparat variieren (Taylor & Weston, 1988; Vanhoutte, 1993; Quayle & Standen, 1994; Cohen & Vanhoutte, 1995; Garland et al., 1995; Harder et al., 1995; Edwards & Weston, 1998; Edwards et al., 1998; Standen & Quayle, 1998).

Um die Mechanismen der endothelabhängigen Hyperpolarisation aufzuklären, werden von verschiedenen Arbeitsgruppen vorwiegend zwei Typen von Präparationen genutzt. Der erste Typ betrifft intakte Gefäße, Gefäßbringe oder -streifen. Es werden Kontraktionsmessungen, Messungen des Flusses radioaktiv markierter K⁺-, Rb⁺- oder Ca²⁺-Ionen sowie unter Einsatz der Mikroelektroden-Technik elektrophysiologische Messungen durchgeführt, die sich jedoch im Wesentlichen auf die Bestimmung des Membranpotenzials der glatten Gefäßmuskulatur beschränken. Vorteil dieser Präparate ist, dass die untersuchten Zellen so intakt wie möglich sind. Sie werden nicht enzymatisch behandelt oder verändert und verbleiben in ihrer physiologischen Umgebung innerhalb des Gefäßes. Das den Muskelzellen benachbarte Bindegewebe (Adventitia) und das Endothel bleiben in ihrer Formation erhalten, die Dehnung des Gefäßes durch die transmurale Druckdifferenz besteht zum Teil weiterhin. Eine Zuordnung der Zellen zu bestimmten Abschnitten des Gefäßbaumes ist gegeben. Nachteilig wirkt sich bei dieser Technik aus, dass Ionenströme, denen die Membranpotenzialänderungen zugrunde liegen, nicht direkt gemessen werden. Indirekte Schlussfolgerungen über die Beteiligung bestimmter Ionenkanäle werden hierbei nach Änderung des Membranpotenzials durch Variation der extrazellulären K⁺-Konzentration oder durch Einsatz pharmakologischer Substanzen zur Aktivierung oder Blockade von Ionenkanälen gezogen.

Den zweiten Typ von Präparaten stellen frisch isolierte oder kultivierte glatte Gefäßmuskelzellen dar. Hier ist eine direkte Messung von Ionenströmen an Einzelzellen durch Anwendung der Spannungsklemm-Technik möglich. Man kann sowohl das Membranpotenzial als auch die Zusammensetzung intra- und extrazellulärer Lösungen vorgeben und überprüfen. Ergebnisse dieser Messungen sowie fluoreszenzoptische Untersuchungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration lieferten bereits detaillierte Kenntnisse der Ionenbewegungen, die bei der Muskelkontraktion bzw. bei der Wirkung von Transmittern beteiligt sind. Allerdings lösen die Prozeduren zur Einzelzellgewinnung die Muskelzellen aus ihrem natürlichen Verband heraus. Eine Untersuchung der Endothelwirkung auf die Ionenbewegungen bei der Hyperpolarisation glatter Gefäßmuskelzellen ist nur sehr eingeschränkt möglich. Es ist nicht auszuschließen, dass die enzymatische Zellisolierung Membranproteine, wie Rezeptoren und Ionenkanäle, aufgrund der in der Enzymlösung vorhandenen Proteasen schädigen kann. Das elektrophysiologische Verhalten der Zellen kann verändert sein, da die „physiologische Umgebung“ nicht mehr vorhanden ist. Es erfolgt keine Dehnung der Zellen durch den transmuralen Druck. In den vorliegenden Experimenten zum Studium von Ionenströmen an glatten Muskelzellen intakter Mesenterialarterien der Ratte wurde eine Ein-Mikroelektroden-Spannungsklemm-Technik genutzt. Diese Methode erlaubt es, einen Zusammenhang zwischen elektrophysiologischen Messungen an isolierten glatten Muskelzellen und Registrierungen des Membranpotenzials von Muskelzellen intakter Arterien herzustellen. Es wurden Änderungen von Membranpotenzial und Membranleitfähigkeit glatter Muskelzellen weitgehend intakter Arterien untersucht. Dabei sollte geklärt werden, wie die Regulation des Gefäßtonus' bzw. des peripheren Gefäßwiderstandes bei funktionsfähigem Endothel sowie vergleichend nach Ausschalten und anschließender pharmakologischer Simulation der Endothelwirkung erfolgt. Besonderes Augenmerk galt der Frage nach dem Beitrag von NO zur endothelabhängigen Hyperpolarisation und dem dabei beteiligten Typ von K^+ -Kanälen. Die untersuchten Arterien als kleine Widerstandsgefäße wurden ausgewählt, weil sie eine wichtige Rolle bei der Einstellung des peripheren Widerstandes, der Blutversorgung ihrer korrespondierenden Organe und der Regulation von Blutdruck und Blutfluss spielen (Mulvany & Aalkjaer, 1990; Schubert & Mulvany, 1999).

Die klinische Bedeutung dieser Arbeit kann in der Untersuchung der Endothelbeteiligung bei der Blutdruck- und Durchblutungsregulation insbesondere im peripheren Gefäßsystem gesehen werden. Bei Mangeldurchblutungen im Gewebe spielen neben Thrombenbildung im Gefäß auch Vasospasmen eine wichtige Rolle. An diesen Vasospasmen sind verschiedene intravasal vorkommende kontrahierend wirkende oder fehlende dilatierend wirkende vasoak-

tive Mediatoren beteiligt. Bei deren Wirkungen spielt das Endothel eine wichtige Rolle. Die Untersuchung vasoaktiver endothelabhängiger Ereignisse wird also zum Verständnis der für Ischämiezustände verantwortlichen pathophysiologischen Vorgänge beitragen. Die gezielte pharmakologische Beeinflussung dieser Vorgänge kann zur Verbesserung therapeutischer Möglichkeiten bei Mangeldurchblutungszuständen beitragen. Untersuchungen der pharmakologischen Wirkungen auf elektrophysiologische Phänomene glatter Gefäßmuskelzellen können Grundlagen für pharmakologische Therapieansätze liefern.

2. Methoden

2.1. Versuchslösungen

Folgende Substanzen und Versuchslösungen wurden verwendet (Alle Angaben erfolgen in mmol/l, sofern nicht anders angegeben. Die Substanzen stammen von Sigma, Deisenhofen, bzw. von den angegebenen Herstellern. Die Zusammensetzung der Versuchslösungen folgt Jensen, Hughes, Boonen & Aalkjaer, 1993.):

a) Standardversuchslösung

EDTA 0,026; MgSO₄ 1,17;

Merck (Darmstadt): CaCl₂ 2,5; KH₂PO₄ 1,18; NaHCO₃ 25;

Serva (Heidelberg): Glukose 5,5; KCl 4,7; NaCl 119.

b) Kollagenaselösung

30 ml modifizierte kalziumfreie Standardversuchslösung ohne EDTA, zuzüglich CaCl₂ (40 µmol/l); 0,04 mg/ml Kollagenase Typ Worthington (Seromed-Biochrom KG, Berlin).

c) Weitere Substanzen

Askorbinsäure 6; Charybdotoxin 48 nmol/l; 4,4'-Diisothiozyanat-Stilbene-2,2'-Disulfonsäure (DIDS) 1; Glibenclamid 10 µmol/l; Indomethacin 10 µmol/l; L-Arginin 0,125; N ω -Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) 1; Nitroprussid-Natrium 1 µmol/l; Noradrenalin 1 µmol/l; Bayer (Leverkusen): Nisoldipin 1 µmol/l.

Merck: Methylenblau 100 µmol/l.

Serva: Azetylcholin 10 µmol/l;

Die Lösungen wurden vor Versuchsbeginn mit Karbogengas (5 % CO₂, 20 % O₂, 75 % N₂) so äquilibriert, dass sich ein pH-Wert zwischen 7,4 und 7,42 einstellte. Der Noradrenalinlösung wurde zur Stabilisierung Ascorbinsäure zugesetzt. Lichtempfindliche Substanzen wurden bei Abdunklung des Versuchslabors appliziert.

2.2. Präparation

Die Untersuchungen erfolgten an kleinen Arterien aus dem Mesenterium der Ratte. Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht zwischen 200 g und 250 g wurden mit Äther narkotisiert und durch Herzentnahme getötet. Danach wurde eine Dünndarmschlinge von etwa 10 cm Länge mit Mesenterium entnommen, in gekühlte (5°C) Ca²⁺-arme (200 µmol/l) Standardversuchslösung überführt und anschließend in einer mit Silikon-Elastomer (Sylgard 184, Dow Corning, Seneffe, Belgien) ausgegossenen Präparationsschale ringförmig aufgespannt. Das Mesenterialgewebe und die der Arterie parallel gelegene Vene wurden mit mikrochirurgischen Pinzetten und Scheren unter einem Stereomikroskop (Hund, Wetzlar) abpräpariert. Die Präparation erfolgte ebenfalls bei etwa 5°C und ständiger Begasung mit Karbogengas. Die isolierte Arterie wurde nach beidseitiger Abtrennung vom Gefäßbaum in einer temperierbaren Edelstahlkammer (Volumen 5 ml, Abb. 1) durch eine entsprechend dem Gefäßdurchmesser ausgezogene Glaskapillare kanüliert und am Sylgardbeschichteten Kammerboden mit dünnen Glasnadeln so fixiert, dass eine Perfusion nicht behindert wurde. Die Innenperfusion der Arterie erfolgte dann über diese Glaskapillare durch eine Spritzenpumpe (Program 2, Becton-Dickinson, Alzenau) mit konstantem Fluss (2 ml/h). Die untersuchten Arterien hatten Innendurchmesser von 120-200 µm und Längen von etwa 5-10 mm.

Der intravasale Druck der Arterien wurde in einigen Experimenten mit einem Druckmesswandler (W 112, RFT-Biomonitor, Zwönitz) direkt am Ende der Glaskapillare bestimmt. Er betrug 50 ± 10 mmHg (Mittelwert \pm Standardabweichung) bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 2 ml/h.

Die Außenlösung wurde permanent durch eine Schlauchpumpe (Ismatec, Wertheim-Mondfeld) ausgetauscht. Ein Lösungswechsel in der Kammer vollzog sich innerhalb einer Minute. Mit beiden Perfusionssystemen war somit ein getrennter intra- und extravasaler Lösungswechsel möglich.

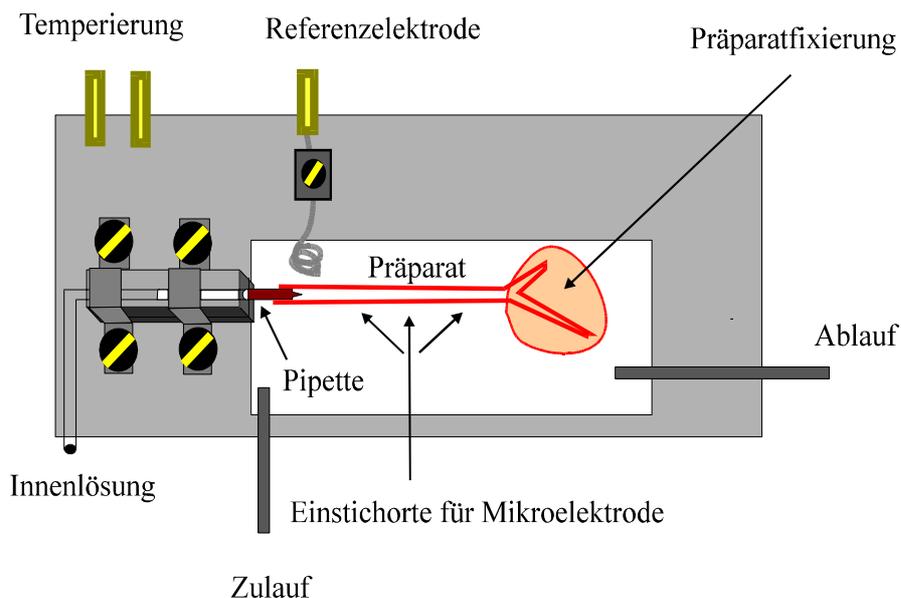


Abbildung 1: Darstellung der Messkammer mit den Anschlüssen für Perfusion und Temperierung.

Die Temperatur der Kammer wurde thermostategesteuert (Lauda M3, Lauda- Königshofen) auf 31°C eingestellt. Die Versuchsbeobachtung erfolgte über ein Durchlichtmikroskop (Optiphot-2, Nikon, Düsseldorf). Zu Beginn der Versuche wurde die äußere Standardversuchslösung für 2 min durch eine Kollagenaselösung ersetzt, um eine bessere Penetration der Mikroelektroden durch die Adventitia zu ermöglichen. Diese Prozedur führte zu keinen sichtbaren strukturellen oder funktionellen Veränderungen an den Präparaten. Nach 30 min Auswaschen der Kollagenaselösung wurden die isolierten Arterien durch extravasalen Zusatz von 1 $\mu\text{mol/l}$ NA zur extravasalen Standardversuchslösung vorkontrahiert. Für die elektrophysiologischen Experimente wurden nur solche Präparate verwendet, die eine deutliche Konstriktion, aber keine Tonusoszillationen zeigten.

Weiterhin wurden folgende Startbedingungen festgelegt (nachfolgend als „Kontrolle“, „Kontrollbedingungen“ bzw. „Kontrolllösung“ bezeichnet): Der Standardversuchslösung wurden zur Blockierung von Ca^{2+} -Strömen Nisoldipin sowie zur Blockierung von Cl^- -Strömen 4,4'-Diisothiozyanat-Stilbene-2,2'-Disulfonsäure (DIDS; Waniishi, Inoue, Morita, Teramoto, Abe & Ito, 1998; Wohlrab & Markwardt, 1999) hinzugesetzt. Um die Bildung von Zyklooxygenase-Produkten zu verhindern, wurde intravasal Indomethacin zugesetzt (Gambone, Murray & Flavahan, 1997; Nishiyama, Hashitani, Fukuta, Yamamoto & Suzuki, 1998). In den Präparaten mit intaktem Endothel wurde ebenso L-Arginin (L-Arg) perfundiert, um einen L-Arg-Mangel auszuschließen und die endogene NO-Produktion zu gewährleisten (Miyoshi, Nakaya & Moritoki, 1994).

In einem Teil der Experimente wurde das Endothel durch ca. 1 min intravasale Perfu-

sion einer Luftblase geschädigt. An diesen Präparaten führte die Gabe von $10 \mu\text{mol/l}$ ACh zu einer stark verminderten, aber nicht komplett aufgehobenen Relaxation auf etwa 10% der Ausgangswerte, so dass man von einer nicht ganz vollständigen Endothelentfernung ausgehen muss. Drastischere Methoden zur Endothelschädigung, wie mechanisches Abreiben mit Draht oder Perfusion von Detergenzien (z. B. Saponin), beeinflussten oder zerstörten gar die glatte Muskulatur. In Vorversuchen wiesen die meisten Muskelzellen dann Membranpotenziale unter -20 mV auf. Die Zahl erfolgloser Einstiche in die Muskelzellschicht erhöhte sich stark.

2.3. Versuchsaufbau, Versuchsablauf

Mit einem Videosystem, bestehend aus Kamera (CCD-502) und Monitor (EM-121A, beides Bischke Electronic, Berlin) sowie einem Videorecorder („VCR“, Panasonic AG-7330, Japan), wurde der Versuchsverlauf überwacht und aufgezeichnet (Abb. 2). Die Edelstahlkammer mit eingespanntem Präparat wurde im Durchlichtmikroskop angeordnet. Über einen Mikromanipulator erfolgte der Einstich der Mikroelektrode in die Muskelzellschicht der Mesenterialarterie. Die Elektrode war über einen Vorverstärker mit dem Verstärker verbunden. Die Abschirmung elektromagnetischer Störfelder wurde durch einen Faraday-Käfig gewährleistet.

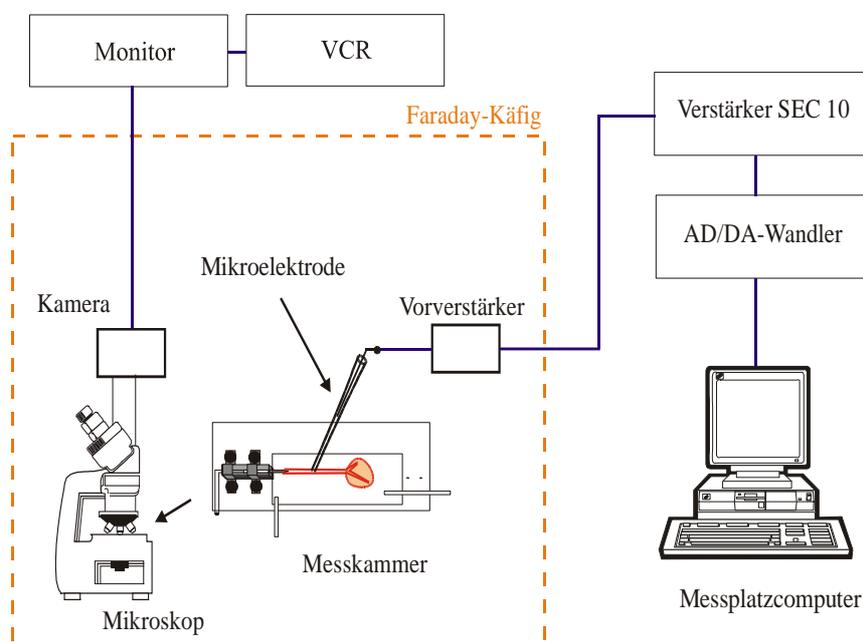


Abbildung 2: Schema des Messplatzes mit Messkammer, Mikroskop und weiteren Geräten zur optischen und digitalen Datenerfassung. Nähere Beschreibung im Text.

Die Mikroelektroden wurden aus Borosilikatglas (WPI, Mauer) mit einem Elektrodenziehgerät PUL-1 (WPI) gezogen und mit gefilterter KCl-Lösung ($0,5 \text{ mol/l}$) gefüllt. Um die

Elektrodenkapazität zu reduzieren, wurden die Spitzen der Mikroelektroden in Silikonöl (Merck) getaucht.

Die Messung von Membranströmen und -spannungen der glatten Gefäßmuskelzellen erfolgte mit einem Ein-Mikroelektroden-Spannungsklemm-Verstärker (SEC 10, NPI Electronic, Tamm). Dieser Verstärker enthielt eine gegenüber anderen Geräten dieser Bauart verbesserte Kapazitätskompensation der verwendeten Mikroelektroden. Er erlaubte die Injektion sehr kurzer, starker Strompulse (120 nA in $10\text{-}20 \mu\text{s}$) durch hochohmige Mikroelektroden und die Messung von Membranpotenzialen im selben Zyklus. Dazu wechselte der Verstärker zyklisch zwischen Spannungsmessung und Strominjektion hin und her. In den Experimenten wurden Strom-Spannungs-Schaltfrequenzen zwischen 25 und 35 kHz genutzt. Der mit der Elektrode verbundene Verstärker ermöglichte Widerstandsmessungen der verwendeten Mikroelektroden („R-Modus“), mit Strominjektionen Messungen des Membranpotenzials (Stromklammer, „C-Modus“) sowie Membranstrommessungen (Spannungsklammer, „V-Modus“).

Nach Eintauchen der Mikroelektrode in die Badlösung wurde zuerst der Elektrodenwiderstand im R-Modus des Verstärkers bestimmt. Es wurden nur Elektroden mit einem Widerstand $>50 \text{ M}\Omega$ verwendet. Dann erfolgte im B-Modus (Brückenabgleich) die elektronische Kompensation des Elektrodenwiderstandes. Die Mikroelektrodenkapazität wurde mit Strompulsinjektionen im C-Modus (elektronische Kapazitätskompensation) abgeglichen. Durch die Adventitia wurde dann die Mikroelektrode in die Muskelzelle eingestochen (Abb. 3).

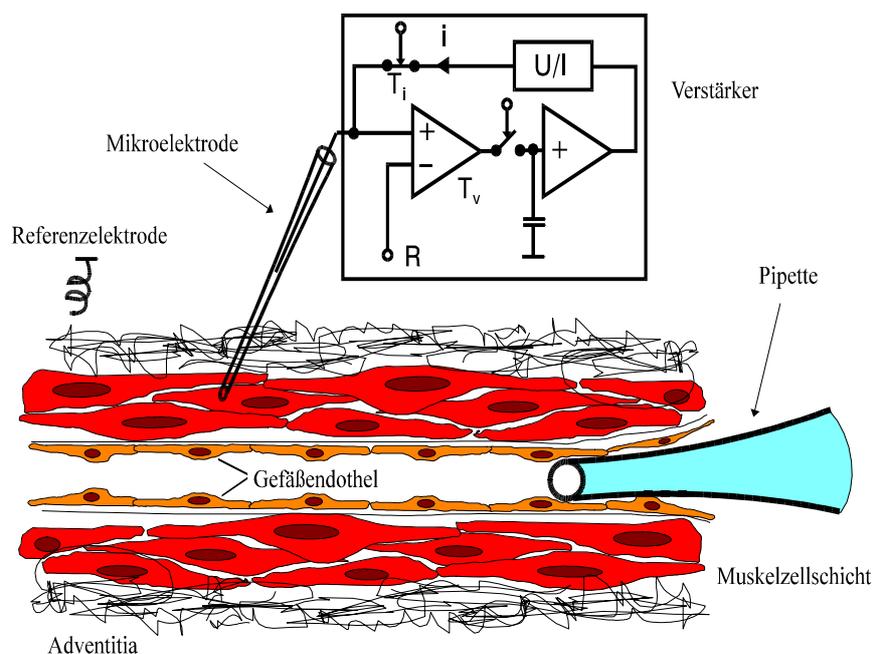


Abbildung 3: Schnittdarstellung einer Mesenterialarterie und Illustration des Messprinzips.

Die Positionierung der Elektroden gewährleistete ein Piezo-Mikromanipulator (WPI), der schrittweise steuerbare Elektrodenbewegungen zwischen 0,5 und 10 μm zuließ. Bei den Messungen wurde im C-Modus des Verstärkers das Membranpotenzial bestimmt. Von einer Haltespannung von -40 mV ausgehend wurden dann pro Zelle drei Spannungsrampen von -90 mV auf +20 mV in 500 ms in einem Abstand von je 3 s appliziert (V-Modus) und die Stromantworten aufgezeichnet. Zum Schluss wurde im C-Modus noch einmal das Membranpotenzial gemessen. Dieses Aufnahmeprotokoll dauerte etwa eine Minute.

Zur Auswertung wurden nur solche Registrierungen zugelassen, bei denen das Membranpotenzial nach der Strommessung maximal 5 mV Abweichung vom Ausgangswert aufwies. Weiterhin musste beim Herausziehen der Mikroelektrode aus der Muskelzelle ein deutlicher Potenzi sprung auf 0 ± 3 mV zu beobachten sein. Ein Einstich in eine Muskelzelle war in der Regel nur für maximal 2 Minuten stabil. Die Methode ist damit nicht geeignet, elektro-physiologische Parameter während des Wechsels von intra- oder extrazellulärer Lösung zu erfassen. Es wurden deshalb die langanhaltenden Effekte der applizierten Substanzen untersucht. Jede Messung startete frühestens 5 Minuten nach Wechsel der intra- oder extravasalen Lösung. Nach Applikation der einzelnen Versuchslösungen wurden jeweils an 5-15 Zellen Membranstrommessungen vorgenommen. Die Registrierung des Gefäßinnendurchmessers erfolgte simultan bzw. nach Ende der Versuche an Hand der Videoaufnahmen.

Zur gleichzeitigen Messung von Membranpotenzialen glatter Muskelzellen an verschiedenen Orten der Mesenterialarterien (Untersuchung der elektrischen Kopplung) wurde ein zweiter Mikroelektrodenverstärker (OC-725C, Warner Instr., Hamden, CT, USA) eingesetzt. Der Verstärker SEC 10 wurde am ersten Einstichort im Stromklammermodus betrieben, parallel dazu erfolgte mit dem zweiten Verstärker die Aufnahme des Membranpotenzials an der zweiten Mikroelektrode.

2.4. Datenerfassung, Datenverarbeitung, Auswertung, grafische Darstellung

Die Datenerfassung erfolgte über einen Personalcomputer AT 386 unter Verwendung der pClamp-Software (Axon, Foster City, USA). Die Messdaten wurden über einen AD/DA-Wandler (LabMaster DMA TM-100/OEM, Beltech, Eindhoven, Niederlande) digitalisiert und für die spätere Analyse gespeichert. Die Stromsignale wurden mit einer Frequenz von 1,3 kHz gefiltert und mit 1 kHz gewandelt. Nach den Experimenten wurden die rampenförmigen Stromantworten unter Nutzung des Programmes Lotus (Lotus Development, München) im Bereich von -60 mV bis -20 mV einer linearen Regression unterzogen. In diesem Spannungs-

bereich sind die Stromkurven weitgehend linear. Die Schnittpunkte der verschiedenen Stromkurven nach Substanzapplikation und deren Kreuzungspunkte mit der x-Achse liegen in dieser „region of interest“. Aus den gemittelten Regressionskurven wurden der mittlere Anstieg g (die Leitfähigkeit, „slope conductance“) und das mittlere Umkehrpotenzial V_u bestimmt. Die mittleren Stromwerte werden in den Abbildungen 6 bis 8, 11 bis 15 und 17 mit ihrem Standardfehler (als senkrechte Balken in den Stromdarstellungen) gezeigt. In Abb. 16 sind die Mittelwerte des Umkehrpotenzials mit ihrem Standardfehler aufgetragen. Unterschiede zwischen den Mittelwerten wurden durch Varianzanalyse (ANOVA-Methode) und multiplen Rangtest unter Verwendung des Programms Statgraph (STSC Inc., Rockville, MD, USA) auf Signifikanz getestet. Dabei wurde als Signifikanzgrenze (p) 5 % angenommen.

Die Klammern in den Abb. 9 und 10 sowie 18 und 19 bezeichnen die Zugehörigkeit der Mittelwerte zur gleichen Grundgesamtheit.

3. Ergebnisse

3.1. Passive elektrische Eigenschaften glatter Muskelzellen von Mesenterialarterien

Zur Untersuchung passiver elektrischer Eigenschaften glatter Muskelzellen der Mesenterialarterien mit der Ein-Mikroelektroden-Technik wurden deren Eingangswiderstand R_E und Eingangskapazität C durch Injektion eines hyperpolarisierenden Stromes von 0,1 nA im Stromklammer-Modus bestimmt. Abb. 4 zeigt ein Beispiel dieser Messungen (**A** und **B**). Die Arterie war intra- und extravasal der Standardversuchslösung ausgesetzt. Von der Abweichung des Ruhemembranpotenzials um 12,9 mV ausgehend wurde hier ein Eingangswiderstand von 129 M Ω errechnet. Entsprechend der Änderungen des Potenzials V wurde ein mittlerer Eingangswiderstand R_E von 125 ± 25 M Ω für 25 Zellen unter Kontrollbedingungen bestimmt. In Experimenten, in denen die Arterien intra- und extravasal nur der Standardversuchslösung (d.h. ohne Nisoldipin, DIDS oder Indomethacin) ausgesetzt waren, war der mittlere Eingangswiderstand nicht signifikant verschieden ($R_E = 115 \pm 20$ M Ω , 32 Zellen) im Vergleich zum mittleren Eingangswiderstand unter Kontrollbedingungen.

Der Zeitverlauf der Membranhyperpolarisation und –repolarisation wurde durch:

$$V(t) = V_0 + \Delta V * (1 - \exp((t_{hyp} - t) / \tau_{hyp})) \quad (1)$$

für die Hyperpolarisation (mit $t \geq t_{\text{hyp}}$) und durch

$$V(t) = V_1 + \Delta V * (\exp((t_{\text{rep}} - t) / \tau_{\text{rep}})) \quad (2)$$

für die Repolarisation (mit $t \geq t_{\text{rep}}$) angenähert (in Abb. 4A als gepunktete Linie dargestellt). Dabei sind t_{hyp} und t_{rep} die Startzeiten von Anstieg und Abfall des hyperpolarisierenden Stromes. V_0 und V_1 sind die Werte des gemessenen Membranpotenzials V vor der Hyperpolarisation bzw. vor der Repolarisation. Der Zeitverlauf in der Beispielmessung wurde monoexponentiell entsprechend den Gleichungen (1) und (2) mit Zeitkonstanten $\tau_{\text{hyp}} = 1,9$ ms für die Hyperpolarisation und $\tau_{\text{rep}} = 1,7$ ms für die Repolarisation angenähert. Aus dem experimentellen Verlauf ergab sich dann für diese Messung mit:

$$\tau = \frac{\tau_{\text{hyp}} + \tau_{\text{rep}}}{2}, \quad \tau = C * R_E \text{ bzw. } C = \frac{\tau}{R_E} \quad (3)$$

eine Zellkapazität von etwa 14 pF.

In Abb. 4C ist die Beziehung zwischen dem Eingangswiderstand R_E und der Zeitkonstanten τ des Spannungsverlaufes nach Strominjektionen entsprechend 4B gezeigt. Hier wurden insgesamt 6 Messungen in Präparaten mit Endothel unter Kontrollbedingungen und zusätzlicher intravasaler Applikation von ACh und L-Arg (Symbol **o**), 10 Messungen in Arterien mit zerstörtem Endothel ohne Gabe von ACh oder L-Arg (+) sowie 19 Messungen in Gefäßen ohne Endothel bei extravasaler Gabe von Charybdotoxin (CTX) und Glibenclamid (Glib) zusammengefasst (**x**).

Die gemittelten Zeitkonstanten τ_{hyp} und τ_{rep} aus den genannten Experimenten waren unter Kontrollbedingungen (Standardversuchslösung unter Zusatz von Nisoldipin, DIDS und Indomethacin) nicht signifikant verschieden ($1,66 \pm 0,4$ ms für τ_{hyp} und $1,70 \pm 0,4$ ms für τ_{rep} , gemessen an 25 Zellen).

Die mittlere Eingangskapazität der durch die Strominjektion hyperpolarisierten Membran wurde wieder mit (3) berechnet. Hierbei war τ der Mittelwert von τ_{hyp} und τ_{rep} . Es ergab sich eine mittlere Kapazität von $12,3 \pm 2,2$ pF. Dazu wurden insgesamt 96 Zellen aus drei verschiedenen Gefäßen ausgewertet.

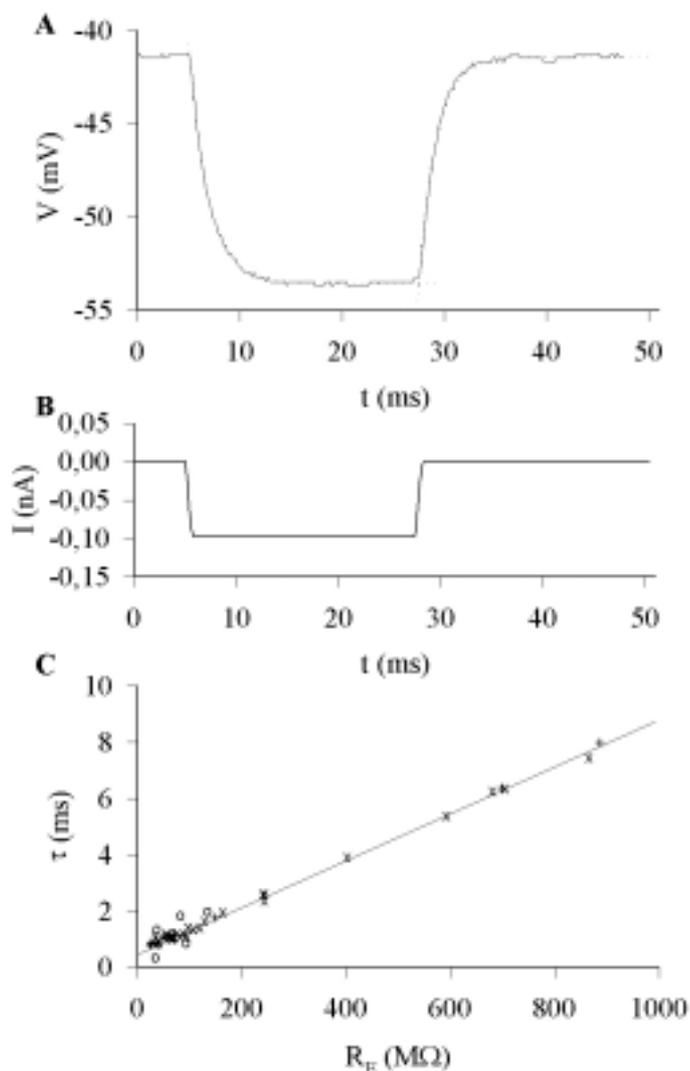


Abbildung 4: Passive elektrische Eigenschaften glatter Muskelzellen von Mesenterialarterien mit intaktem Endothel. **A:** Änderung des Membranpotenzials nach Injektion eines hyperpolarisierenden Stromes; rechnerische Näherung gepunktet dargestellt. **B:** Zeitverlauf dieses hyperpolarisierenden Stromes. **C:** Zeitliche Beziehung zwischen dem Eingangswiderstand R_E und der Zeitkonstanten τ (als Mittelwert aus t_{hyp} und t_{rep}) der Spannungsrelaxation.

3.2. Elektrische Kopplung glatter Muskelzellen von Mesenterialarterien

Um die elektrische Kopplung zwischen den glatten Gefäßmuskelzellen zu untersuchen, wurden ähnliche Experimente wie bereits beschrieben durchgeführt. In einer Entfernung von 120 bis 150 μm von der Strominjektionsstelle (d. h. der ersten Mikroelektrode) wurden hier zusätzlich Membranpotenzialmessungen mit einer zweiten Mikroelektrode vorgenommen. Die Einstichorte der beiden Elektroden wurden so gewählt, dass sie auf einer gedachten Linie senkrecht zur Gefäßachse lagen, um der Anordnung der glatten Muskelzellen innerhalb

der Arterie und damit der Richtung der wahrscheinlichsten Kopplung zu folgen. Abb. 5 demonstriert ein typisches Beispiel einer solchen Messung. 5A zeigt den Potenzialverlauf, der mit einer Mikroelektrode im Stromklammermodus aufgezeichnet wurde. Extra- und intravasal wurde die Kontrolllösung appliziert. Der Zeitverlauf des injizierten Stromes wird in 5B dargestellt. Man erkennt in 5C, dass der an der ersten Elektrode injizierte Strompuls das Membranpotenzial am Einstichort der zweiten Mikroelektrode (in 120 μm Entfernung) nicht beeinflusst. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der Spannungsachsen in den Darstellungen 5A und 5C. In 20 Messungen betrug die mittlere Potenzialabweichung an der zweiten Elektrode $0,4 \pm 0,3 \%$, sie war nicht signifikant verschieden von Null.

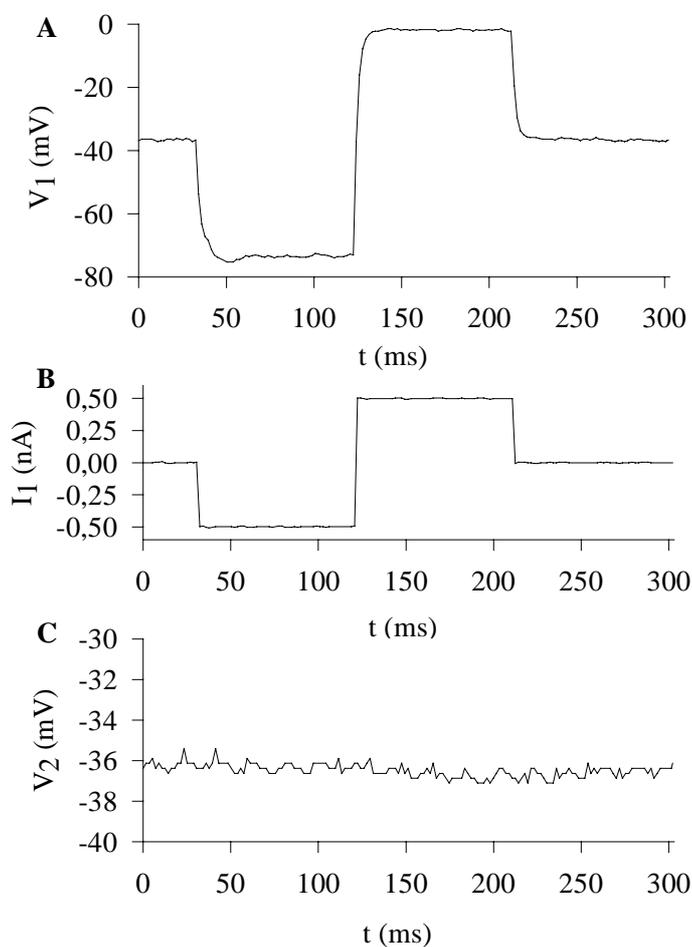


Abbildung 5: Messungen zur elektrischen Kopplung glatter Gefäßmuskelzellen unter Verwendung einer zweiten Mikroelektrode **A:** Membranpotenzialverlauf nach einer Strominjektion entsprechend **B.** **C:** Membranpotenzialverlauf an der zweiten Mikroelektrode in 120 μm Entfernung vom Einstichort der ersten Mikroelektrode.

3.3. Experimente an Mesenterialarterien mit intaktem Endothel

3.3.1. ACh-induzierte endothelabhängige Leitfähigkeitserhöhung

Zur Untersuchung des endothelialen Einflusses auf das Membranpotenzial glatter Gefäßmuskelzellen wurden orientierende Experimente an Mesenterialarterien mit intaktem Endothel durchgeführt. Anhand der Aufzeichnung des Membranpotenzials und der Stromantworten der Muskelzellen wurden endothelabhängige Veränderungen, insbesondere die Erhöhung der Leitfähigkeit durch ACh untersucht.

Die Arterien wurden der Kontrolllösung ausgesetzt, nach Durchlaufen der Spannungsrampen wurden die Stromantworten (Abb. 6, **Kontrolle**) registriert. Nach Gabe von ACh (**ACh**) wurde die mittlere Stromantwort steiler, das heißt, die Membranleitfähigkeit erhöhte sich signifikant, wie aus der statistischen Auswertung (Abb. 10) zu entnehmen ist. Das Umkehrpotenzial der mittleren Ströme verschob sich zu negativeren Werten hin und zeigte somit die Hyperpolarisation der Zellmembran an (Abb. 9). Wie der Kontrollstrom wies der Strom nach ACh-Applikation eine leichte Einwärtsgleichrichtung auf (Abb. 6, **ACh**). Die gemittelten Stromkurven schneiden sich bei etwa -55 mV. Dieser Wert stellt das Umkehrpotenzial eines ACh-induzierten Stromes dar. Die nun folgende intravasale Substitution von L-Arg durch N ω -Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME; Block der NO-Synthase; Kerwin, Lancaster & Feldman, 1995; Hillaire-Buys, Chapal, Linck, Blayac, Petit & Loubatières-Mariani, 1998) verringerte die Leitfähigkeit unter den Kontrollwert. Die gemittelten Stromantworten (**ACh + L-NAME**) schneiden hier die Kontrollstromkurve ebenfalls bei ungefähr -55 mV. Es wird ersichtlich, dass ACh einen hyperpolarisierenden Strom induziert und L-NAME diesen Strom blockiert. Die mittleren Ströme wurden aus 12 bis 19 Messungen in 3 Präparaten mit intaktem Endothel errechnet.

Bei drei weiteren Präparaten (12 bis 19 Einstiche) wurde nach Aufzeichnung des Kontrollstromes (Abb. 7, **Kontrolle**) L-NAME zeitlich vor ACh intravasal appliziert. Die aufgezeichneten Strom-Spannungs-Kurven zeigen eine verminderte Leitfähigkeit der geklemmten Muskelzellen (**L-NAME**) und eine Rechtsverschiebung des Umkehrpotenzials. ACh konnte dann den Membranstrom nicht mehr vergrößern, führte also nicht zu einer Steigerung der Leitfähigkeit (**L-NAME + ACh**). Der Schnittpunkt der drei mittleren Ströme liegt bei etwa -45 mV. Die Experimente zeigen, dass L-NAME die Leitfähigkeitserhöhung durch ACh hemmt.

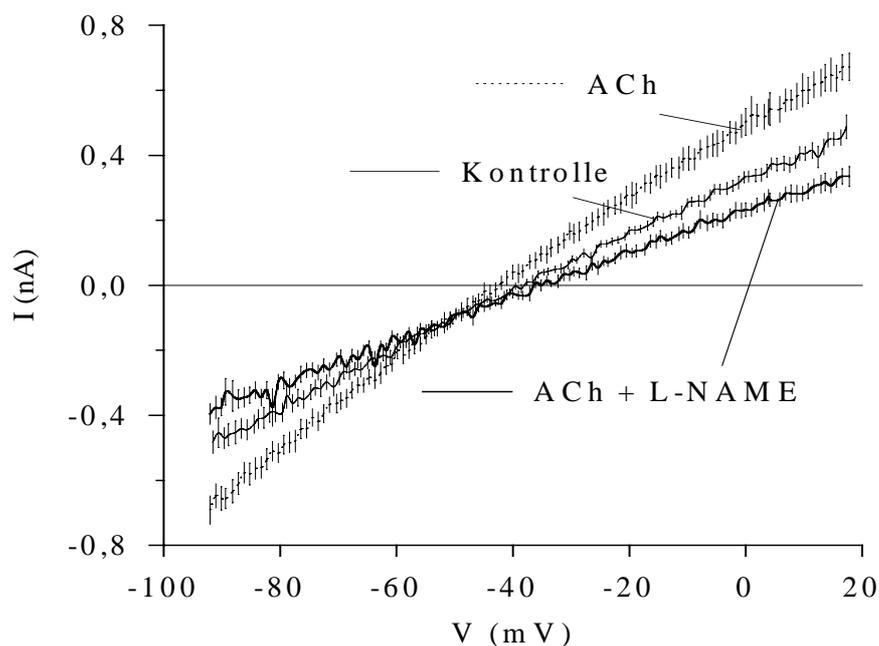


Abbildung 6: Effekt von ACh und L-NAME auf den Membranstrom glatter Gefäßmuskelzellen (1). Dargestellt sind mittlere Ströme (Mittelwerte \pm Standardfehler), die durch Spannungsrampen im Bereich zwischen -90 mV und $+20$ mV ausgelöst wurden; nähere Erläuterungen im Text.

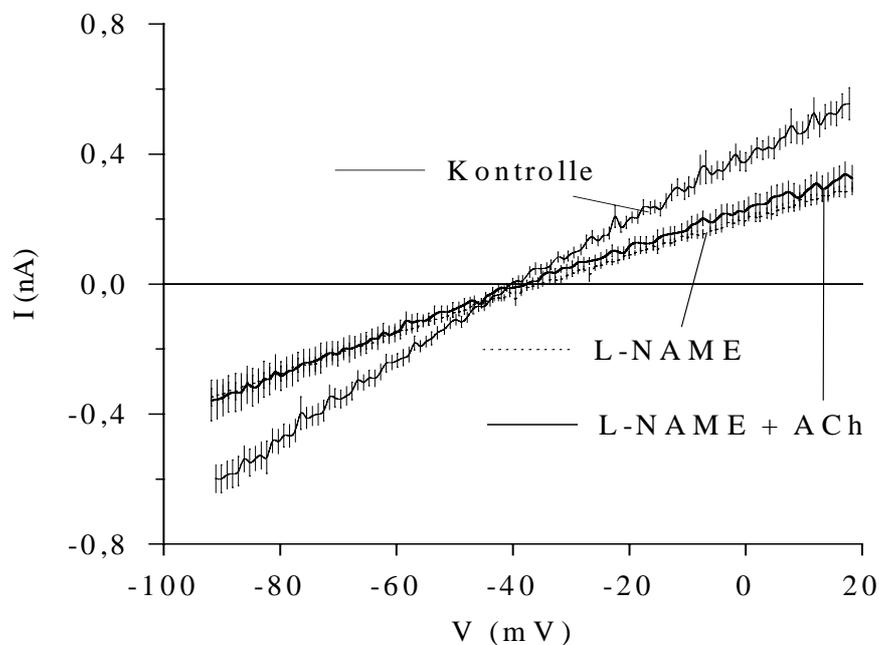


Abbildung 7: Effekt von L-NAME und ACh auf den Membranstrom glatter Gefäßmuskelzellen (2).

3.3.2. Beteiligung der löslichen Guanylatzyklase

Es ist bekannt, dass vom Endothel freigesetztes NO zahlreiche Effekte zur Folge hat, die über die Stimulation der löslichen Guanylatzyklase vermittelt werden. Blockiert man dieses Enzym, sollten die Ionenströme der glatten Muskelzelle beeinflusst werden. In drei Versuchen wurden die mit Blockierung der löslichen Guanylatzyklase durch Methylenblau (MB; (Ignarro, Harbison, Wood, Wolin, McNamara, Hyman & Kadowitz, 1985; Bracamonte et al., 1999) verbundenen Änderungen der Ionenströme in den Gefäßmuskelzellen untersucht. MB (Abb. 8, **MB**) verkleinerte im Vergleich zum Kontrollstrom (**Kontrolle**) den mittleren Strom nach rampenförmiger Depolarisation (die Kurve wird flacher) und verschob das Umkehrpotenzial in positive Richtung. Die Erhöhung der Leitfähigkeit durch nachfolgende ACh-Einwirkung auf das Gefäßendothel (**MB+ACh**) wurde jedoch durch MB nicht blockiert. In Abb. 8 sind die mittleren Ströme aus 13 bis 18 Messungen in 3 Präparaten dargestellt.

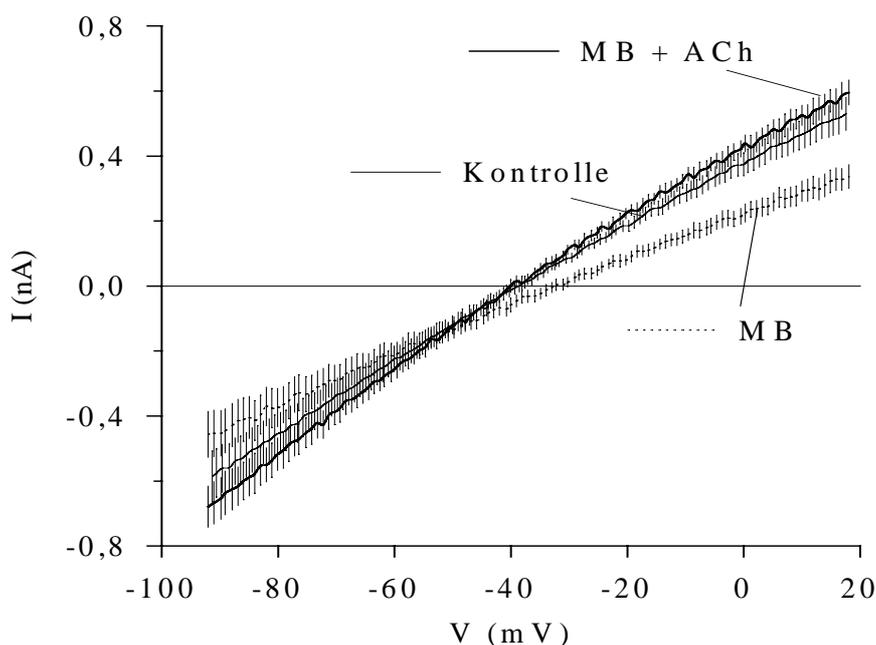


Abbildung 8: Auswirkung der Blockierung der löslichen Guanylatzyklase durch MB auf die endothelabhängige Strominduktion an glatten Gefäßmuskelzellen.

3.3.3. Statistik (1)

In den Abb. 9 und 10 sind die Resultate der Strommessungen an kleinen Mesenterialarterien der Ratte mit intaktem Endothel zusammengefasst. Abb. 9 zeigt die Veränderungen

des Membranpotenzials der Muskelzellen nach Applikation der entsprechenden Substanzen, Abb. 10 stellt die Veränderung des Anstieges der Stromrampen zwischen -60 und -20 mV als Maß für die Änderung der Membranleitfähigkeit dar. Das Membranpotenzial V_m wurde jeweils im Stromklammermodus 1 bis 3 Sekunden vor Durchlaufen der Spannungsrampen bestimmt. Die intravasale Gabe von ACh (**ACh**) erhöhte die Leitfähigkeit g der glatten Muskelzelle signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (**Kontrolle**). Diese Leitfähigkeitserhöhung wurde von einer Hyperpolarisation der Zellmembran begleitet. Die Blockierung der Synthese von NO oder der löslichen Guanylatzyklase führten zu einer Verminderung der Leitfähigkeit und zur Depolarisation der Zellmembran. Die stimulierende Wirkung von ACh auf die Leitfähigkeit und das Membranpotenzial wurde durch Blockierung der NO-Synthase, aber nicht durch die Hemmung der löslichen Guanylatzyklase aufgehoben. Die Leitfähigkeit nach Gabe von ACh und MB (**ACh + MB**) unterschied sich nicht signifikant von der Kontrollleitfähigkeit. **MB**, **L-NAME** und auch L-NAME in Verbindung mit ACh (**L-NAME + ACh**) verkleinerten signifikant, **ACh** allein vergrößerte das Membranpotenzial V_m der glatten Gefäßmuskelzellen im Vergleich zu Kontrollmessungen (**Kontrolle**). Es wurden 10-58 Einstiche aus 3-9 Präparaten mit intaktem Endothel ausgewertet.

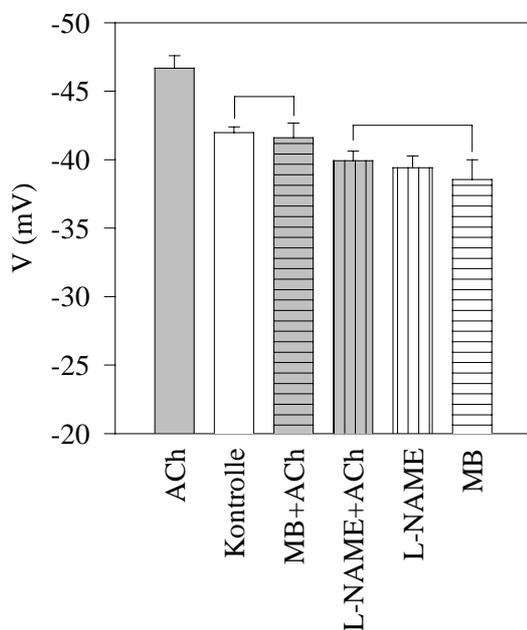


Abbildung 9: Wirkung verschiedener Effektoren auf das Membranpotenzial von Gefäßmuskelzellen an Mesenterialarterien bei intaktem Endothel.

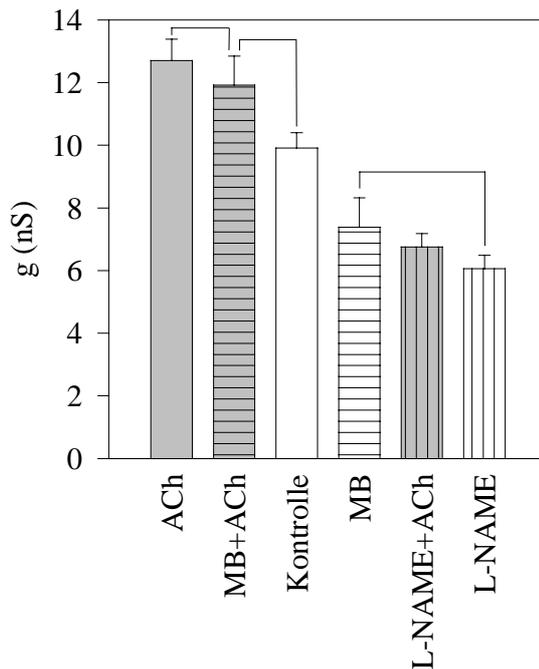


Abbildung 10: Wirkung verschiedener Effektoren auf die Leitfähigkeit von Gefäßmuskelzellen an Mesenterialarterien bei intaktem Endothel.

3.4. Experimente an Mesenterialarterien bei entferntem Endothel

3.4.1. Simulation der ACh-Wirkung durch SNP - Wirkung von K^+ -Kanalblockern

Ausgehend von den Experimenten bei intaktem Gefäßendothel kann man folgern, dass die Stimulation der Ionenströme durch intravasales ACh in glatten Gefäßmuskelzellen durch NO vermittelt wird. Das Umkehrpotenzial der induzierten Ströme im Bereich um -50 mV und die Ergebnisse bei ständiger Blockierung von Cl^- -Strömen durch DIDS unter allen experimentellen Bedingungen in den Präparaten weisen auf K^+ -Ströme hin, die durch NO stimuliert werden. Um zu analysieren, ob und welche K^+ -Ströme beteiligt sind, wurden verschiedene K^+ -Kanalblocker verwendet. Eingesetzt wurden Glibenclamid (Glib), ein in der verwendeten Konzentration hochspezifischer Blocker der ATP-abhängigen K^+ -Kanäle, sowie Charybdotoxin (CTX), ein ebenso spezifischer Blocker Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle (Kuriyama et al., 1995; Nelson & Quayle, 1995; Miura, Liu & Gutterman, 1999). Die Anwendung dieser Substanzen kann aber auch Ionenströme im Endothel beeinflussen. Durch Zerstörung oder zumindest starke Schädigung des Endothels durch intravasale Perfusion einer Luftblase, der damit verbundenen Unterdrückung der endogenen NO-Freisetzung und nachfolgender geziel-

ter Simulation der NO-Wirkung durch Nitroprussid-Natrium (SNP, Kuriyama et al., 1995; Feelisch, 1998) lässt sich das Präparat vereinfachen und der Einfluss der Kanalblocker auf das Endothel herabsetzen.

In Abb. 11 ist zunächst der mittlere Rampenstrom dargestellt (Abb. 11, **Kontrolle**). Wie in den Experimenten an Gefäßen mit intaktem Endothel zeigt dieser Strom eine leichte Einwärtsgleichrichtung. Durch nun folgende intravasale Gabe von SNP (Abb. 11, **SNP**) wurde im Vergleich zur Kontrollmessung die Leitfähigkeit der geklemmten Muskelzellen signifikant erhöht und die Zellmembran wurde leicht hyperpolarisiert (Statistik s. Abb.18 bzw. 19). Der Schnittpunkt des Kontrollstromes und des Stromes nach SNP liegt im Bereich von -55 mV, also in der Nähe des Umkehrpotenzials des ACh-induzierten und des L-NAME-blockierten Stromes aus den Versuchen bei intaktem Endothel. SNP ist also in der Lage, den Effekt von ACh in Präparaten mit zerstörtem Endothel nachzuahmen.

Die intravasale Einwirkung von CTX erniedrigte die Membranleitfähigkeit unter den Wert des Kontrollstromes. Die Zellmembran wurde stark depolarisiert (Abb. 11, **SNP+CTX**). Somit stimuliert SNP einen hyperpolarisierenden Strom, CTX blockiert diesen Strom. Dargestellt sind die Mittelwerte von 12 bis 26 Messungen bei 4 Präparaten.

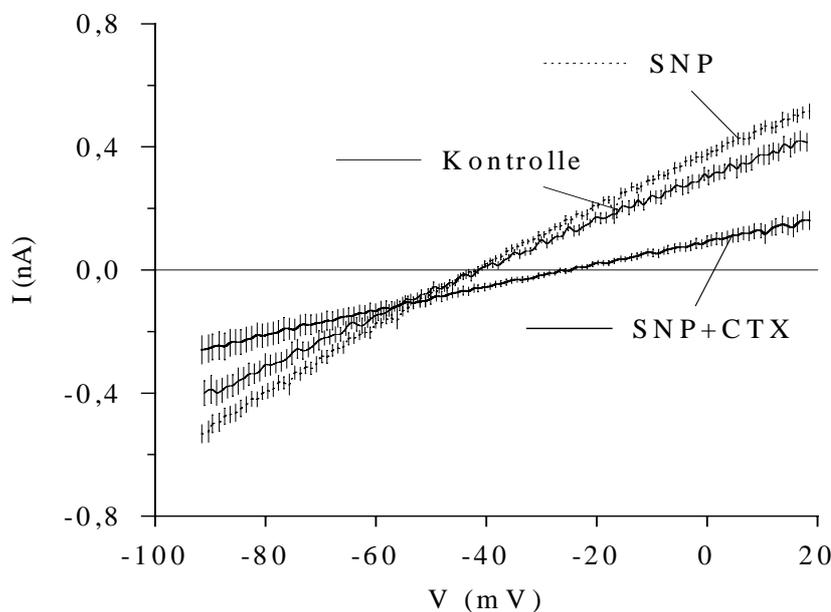


Abbildung 11: Effekt von CTX auf NA- und SNP- induzierte Ströme in glatten Gefäßmuskelzellen an Mesenterialarterien ohne Endothel (1).

Abb. 12 zeigt wieder den gemittelten Strom nach rampenförmiger Depolarisation glatter Muskelzellen unter Kontrollbedingungen (Abb. 12, **Kontrolle**). Intravasale Gabe von CTX

erniedrigte die Leitfähigkeit und depolarisierte die Muskelzellen (**CTX**). Der spätere intravasale Zusatz von SNP (**CTX+SNP**) erhöhte dann die Leitfähigkeit der Muskelzellen und hyperpolarisierte wieder auf die Werte bei der Kontrollstrommessung. CTX blockierte somit die Strominduzierung durch SNP nicht. Das Umkehrpotenzial des CTX-blockierten und des SNP-induzierten Stromes lag bei etwa -50 mV. Dieser Wert liegt damit auch hier im Bereich des Umkehrpotenzials des ACh-induzierten und des L-NAME- geblockten Stromes in den Experimenten an Arterien mit intaktem Endothel. Die gemittelten Ströme entsprechen 12 bis 26 Einstichen in 4 Präparaten.

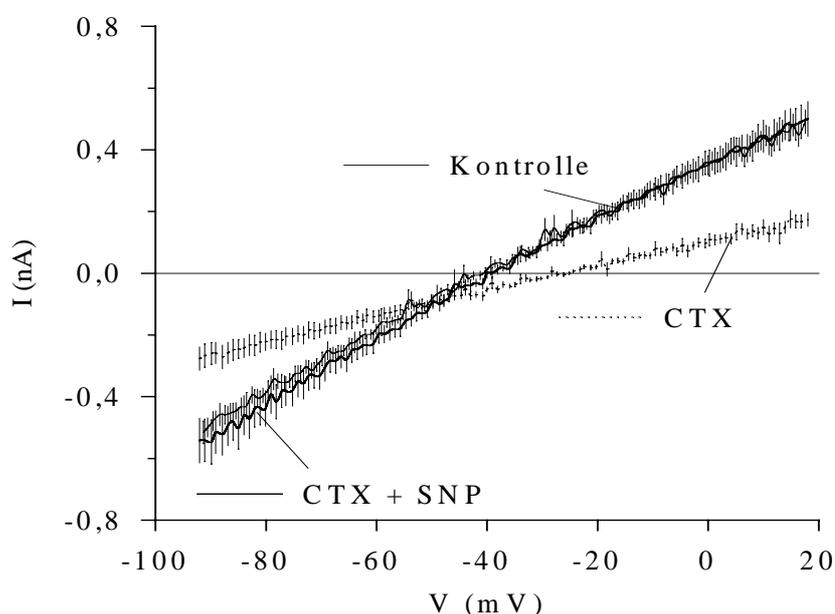


Abbildung 12: Wirkung von CTX auf NA- und SNP- induzierte Ströme in glatten Muskelzellen an Arterien ohne Endothel (2).

Der Effekt des Blockers der ATP-abhängigen K^+ -Kanäle, Glib, wird in den Abb. 13 und 14 verdeutlicht. Er ist ähnlich der Wirkung von CTX. Die primäre Gabe von SNP führte zu einem Anstieg in der Leitfähigkeit und zu geringfügiger Hyperpolarisation (Abb. 13, **SNP**). Nachfolgende zusätzliche Glib-Innenperfusion (**SNP+Glib**) reduzierte wiederum stark die mittlere Leitfähigkeit der Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Die drei mittleren Ströme schneiden sich bei etwa -42 mV. SNP stimulierte und Glib blockierte hier hyperpolarisierende Ströme. Es erfolgte eine Mittelung der Werte von 11 bis 21 Einstichen in 3 Gefäßen.

Wird nach Registrierung des Kontrollstromes zuerst Glib intravasal perfundiert, ist eine Reduktion der Leitfähigkeit zu beobachten. Dies war mit einer Depolarisation des Mem-

branpotenzials verbunden (Abb. 14, **Glib**). Anschließende Applikation von SNP zusammen mit Glib (**Glib+SNP**) kehrte diesen Effekt um, d. h., Leitfähigkeit und Membranpotenzial erreichten in etwa wieder die Kontrollwerte (**Kontrolle**) bei Versuchsbeginn. Somit blockierte Glib die Strominduzierung durch SNP nicht. Die drei mittleren Ströme haben bei ungefähr -45 mV ihren Schnittpunkt. Es wurde das Mittel aus 11 bis 21 Messungen an 4 Präparaten ohne Endothel gebildet.

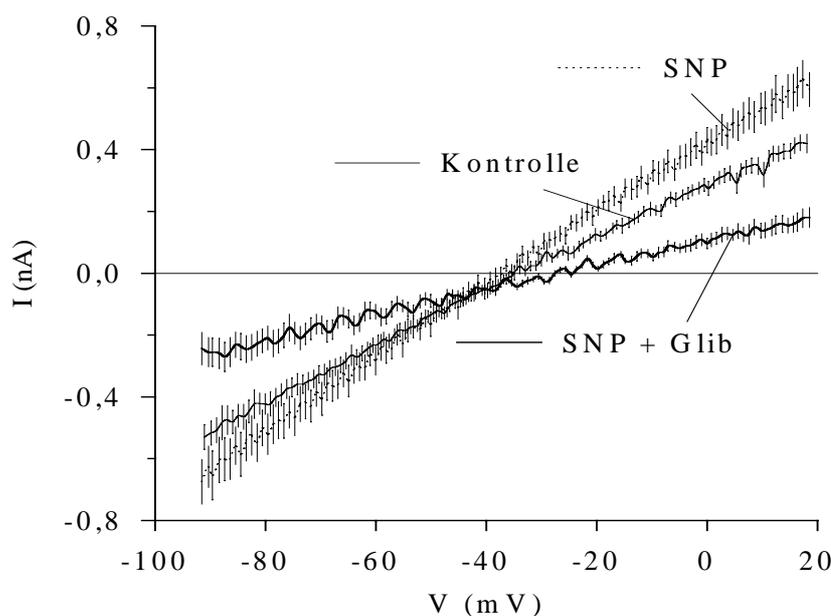


Abbildung 13: Effekt von Glib auf NA- und SNP-induzierte Ströme in Präparaten ohne Endothel (1).

Weiterhin wurde der kombinierte Einfluss von Glib und CTX (**CTX+Glib**, Abb. 15) untersucht. Beide K^+ -Kanalblocker zusammen führten zur deutlichsten Verminderung der Leitfähigkeit und zur größten Depolarisation. Die Erhöhung der Leitfähigkeit und die Hyperpolarisation durch intravasal appliziertes SNP (**CTX+Glib+SNP**) waren nun blockiert. Der durch Glib und CTX blockierte Strom hatte sein Umkehrpotenzial bei etwa -45 mV. Hier wurden 14 bis 21 Einstiche aus 3 Arterien mit entferntem Endothel ausgewertet.

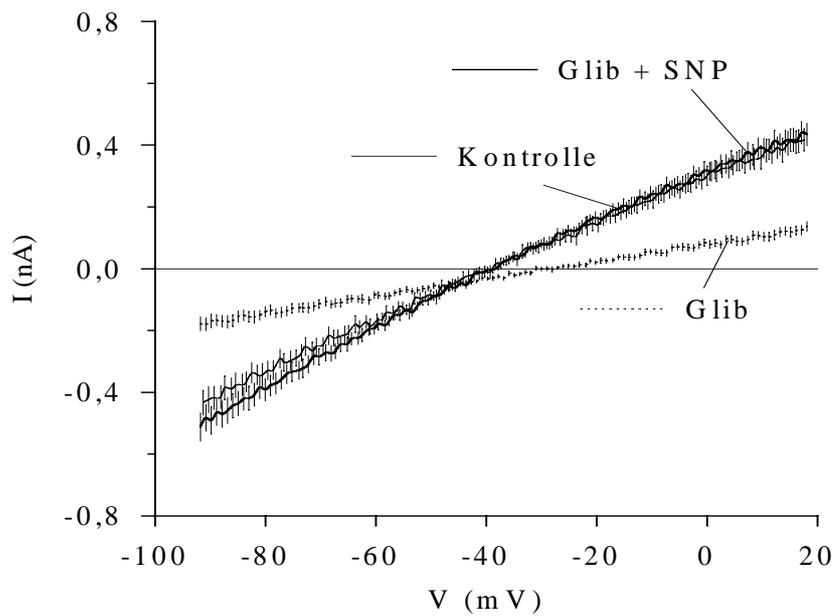


Abbildung 14: Effekt von Glib auf NA- und SNP-induzierte Ströme in Präparaten ohne Endothel (2).

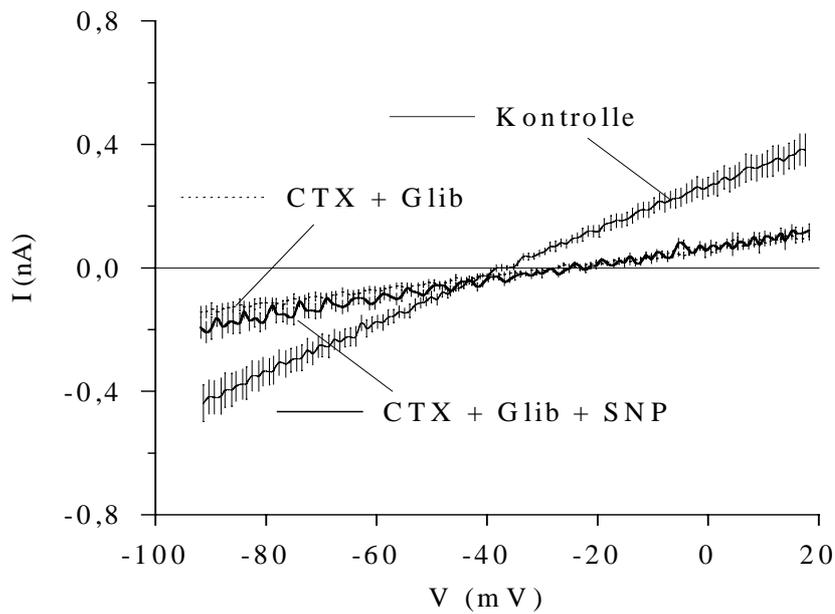


Abbildung 15: Kombinierte Wirkung von Glib und CTX auf NA- und SNP-induzierte Ströme in Muskelzellen aus Arterien ohne Endothel.

3.4.2. Variation der extrazellulären K^+ -Konzentration

Die Ergebnisse der Versuche, die in den Abb. 12, 14 und 15 vorgestellt wurden, weisen darauf hin, dass die Applikation von SNP zur Öffnung von K^+ -Kanälen in der Membran der glatten Gefäßmuskelzellen führen kann. Diese Vermutung bestätigte sich durch den Befund, dass das Umkehrpotenzial des SNP-induzierten Stromes eine starke Abhängigkeit von der extrazellulären K^+ -Konzentration aufwies. Dazu wurden in 3 bis 5 Präparaten mit entferntem Endothel 8 bis 15 Einstiche unter Kontrollbedingungen bzw. nach intravasaler Gabe von SNP ausgewertet (die Versuchsdurchführung entsprach dem Protokoll entsprechend Abb. 13, Stromkurven **Kontrolle** und **SNP**). Das Umkehrpotenzial des SNP-induzierten Stromes wurde dabei als Kreuzungspunkt der mittleren Ströme unter Kontrolle bzw. unter SNP-Wirkung bestimmt.

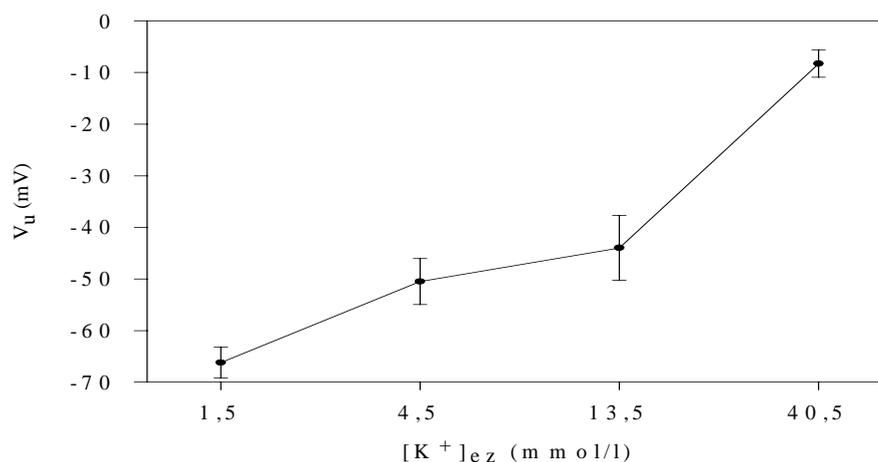


Abbildung 16: Abhängigkeit des Umkehrpotenzials V_u des SNP-induzierten Stromes von der extrazellulären K^+ -Konzentration $[K^+]_{ez}$

3.4.3. Beteiligung der löslichen Guanylatzyklase

Der Einfluss der löslichen Guanylatzyklase bei der Stimulation von Ionenströmen in glatten Muskelzellen wurde ebenfalls an den Präparaten mit zerstörtem Endothel untersucht, indem dieses Enzym durch MB blockiert wurde. Ausgehend von Kontrollbedingungen (Abb. 17, **Kontrolle**), depolarisierte MB (**MB**) die Muskelzellen durch Reduzierung eines hyperpolarisierenden Stromes. Das Ansteigen der Leitfähigkeit und die Hyperpolarisation der Membran durch nachfolgende intravasale Anwendung von SNP (**MB+SNP**) wurden dagegen

durch MB nicht blockiert. Die Stromamplitude blieb allerdings unter der des Kontrollstromes. Der MB-blockierte als auch der anschließend durch SNP hervorgerufene Strom kehrte bei ungefähr -45 mV um. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 12 bis 17 Einstichen in 3 Präparaten.

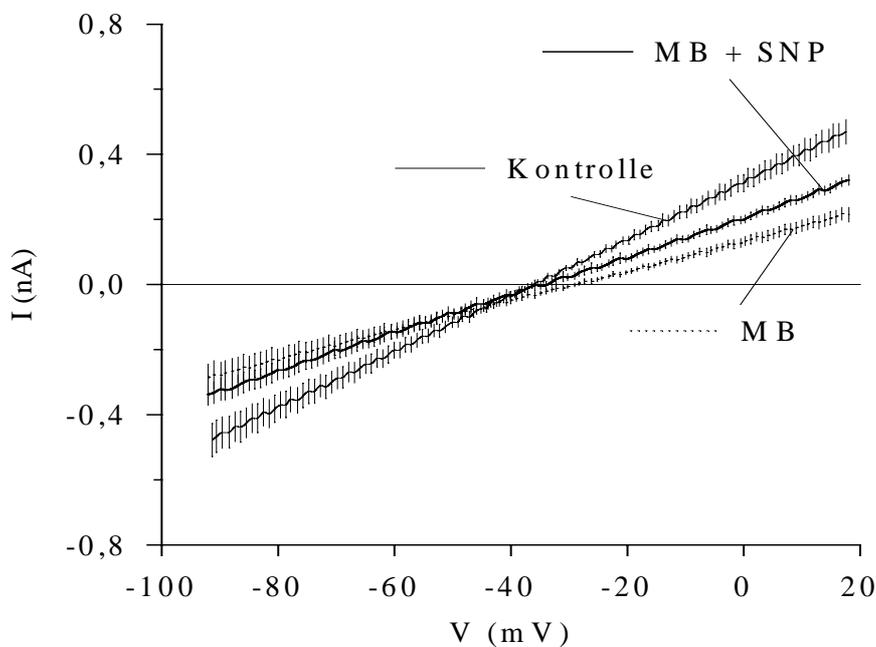


Abbildung 17: Effekt von MB auf die SNP-abhängige Strominduktion

3.4.4. Statistik (2)

Die statistische Auswertung der Versuche an den Arterien mit entferntem Endothel zeigen die Abb. 18 und 19. Eine signifikante Änderung der Leitfähigkeit g der Muskelzellen zwischen -60 und -20 mV unter den experimentellen Bedingungen entsprechend der Abb. 11 bis 15 sowie 17 ist in den meisten Fällen mit einer signifikanten Veränderung des Membranpotenzials V verbunden. Es wurden hier die Mittelwerte aus 14 bis 96 Messungen in 3 bis 22 Gefäßen zusammengefasst.

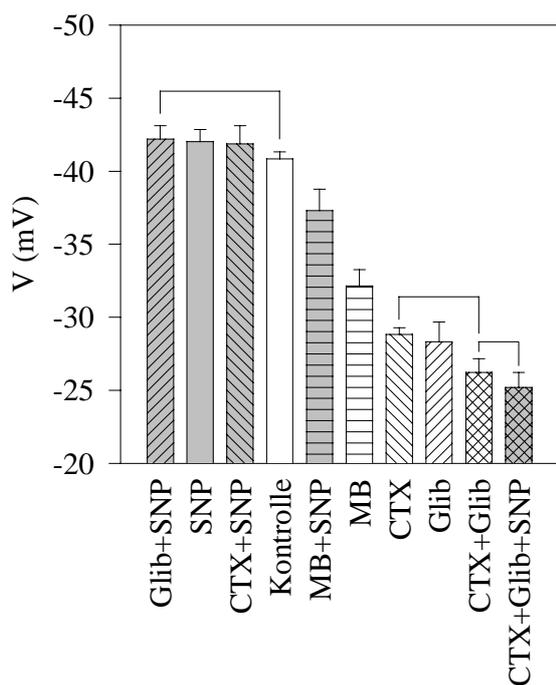


Abbildung 18: Charakteristik des SNP-induzierten Membranstromes in glatten Gefäßmuskelzellen an Arterien ohne Endothel - Statistik des Membranpotenzials.

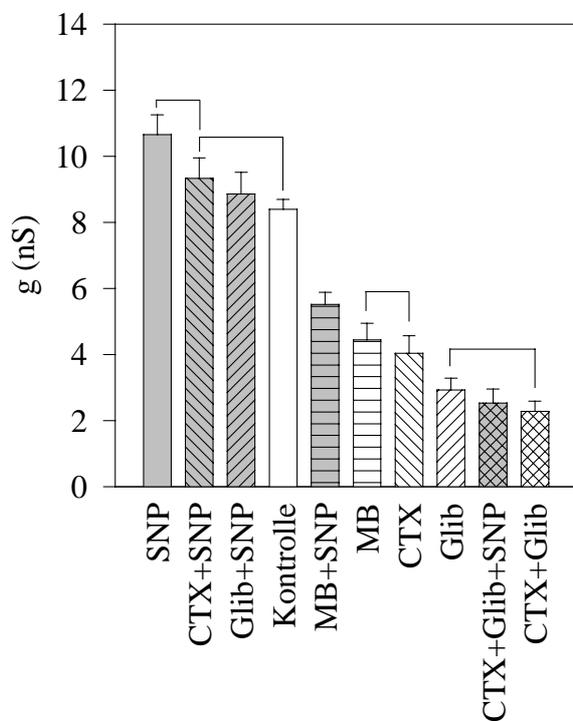


Abbildung 19: Charakteristik des SNP-induzierten Membranstromes in glatten Gefäßmuskelzellen an Arterien ohne Endothel - Statistik der Leitfähigkeiten.

4. Diskussion

4.1. Experimentelle Rahmenbedingungen

In dieser Arbeit wurden Ionenströme in glatten Gefäßmuskelzellen kleiner Mesenterialarterien der Ratte untersucht. Dabei sollte geklärt werden, welcher Mechanismus der ACh-induzierten endothelabhängigen Hyperpolarisation in intakten Präparaten zugrunde liegt. Definierter Ausgangspunkt der Experimente war immer die Vorkontraktion der Mesenterialarterien. Dazu wurde der Standardversuchslösung 1 $\mu\text{mol/l}$ Noradrenalin zugefügt. Die Lösung enthielt weiterhin 10 $\mu\text{mol/l}$ Indomethacin, um die Zyklusoxigenase-Produktion zu unterdrücken. Um sich auf K^+ -Ströme zu konzentrieren, wurden Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Ströme, die ebenfalls zu ACh-induzierten Änderungen des Membranpotenzials beitragen können (Cohen & Vanhoutte, 1995), direkt durch DIDS und indirekt durch Nisoldipin blockiert. Nisoldipin als Blocker des Ca^{2+} -Einstromes über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle verminderte die kontraktile Gefäßreaktionen auf die getesteten Substanzen. Somit wurden kontraktionsbedingte Veränderungen des intravasalen Druckes und der Wandspannung vermindert und so das elektrophysiologische Verhalten der Gefäßmuskelzellen stabilisiert. Eine Stimulation des Endothels durch Änderung von Flußgeschwindigkeit, Wandspannung oder Scherwirkung der variierten Strömung blieb damit weitgehend aus. Andere experimentelle Randbedingungen (Sauerstoffpartialdruck, isotonische Verhältnisse, Fluss der Innenlösung durch das Gefäß, Gefäßinnendruck) wurden so physiologisch wie möglich gestaltet.

4.2. Passives elektrisches Verhalten

Zur Untersuchung passiver elektrischer Eigenschaften von glatten Muskelzellen großer Gefäße wurden in anderen Arbeitsgruppen zahlreiche Experimente durchgeführt, in denen extrazellulär in einem abgegrenzten Teil des Gefäßes Strom appliziert wurde. Die glatten Muskelzellen zeigten in diesen Fällen kabelähnliche elektrische Eigenschaften. Das Potenzial fiel monoexponentiell mit der Zeit und dem Abstand vom Ort der Stromstimulation. Längskonstanten von etwa 0,4 bis 2,4 mm und Zeitkonstanten von 60 bis 450 ms wurden gemessen (Mekata, 1974, 1980, 1984, 1986; Casteels, Kitamura, Kuriyama & Suzuki, 1977; Ito, Kitamura & Kuriyama, 1980; Kajiwara, 1982; Surprenant, Neild & Holman, 1987). Ähnliche Befunde ermittelte man in *Taenia coli* und *Vas deferens* des Meerschweinchens (Tomita, 1966; Abe & Tomita, 1968). Wird ein Strom dagegen intrazellulär über Mikroelektroden appliziert,

sind die Zeitkonstanten der Spannungsbeziehungen meistens sehr viel kürzer. Sie liegen im Bereich zwischen 1,5 und 30 ms. Diese kurzen Zeitkonstanten lassen sich verstehen, wenn man eine dreidimensionale Stromausbreitung über elektrische Verbindungen zwischen den einzelnen glatten Muskelzellen annimmt (Tomita, 1966, 1967, 1975; Mekata, 1980; Surprenant et al., 1987). Wenn sich glatte Muskelzellen wie ein elektrisches Synzytium verhalten, wird der durch Mikroelektroden gemessene Eingangswiderstand durch den Innenwiderstand der Zellen und den Widerstand zwischen den elektrisch gekoppelten Zellen („gap junctions“) bestimmt. Er ist dabei äußerst unempfindlich gegen Änderungen des Membranwiderstandes. Die Mikroelektroden-Technik erlaubt in diesem Fall keine Rückschlüsse auf die Beteiligung von Membranströmen an der Regulation des Gefäßtonus‘ (Jack, Noble & Tsien, 1975; Tomita, 1975).

In der vorliegenden Arbeit wurden kurze Zeitkonstanten von etwa 1,7 ms ermittelt. Zahlreiche an dieser Stelle zusammengefasste Befunde sprechen jedoch gegen eine elektrische Kopplung zwischen den glatten Gefäßmuskelzellen der Mesenterialarterien der Ratte:

(1) Der Eingangswiderstand R_E (mit $R_E=1/g$) änderte sich von etwa 120 M Ω unter Kontrollbedingungen (in Präparaten ohne Endothel) auf 440 M Ω nach Applikation der bekannten K^+ -Kanalblocker auf die Muskelzellmembran (Abb. 4C und 18 bzw. 19). R_E veränderte sich somit abhängig vom Membranwiderstand, der durch Blockierung membranständiger K^+ -Kanäle modifiziert wurde.

(2) Unter Kontrollbedingungen (und auch bei Versuchen ohne Blockade von Ca^{2+} - und Cl^- -Strömen) ist der Eingangswiderstand R_E mit etwa 120 M Ω deutlich größer als in Präparaten mit angeblich dreidimensionaler Stromausbreitung (R_E von 5 bis 40 M Ω ; Surprenant et al., 1987; Mekata, 1974, 1980). Kleine Werte für R_E entsprechen der Theorie des elektrophysiologischen Verhaltens von Zellsynzytien und geben einen Hinweis darauf, dass die Zellmembranen untereinander elektrisch verbunden sind (Jack et al., 1975; Tomita, 1975). In Einzelzellen aus Gefäßpräparaten wurde durch Anwendung kleiner hyperpolarisierender Spannungssprünge Eingangswiderstände zwischen 300 und 15.000 M Ω gemessen (Hume & Leblanc, 1989; Wilde & Lee, 1989; Stockbridge, Zhang & Weir, 1992). Bei Membranpotenzialen, die positiver als -20 mV waren, zeigen die meisten Einzelzellen jedoch eine deutliche Auswärtsgleichrichtung mit einem Abfall des Widerstandes auf ungefähr 100 bis 250 M Ω (Yatani, Seidel, Allen & Brown, 1987; Akbarali, Wyse & Giles, 1992; Gordienko, Clausen & Goligorsky, 1994; Halliday, Aaronson, Evans & Gurney, 1995). Diese Werte liegen im

Bereich der vorliegenden Messungen. Über die Ursachen des großen Einwärtsstromes in den vorliegenden Experimenten kann man spekulieren:

(a) Die auftretenden Leckströme sind bei einem Einstich in die Zelle gewöhnlich größer als die Leckströme in Ganzzell-Strommessungen (tight seal whole cell) an Einzelzellen.

(b) Im Gegensatz zu den vorliegenden Experimenten werden Messungen an Einzelzellen oft bei Raumtemperatur durchgeführt. Die niedrigere Temperatur kann die Membranleitfähigkeit absenken.

(c) Einzelzellmessungen werden meist mit EGTA-gepuffertter Intrazellulärlösung durchgeführt. Die Öffnungswahrscheinlichkeit für Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle kann dadurch verringert sein. In den Präparaten dieser Arbeit wurde andererseits die Eingangsleitfähigkeit durch CTX signifikant verkleinert.

(d) Der Beitrag von ATP-abhängigen K^+ -Strömen zur Leitfähigkeit scheint in Einzelzellen klein zu sein, besonders dann, wenn die Intrazellulärlösung frei von Nukleosiddiphosphaten ist und mit ATP-Konzentrationen von 1 mmol/l oder mehr gearbeitet wird (Zhang & Bolton, 1995). In den vorliegenden Experimenten dagegen wurde die Eingangsleitfähigkeit durch Glib stark reduziert.

(e) Weitere Unterschiede in den experimentellen Bedingungen dieser Arbeit im Vergleich zu Messungen an Einzelzellen können zu einem kleineren Membranwiderstand beitragen. Dazu gehören der Sauerstoffpartialdruck von 20 mmHg, der intravasale hydrostatische Druck, die Wandspannung des Gefäßes und die permanente Anwesenheit von NA während der gesamten Versuchszeit.

(3) Der Zeitverlauf des Potentials nach Applikation eines Strompulses war eindeutig mono-exponentiell und linear abhängig vom Eingangswiderstand R_E . Diese beiden Fakten sprechen dagegen, dass sich das Präparat wie ein elektrisches Synzytium verhält. Dort müsste man die Spannungsantwort auf einen injizierten Strompuls durch die Summe zweier Fehlerfunktionen (Jack et al., 1975), bzw. vereinfachend zweier Exponentialfunktionen (Tomita, 1975) beschreiben. Tatsächlich fanden Hirst & Neild (1978) in Arteriolen der Submucosa von Meer-schweinchen zwei Phasen des Abfalls des elektrotonischen Potentials mit einem exponentiellen Zeitverlauf der langsamen Komponente.

(4) Zwischen den untersuchten Muskelzellen (Abschnitt 3.2.) lässt sich bis zu einem (Mindest-) Abstand von 100 bis 150 μm keine elektrotonische Membranpotentialübertragung nachweisen.

(5) Der gemessene niedrige Wert für die mittlere Eingangskapazität von etwa 12,3 pF weist ebenfalls darauf hin, dass hier nur jeweils eine Zelle der Spannungs- bzw. Stromklemme unterliegt. Der Wert liegt im Bereich der Messungen anderer Autoren. Holman, Neild und Lang (1990) ermittelten beispielsweise für Einzelzellen Kapazitäten zwischen 10 und 100 pF, Halliday et al. (1995) $19 \pm 0,3$ pF und Holland, Langton, Standen und Boyle (1996) 16,3 pF. Weiterhin spricht die geringe Streuung in den Messwerten für die Zellkapazität gegen eine elektrische Kopplung der Zellen.

Die in der präsentierten Arbeit ermittelten passiven elektrischen Eigenschaften deuten darauf hin, dass der kleine Eingangswiderstand in den Präparaten durch einen kleinen Membranwiderstand der einzelnen glatten Gefäßmuskelzellen verursacht wird. Die glatten Muskelzellen in den untersuchten Arterien sind elektrisch nicht gekoppelt. Unklar ist jedoch, warum dieser Unterschied im Vergleich zu vielen anderen Arterien-Präparaten (z. B. Yamamoto, Imaeda & Suzuki, 1999) besteht. Einmal können die voneinander abweichenden Versuchsbedingungen eine Rolle spielen. Andererseits wurden solch kurze Zeitkonstanten beim Potenzialabbau (2 bis 5 ms) sowie hohe Eingangswiderstände von etwa $180 \text{ M}\Omega$ auch von anderen Autoren beobachtet, zum Beispiel in Einstichen an Arterien vom Hund (Mekata, 1980).

Wenn auch die Muskelzellen der untersuchten Präparate elektrisch nicht gekoppelt sind, kann man trotzdem Inhomogenitäten im Spannungsklemmverhalten der untersuchten Zellen nicht ganz ausschließen. Die Ein-Mikroelektroden-Spannungsklemm-Technik erlaubt aber dennoch auf jeden Fall, qualitative Aussagen über Veränderungen des Membranpotenzials der Gefäßmuskelzellen und deren Ursachen zu treffen und eine quantitative Abschätzung de- oder hyperpolarisierender Ströme als eine Ursache von Membranpotenzialveränderungen vorzunehmen.

4.3. Wirkung von ACh

Der hyperpolarisierende Effekt von ACh auf das Membranpotenzial von Muskelzellen aus Mesenterialarterien der Ratte entstand durch Aktivierung eines hyperpolarisierenden Stromes. Dabei wurde das Umkehrpotenzial dieses ACh-induzierten Stromes bei etwa -55 mV gefunden. Auch die Umkehrpotenziale des SNP-induzierten Stromes und der Ströme, die durch L-NAME, MB, CTX und Glib blockiert wurden, liegen in diesem Bereich von -45 bis -55 mV. Man kann daraus folgern, dass es sich bei diesen Strömen um K^+ -Ströme handelt. Diese Schlussfolgerung wird durch den Befund unterstützt, dass das Umkehrpotenzial des SNP-induzierten Stromes von der extrazellulären K^+ -Konzentration abhängt. Die große

Streuung in den Umkehrpotenzialwerten ist auf das Unvermögen der Ein-Mikroelektroden-Methode zurückzuführen, die Ströme vollständig zu isolieren. Das theoretische Umkehrpotenzial für K^+ -Ströme würde man negativer als -70 mV erwarten (Nelson & Quayle, 1995). Den Grund für die Abweichung kann man sicher nicht darin suchen, dass ACh zusätzlich andere Ströme aktiviert, deren Umkehrpotenzial positiver als -40 mV liegt, wie Cl^- -Ströme, unspezifische Kationenströme oder Leckströme. Es könnte z. B. auch ein Schließen von Cl^- -Kanälen die beobachtete Verminderung der Hyperpolarisation erklären, solange das Umkehrpotenzial für Cl^- -Ionen positiver als das für K^+ -Ionen und positiver als das Ruhemembranpotenzial ist. Um das Umkehrpotenzial immer zu positiven Werten zu verschieben, müssten diese Ströme dann dasselbe pharmakologische Verhalten wie die oben angenommenen K^+ -Ströme zeigen. Das ist nicht zu erwarten. Große Fehler bei der Messung des Membranpotenzials der glatten Muskelzellen können ebenfalls nicht für das relativ positive Umkehrpotenzial der K^+ -Ströme verantwortlich sein. Das Membranpotenzial der untersuchten Muskelzellen der Mesenterialarterien betrug bei intra- und extravasaler Perfusion der Standardversuchslösung (kein NA, keine Kanal-Blocker) $-43,2 \pm 9,2$ mV (254 Zellen aus 30 Gefäßen). An Mesenterialarterien der Ratte, bei denen in anderen Experimenten vorrangig die Druckverhältnisse kontrolliert wurden, wurde ein ähnlicher Wert von $-49,7$ mV bestimmt (Schubert, Wesselman, Nilsson & Mulvany, 1996).

Eine weitere grundsätzliche Fehlerquelle, nämlich räumliche Inhomogenitäten bei der Spannungsklemm-Technik, kann man als Ursache für die gemessenen Umkehrpotenziale ebenso ausschließen. Wird das Potenzial einer Muskelzellmembran auf einen Wert negativer als deren Ruhemembranpotenzial geklemmt, nimmt dieses Potenzial beim Auftreten räumlicher Inhomogenitäten mit zunehmender Entfernung von der Mikroelektrode ab. Das Membranpotenzial ist an der Mikroelektrode (am Ort der Messung) also negativer als in entfernten Teilen der Membran. Das hätte zur Folge, dass der gemessene Einwärtsstrom (als Summe der Ströme in den verschiedenen Bereichen der Zellmembran) kleiner wäre als beim Vorliegen einer homogenen Klemme. Die reale Strom-Spannungs-Beziehung wäre also steiler als die mit Mikroelektrode gemessene Strom-Spannungs-Kurve. Die Abweichung wächst dabei mit abnehmender Längskonstante der geklemmten Muskelzelle, also bei zunehmender Membranleitfähigkeit. Im Ergebnis würde sich der reale Kreuzungspunkt zweier Strom-Spannungs-Kennlinien zu positiveren Potenzialwerten verschieben, d. h. der gemessene (falsche) Wert liegt bei negativeren Potenzialen.

Für das positive Umkehrpotenzial der angenommenen K^+ -Ströme ist ein reduzierter K^+ -Konzentrationsgradient zwischen Intra- und Extrazellularseite der Muskelzellmembran

eine mögliche Erklärung. Der Konzentrationsgradient wird durch einen kontinuierlichen K^+ -Auswärtsstrom vermindert, der wiederum von einer anhaltenden Depolarisation aufgrund der Dehnung des Gefäßes und damit der glatten Muskelzellen sowie fortwährender Gabe von NA induziert wird (Schubert et al., 1996). Wird dieser K^+ -Strom nicht vollständig über die Na^+K^+ -ATPase kompensiert, verändert sich das Verhältnis von intra- und extrazellulärer K^+ -Konzentration. Für diese Theorie spricht die K^+ -Konzentrationsabhängigkeit des SNP-induzierten Stromes entsprechend Abb. 16. Die dort gezeigte Kurve weicht von einer sich theoretisch nach Nernst zu errechnenden, sehr viel steileren Gerade ab, die sich bei einer angenommenen intrazellulären K^+ -Ionenkonzentration von 120 mmol/l ergeben würde.

Die ACh-induzierte Hyperpolarisation der Zellmembran ist in der Pulmonalarterie der Ratte mit einer Erhöhung der Membranleitfähigkeit verbunden (Chen & Suzuki, 1989). Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von K^+ -Strömen bei der endothelabhängigen Hyperpolarisation ist die gleichzeitige Beobachtung eines erhöhten Rb^+ -Ausstromes in der Aorta der Ratte (Chen, Suzuki & Weston, 1988; Taylor, Southerton, Weston & Baker, 1988). Die mit der Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration einhergehende Reduzierung der endothelabhängigen Hyperpolarisation (Chen & Suzuki, 1989; Fujii, Tominaga, Ohmori, Kobayashi, Koga, Takata, & Fujishima, 1992; Plane & Garland, 1993; Parkington, Tonta, Coleman & Tare, 1995; Plane, Pearson & Garland, 1995) bestätigt die Rolle der K^+ -Kanäle bei der ACh-abhängigen Hyperpolarisation (Faraci & Heistad, 1998; Nishiyama et al., 1998).

4.4. Beteiligung von NO bei der Induktion eines hyperpolarisierenden Stromes

Die Verabreichung von NO-Synthase-Hemmern wie L-NAME reduzierte die Membranleitfähigkeit und depolarisierte die glatten Muskelzellen. Daraus lässt sich folgern, dass eine tonische Freisetzung von NO durch das Endothel für die Aufrechterhaltung der Aktivität eines hyperpolarisierenden Stromes verantwortlich ist. L-NAME blockierte auch die stimulierende Wirkung von ACh auf diesen hyperpolarisierenden Strom vollständig. NO ist also in den vorgestellten Experimenten der hyperpolarisierende Faktor nach Endothelstimulation durch ACh.

In anderen Präparaten ergab sich der Befund, dass speziell der transiente Bestandteil der endothelabhängigen Hyperpolarisation durch Antagonisten der NO-Synthese nicht beeinflusst, während die andauernde, tonische Komponente blockiert wurde (Nagao & Vanhoutte, 1992; Vanheel, Van de Voorde & Leusen, 1994; Parkington et al., 1995). Man kann nun vermuten, dass die transiente Komponente der endothelabhängigen Hyperpolarisation nicht

durch NO vermittelt wird und deshalb unabhängig von NO-Synthese-Hemmern ist (Garland et al., 1995). Der anhaltende Bestandteil der Hyperpolarisation kann indessen abhängig von NO sein.

In den vorgestellten Experimenten war es schwierig, langfristig stabile Einstiche in glatte Muskelzellen zu erhalten. Die Registrierung des Membranpotenzials erfolgte nicht so kontinuierlich, um zwischen phasischer und tonischer Komponente der endothelabhängigen Hyperpolarisation zu unterscheiden. Außerdem kann der jeweilige Anteil der einzelnen Komponenten in verschiedenen Präparaten variieren. In den vorliegenden Experimenten begannen die elektrophysiologischen Untersuchungen deshalb wenigstens 5 min nach der intravasalen Gabe von ACh bzw. anderer Substanzen. Daher wurde nur die tonische Komponente der endothelabhängigen Hyperpolarisation untersucht.

In einigen Gefäßpräparaten (z. B. Arteriolen, Daut et al., 1994; Félétou & Vanhoutte, 1999) wird die endothelabhängige Hyperpolarisation durch eine ACh-induzierte Hyperpolarisation des Gefäßendothels verursacht. Die Hyperpolarisation wird dort vom Endothel auf die unterliegende Muskelzellschicht weitergeleitet, insbesondere weil es dort zwischen den beiden Zelltypen eine elektrische Kopplung gibt (Cohen & Vanhoutte, 1995). NO-Synthese-Hemmer haben keinen Effekt auf die ACh-induzierte Hyperpolarisation der Endothelzellen (Chen & Cheung, 1992). In den vorliegenden Experimenten blockierte dagegen L-NAME die ACh-abhängige Vergrößerung des hyperpolarisierenden Stromes. Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass in den untersuchten Präparaten die ACh-induzierte Hyperpolarisation im Endothel verursacht und dann auf die Muskelzellen übertragen wird.

Die Blockade der Ruheaktivität der löslichen Guanylatzyklase durch MB verkleinerte die Leitfähigkeit der Muskelzellen. Anhand des Umkehrpotenzials des MB-blockierten Stromes ist eine Ruhekonzentration von cGMP anzunehmen, die einen Teil der K^+ -Leitfähigkeit der Muskelzellen aufrechterhält. Untermauert wird dieses durch die Untersuchung einer cGMP-abhängigen Proteinkinase, die Ca^{2+} -abhängige K^+ -Ströme in glatten Muskelzellen aktiviert (Robertson, Schubert, Hescheler & Nelson, 1993; Archer, Huang, Hampl, Nelson, Shultz & Weir, 1994). MB verhinderte aber nicht die stimulierenden Effekte von ACh oder SNP auf die Membranleitfähigkeit. NO vermittelt folglich die tonische endothelabhängige Hyperpolarisation in den vorliegenden Untersuchungen. Dabei wirkt NO auch ohne Vermittlung von cGMP stimulierend auf K^+ -Ströme. Allerdings hält cGMP (eventuell über die Proteinkinase G) bestimmte K^+ -Kanäle offen.

Der fehlende Effekt von MB in den untersuchten Mesenterialarterien der Ratte steht im Widerspruch zu Befunden an Arterien aus dem Uterus von Meerschweinchen und in kulti-

vierten Zellen von Koronararterien des Schweins. Dort wurde die NO-induzierte Hyperpolarisation durch MB aufgehoben (Tare, Parkington, Coleman, Neild & Dusting, 1990; Miyoshi, Nakaya & Moritoki, 1994). Ähnlich den Ergebnissen dieser Arbeit (Abschnitt 3.4.3., Abb. 17) wurden aber in isolierten glatten Gefäßmuskelzellen von Pulmonalarterien der Ratte durch Ganzzelleableitungen K^+ -Ströme gefunden, deren Kontrollwert sich nicht von dem registrierten Strom bei gleichzeitiger Applikation von NO und MB unterschied (Archer et al., 1994). K^+ -Ströme nach alleiniger Gabe von MB wurden allerdings von Archer nicht untersucht. In der Thorax-Aorta von Kaninchen wurde gefunden, dass NO einzelne Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle aktiviert. Intrazelluläres cGMP war dabei nicht beteiligt. MB hemmte die NO-abhängige Relaxation von Ringen dieser Aorta nicht (Bolotina, Najibi, Palacino, Pagano & Cohen, 1994).

ACh stimuliert in Mesenterialarterien der Ratte die Bildung von NO. Die Blockierung der Aktivität der löslichen Guanylatzyklase führt zur Hemmung der cGMP-vermittelten Signalkette, jedoch wird die NO-Bildung selbst nicht beeinträchtigt. MB blockiert die ACh-bedingte Strominduktion nicht. Da weiterhin L-NAME über die Hemmung der NOS und der cGMP-vermittelten NO-Wirkung die Leitfähigkeit vermindert, kann auf eine Beteiligung von NO bei der Modulation von K^+ -Auswärtsströmen geschlossen werden.

4.5. Endothelabhängige Hyperpolarisation

Die Wirkung von ACh auf glatte Muskelzellen konnte durch Verabreichung von SNP nachgeahmt werden. Es kam zu einer signifikanten Erhöhung der Membranleitfähigkeit. Sie war hingegen kleiner als die Leitfähigkeitserhöhung nach Applikation von ACh in Präparaten mit intaktem Endothel. Eine mögliche Erklärung ist die wahrscheinlich unvollständige Zerstörung des Endothels durch die angewendete Luftperfusion. Die Membranleitfähigkeit der Gefäßmuskelzellen ist nach L-NAME-Applikation signifikant kleiner als die Leitfähigkeit nach Endothelzerstörung, was die Vermutung unterstützt. Weiterhin war MB nach intravasalem Durchfluss einer Luftblase immer noch in der Lage, die Leitfähigkeit der Muskelzellmembran zu reduzieren. Dies vollzieht sich wohl über die Blockierung der Restaktivität der löslichen Guanylatzyklase. Diese Restaktivität wurde vermutlich durch eine Freisetzung von NO aus den noch vorhandenen Endothelzellen induziert. Dann kann die endotheliale Restproduktion von NO durch SNP unterdrückt werden und die gesamte stimulierende Wirkung von SNP auf die Membranleitfähigkeit der Muskelzellen würde dabei reduziert (Rand & Garland, 1992). Selbst wenn man eine nur unvollständige Entfernung des Endothels durch die angewendete

Luftperfusion unterstellt, kann man trotzdem qualitative Rückschlüsse über diejenigen Ströme ziehen, die durch SNP in der Membran der glatten Gefäßmuskelzelle aktiviert wurden.

Der Effekt von SNP konnte nur durch die kombinierte Anwendung von Glib und CTX vollständig aufgehoben werden. NO aktiviert also in den vorgestellten Gefäßpräparaten sowohl ATP- als auch Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle. Wie lässt sich nun erklären, dass Glib bzw. CTX allein die SNP-induzierte Stromvergrößerung nicht blockiert, die kombinierte Gabe beider Substanzen aber eine vollständige Blockierung bewirkt? Man kann einmal einen neuen K^+ -Kanal postulieren, der nur durch gleichzeitige Anwendung von Glib und CTX blockiert wird. Andererseits ist vorstellbar, dass die Anwendung von Glib allein einen kompensatorischen Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Strom induziert bzw. die Gabe von CTX einen kompensatorischen ATP-abhängigen K^+ -Strom hervorruft und zur Gesamtblockierung beide Substanzen kombiniert werden müssen. Eine Bestätigung dieser Hypothesen muß offen bleiben.

NO aktiviert also entsprechend den Ergebnissen dieser Arbeit ATP- und Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle in Muskelzellen der Ratten-Mesenterialarterie. Es ist bekannt, dass NO in isolierten Gefäßmuskelzellen, Gefäßsegmenten oder Arterien entweder ATP- (Miyoshi et al., 1994; Plane, Wiley, Jeremy, Cohen & Garland, 1998) oder Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle (Tang und Zheng, 1993; Archer et al., 1994; Bolotina et al., 1994; Miyoshi & Nakaya, 1994; Archer, Huang, Reeve, Hampl, Tolarova, Michelakis & Weir, 1996; Edwards & Weston, 1998; Fleming & Busse, 1999) aktiviert. Die endothelabhängige oder NO-induzierte Hyperpolarisation im glatten Gefäßmuskel kann durch Glib (Brayden, 1990; Garland & McPherson, 1992; Plane & Garland, 1993; Murphy & Brayden, 1995; Parkington et al., 1995; Plane et al., 1995; Edwards & Weston, 1998) oder CTX (Bolotina et al., 1994; Archer et al., 1996; Nishiyama et al., 1998; Yamamoto et al., 1999) blockiert werden. Im Gegensatz dazu wurde in vielen anderen Präparaten kein Effekt von Glib (Chen, Yamamoto, Miwa & Suzuki, 1991; Eckman, Frankovich & Keef, 1992; Fujii et al., 1992; Van de Voorde, Vanheel & Leusen, 1992; Murphy & Brayden, 1995; Parkington et al., 1995) oder dem spezifischen Blocker der Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle, Iberotoxin (Murphy & Brayden, 1995) auf die endothelabhängige Hyperpolarisation gefunden. Auch daran werden die Unterschiede in den Mechanismen der endothelabhängigen Hyperpolarisation offenkundig. Beim Vergleichen oder Verallgemeinern ist immer zu beachten, welches Präparat, welcher Gefäßabschnitt einer Tierart untersucht wurde und welche experimentellen Rahmenbedingungen dabei vorgegeben waren.

Langfristig appliziertes ACh (>5 min) hyperpolarisierte die Muskelzellen durch Induktion eines hyperpolarisierenden Stromes. Der Inhibitor der NO-Synthase, L-NAME, blockierte diesen Effekt vollständig, das heißt, er hemmte die Leitfähigkeitserhöhung durch ACh. Der Gegenspieler der löslichen Guanylatzyklase, MB, zeigte dagegen keine hemmende Wirkung auf die ACh-abhängige Strominduzierung.

Durch andauernde intravasale Applikation des NO-Donators SNP ließ sich die Induktion des hyperpolarisierenden Stromes in Gefäßen mit zerstörtem Endothel nachahmen. Das Umkehrpotenzial dieses Stromes war von der extrazellulären K^+ -Konzentration abhängig. Der Effekt der Strominduktion durch SNP wurde durch MB ebenfalls nicht blockiert. Die Blocker der ATP-abhängigen bzw. Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle, Glib bzw. CTX, blockierten in den glatten Gefäßmuskelzellen einen hyperpolarisierenden Strom ähnlich dem ACh- bzw. SNP-induzierten Strom. Glib bzw. CTX blockierten bei alleiniger intravasaler Gabe die Aktivierung des hyperpolarisierenden Stromes durch SNP nicht. Dieser hyperpolarisierende Strom wurde dagegen bei kombinierter Anwendung von Glib und CTX vollständig blockiert. Hypothetisch kann es sich einmal um einen neuen K^+ -Kanal handeln, der nur durch kombinierte Gabe der genannten Substanzen blockiert wird. Andererseits kann die alleinige Anwendung von Glib einen kompensatorischen Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Strom induzieren bzw. die Gabe von CTX allein einen kompensatorischen ATP-abhängigen K^+ -Strom hervorrufen, so dass zur Gesamtblockierung beide Substanzen kombiniert werden müssen.

Die Untersuchungen zeigen, dass ACh in kleinen Mesenterialarterien der Ratte die glatten Muskelzellen langanhaltend hyperpolarisierte. ACh erhöhte über eine vermehrte Phospholipase C-Aktivität die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in der Endothelzelle und steigerte damit dort die NO-Synthese (Abb. 20). Das entstehende NO diffundierte zur glatten Gefäßmuskelzelle. Es verminderte hier die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern und erhöhte über die Stimulation der Proteinkinase G sowohl die Rückspeicherung von Ca^{2+} -Ionen als auch über die Beeinflussung der Ca-ATPase den Transport von Ca^{2+} -Ionen aus der glatten Muskelzelle und förderte somit deren Relaxation.

Gleichzeitig senkte NO den Ca^{2+} -Einstrom in die Muskelzelle ab, beeinflusste unabhängig von cGMP- bzw. MB-blockierbaren Wegen ATP- und Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle und führte zur Hyperpolarisation der Muskelzelle. Die Hyperpolarisation glatter Gefäßmuskelzellen aus Mesenterialarterien der Ratte vollzog sich also über die Aktivierung sowohl ATP- als auch Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Ströme durch freigesetztes NO aus den Endothelzellen ohne notwendige Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase.

Literaturverzeichnis

Abe, Y. ; Tomita, T.: Cable properties of smooth muscle. *Journal of Physiology (London)* **196 (1968), 87-100**

Akbarali, H. I.; Wyse, D. G.; Giles, W. R.: Ionic currents in single cells from human cystic artery. *Circulation Research* **70 (1992), 536-545**

Archer, S. L.; Huang, J. M. C.; Reeve, H. L.; Hampl, V.; Tolarova, S.; Michelakis, E.; Weir, E. K.: Differential distribution of electrophysiologically distinct myocytes in conduit and resistance arteries determines their response to nitric oxide and hypoxia. *Circulation Research* **78 (1996), 431-442**

Archer, S. L.; Huang, J. M. C.; Hampl, V.; Nelson, D. P.; Shultz, P. J.; Weir, E. K.: Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **91 (1994), 7583-7587**

Bolotina, V. M.; Najibi, S.; Palacino, J. J.; Pagano, P. J.; Cohen, R. A.: Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* **368 (1994), 850-853**

Bracamonte, M. P.; Burnett, J. C.; Miller, V. M.: Activation of soluble guanylate cyclase and potassium channels contribute to relaxations to nitric oxide in smooth muscle derived from canine femoral veins. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **34 (1999), 407-413**

Brayden, J. E.: Membrane hyperpolarization is a mechanism of endothelium-dependent cerebral vasodilatation. *American Journal of Physiology* **259 (1990), H668-H673**

Campbell, W. B.; Harder, D. R.: Endothelium-derived hyperpolarizing factors and vascular cytochrome p450 metabolites of arachidonic acid in the regulation of tone. *Circulation Research* **84, (1999) 484-488**

Casteels, R.; Kitamura, K.; Kuriyama, H.; Suzuki, H.: The membrane properties of the smooth muscle cells of the rabbit main pulmonary artery. *Journal of Physiology (London)* **271 (1977), 41-61**

Chen, G.; Suzuki, H.; Weston, A. H.: Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *British Journal of Pharmacology* **95 (1988), 1165-1174**

Chen, G.; Suzuki, H.: Calcium dependency of the endothelium-dependent hyperpolarization in smooth muscle cells of the rabbit carotid artery. *Journal of Physiology (London)* **421 (1989), 521-534**

Chen, G.; Cheung, D. W.: Characterization of acetylcholine-induced membrane hyperpolarization in endothelial cells. *Circulation Research* **70 (1992), 257-263**

Chen, G.; Yamamoto, Y.; Miwa, K.; Suzuki, H.: Hyperpolarization of arterial smooth muscle induced by endothelial humoral substances. *American Journal of Physiology* **260** (1991), **H1888-H1892**

Chen, G.; Suzuki, H.: Some electrical properties of the endothelium-dependent hyperpolarization recorded from rat arterial smooth muscle cells. *Journal of Physiology (London)* **410** (1989), **91-106**

Cohen, R. A.; Weisbrod, R. M.; Gericke, M.; Yaghoubi, M.; Bierl, C.; Bolotina, V. M.: Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation- refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase and inhibition of store-operated Ca^{2+} influx. *Circulation Research* **84** (1999), **210-219**

Cohen, R. A.; Vanhoutte, P. M.: Endothelium-dependent hyperpolarization: Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* **92** (1995), **3337-3349**

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

Eckman, D. M.; Frankovich, J. D.; Keef, K. D.: Comparison of the actions of acetylcholine and BRL 38227 in the guinea-pig coronary artery. *British Journal of Pharmacology* **106** (1992), **9-16**

Edwards, G.; Dora, K. A.; Gardener, M. J.; Garland, C. J.; Weston, A. H.: K^+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* **396** (1998), **269-272**

Edwards, G.; Weston, A. H.: Endothelium-derived hyperpolarizing factor- a critical appraisal. *Progress in Drug Research* **50** (1998), **107-133**

Faraci, F. M.; Heistad, D. D.: Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiological Review* **78** (1998), **53-97**

Feelisch, M.: The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **358**, (1998) **113-122**

Féletou, M.; Vanhoutte, P. M.: The alternative: EDHF. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **31** (1999), **15-22**

Fleming, I.; Busse, R.: NO: the primary EDRF. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **31** (1999), **5-14**

Fujii, K.; Tominaga, M.; Ohmori, S.; Kobayashi, K.; Koga, T.; Takata, Y.; Fujishima, M.: Decreased endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in smooth muscle of the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circulation Research* **70** (1992), **660-669**

Gambone, L. M.; Murray, P. A.; Flavahan, N. A.: Synergistic interaction between endothelium-derived NO and prostacyclin in pulmonary artery: potential role for K^+ ATP channels. *British Journal of Pharmacology* **121** (1997), 271-279

Garland, C. J.; Plane, F.; Kemp, B. K.; Cocks, T. M.: Endothelium-dependent hyperpolarization: A role in the control of vascular tone. *Trends in Pharmacological Sciences* **16** (1995), 23-30

Garland, C. J.; McPherson, G. A.: Evidence That Nitric Oxide Does Not Mediate the Hyperpolarization and Relaxation to Acetylcholine in the Rat Small Mesenteric Artery. *British Journal of Pharmacology* **105** (1992), 429-435

Gordienko, D. V.; Clausen, C.; Goligorsky, M. S.: Ionic currents and endothelin signaling in smooth muscle cells from rat renal resistance arteries. *American Journal of Physiology* **266** (1994), 325-341

Halliday, F. C.; Aaronson, P. I.; Evans, A. M.; Gurney, A. M.: The pharmacological properties of K^+ currents from rabbit isolated aortic smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology* **116** (1995), 3139-3148

Harder, D. R.; Campbell, W. B.; Roman, R. J.: Role of cytochrome P-450 enzymes and metabolites of arachidonic acid in the control of vascular tone. *Journal of Vascular Research* **32** (1995), 79-92

Hillaire-Buys, D.; Chapal, J.; Linck, N.; Blayac, J. P.; Petit, P.; Loubatières-Mariani, M. M.: Involvement of K^+ channel permeability changes in the L-NAME and indomethacin resistant part of adenosine-5'-O-(2-thiodiphosphate)-induced relaxation of pancreatic vascular bed. *British Journal of Pharmacology* **124** (1998), 149-156

Hirst, G. D. S.; Neild, T. O.: An analysis of excitatory junctional potentials recorded from arterioles. *Journal of Physiology (London)* **280** (1978), 87-104

Holland, M.; Langton, P. D.; Standen, N. B.; Boyle, J. P.: Effects of the BKCa channel activator, NS1619, on rat cerebral artery smooth muscle. *British Journal of Pharmacology* **117** (1996), 119-129

Holman, M. E.; Neild, T. O.; Lang, R. J.: On the passive properties of smooth muscle. *Frontiers in Smooth Muscle Research* (1990), 379-398

Hume, J. R.; Leblanc, N.: Macroscopic K^+ current in single smooth muscle cells of the rabbit portal vein. *Journal of Physiology (London)* **413** (1989), 49-73

Ignarro, L. J.; Harbison, R. G.; Wood, K. S.; Wolin, M. S.; McNamara, D. B.; Hyman, A. L.; Kadowitz, P. J.: Differences in responsiveness of intrapulmonary artery and vein to arachidonic acid: mechanism of arterial relaxation involves cyclic guanosine 3':5'-monophosphate and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **233** (1985), 560-569

Ito, Y.; Kitamura, K.; Kuriyama, H.: Actions of nitroglycerine on the membrane and mechanical properties of smooth muscles of the coronary artery of the pig. *British Journal of Pharmacology* **70** (1980), **197-204**

Jack, J.J.B.; Noble, D.; Tsien, R.W.: *Electric current flow in excitable cells*. Oxford: Oxford University Press (1975)

Jensen, P. E.; Hughes, A.; Boonen, H. C. M.; Aalkjaer, C.: Force, membrane potential, and $[Ca^{2+}]_i$ during activation of rat mesenteric small arteries with norepinephrine, potassium, aluminum fluoride, and phorbol ester- Effects of changes in pH_i . *Circulation Research* **73** (1993), **314-324**

Kajiwara, M.: General features of electrical and mechanical properties of smooth muscle cells in the guinea-pig abdominal aorta. *Pflügers Archive* **393** (1982), **109-117**

Kerwin, J. F.; Lancaster, J. R.; Feldman, P. L.: Nitric oxide: A new paradigm for second messengers. *Journal of Medical Chemistry* **38** (1995), **4343-4362**

Kuriyama, H.; Kitamura, K.; Nabata, H.: Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. *Pharmacological Reviews* **47** (1995), **387-573**

Mekata, F.: Current spread in the smooth muscle of the rabbit aorta. *Journal of Physiology (London)* **242** (1974), **143-155**

Mekata, F.: Different electrical responses of outer and inner muscle of rabbit carotid artery to noradrenaline and nerves. *Journal of Physiology (London)* **346** (1984), **589-598**

Mekata, F.: Electrophysiological properties of the smooth muscle cell membrane of the dog coronary artery. *Journal of Physiology (London)* **298** (1980), **205-212**

Mekata, F.: The role of hyperpolarization in the relaxation of smooth muscle of monkey coronary artery. *Journal of Physiology (London)* **371** (1986), **257-265**

Miura, H.; Liu, Y. P.; Gutterman, D. D.: Human coronary arteriolar dilation to bradykinin depends on membrane hyperpolarization- contribution of nitric oxide and Ca^{2+} -activated K^+ channels. *Circulation* **99** (1999), **3132-3138**

Miyoshi, H.; Nakaya, Y.: Endotoxin-induced nonendothelial nitric oxide activates the Ca^{2+} -activated K^+ channel in cultured vascular smooth muscle cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **26** (1994), **1487-1495**

Miyoshi, H.; Nakaya, Y.; Moritoki, H.: Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive K^+ channel of vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters* **345** (1994), **47-49**

- Mulvany, M. J.; Aalkjaer, C.: Structure and function of small arteries. *Physiological Reviews* **70** (1990), 921-961
- Murphy, M. E.; Brayden, J. E.: Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels, *Journal of Physiology (London)* **486** (1995), 47-58
- Nagao, T.; Vanhoutte, P. M.: Hyperpolarization as a Mechanism for Endothelium-Dependent Relaxations in the Porcine Coronary Artery. *Journal of Physiology (London)* **445** (1992), 355-367
- Nelson, M. T.; Patlak, J. B.; Worley, J. F.; Standen, N. B.: Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *American Journal of Physiology* **259** (1990), 3-18
- Nelson, M. T.; Quayle, J. M.: Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology* **37** (1995), 799-822
- Nishiyama, M.; Hashitani, H.; Fukuta, H.; Yamamoto, Y.; Suzuki, H.: Potassium channels activated in the endothelium-dependent hyperpolarization in guinea-pig coronary artery. *Journal of Physiology (London)* **510** (1998), 455-465
- Parkington, H. C.; Tonta, M. A.; Coleman, H. A.; Tare, M.: Role of membrane potential in endothelium-dependent relaxation of guinea-pig coronary arterial smooth muscle. *Journal of Physiology (London)* **484** (1995), 469-480
- Plane, F.; Garland, C. J.: Differential effects of acetylcholine, nitric oxide and levcromakalim on smooth muscle membrane potential and tone in the rabbit basilar artery. *British Journal of Pharmacology* **110** (1993), 651-656
- Plane, F.; Pearson, T.; Garland, C. J.: Multiple pathways underlying endothelium-dependent relaxation in the rabbit isolated femoral artery. *British Journal of Pharmacology* **115** (1995), 31-38
- Plane, F.; Wiley, K. E.; Jeremy, J. Y.; Cohen, R. A.; Garland, C. J.: Evidence that different mechanisms underlie smooth muscle relaxation to nitric oxide and nitric oxide donors in the rabbit isolated carotid artery. *British Journal of Pharmacology* **123** (1998), 1351-1358
- Pohl, U.; Dewit, C.: A unique role of NO in the control of blood flow. *News in Physiological Sciences* **14** (1999), 74-80
- Quayle, J. M.; Standen, N. B.: K_{ATP} channels in vascular smooth muscle. *Cardiovascular Research* **28** (1994), 797-804
- Rand, V. E.; Garland, C. J.: Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in the rabbit basilar artery-importance of membrane hyperpolarization. *British Journal of Pharmacology* **106** (1992), 143-150

Robertson, B. E.; Schubert, R.; Hescheler, J.; Nelson, M. T.: cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *American Journal of Physiology* **(11) 265 (1993), 299-303**

Schubert, R.; Mulvany, M. J.: The myogenic response: established facts and attractive hypotheses. *Clinical Science* **96 (1999), 313-326**

Schubert, R.; Wesselman, J. P. M.; Nilsson, H.; Mulvany, M. J.: Noradrenaline-induced depolarization is smaller in isobaric compared to isometric preparations of rat mesenteric small arteries. *Pflügers Archive* **431 (1996), 794-796**

Standen, N. B.; Quayle, J. M.: K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle. *Acta Physiologica Scandinavica* **164 (1998), 549-557**

Stockbridge, N.; Zhang, H. Weir, B.: Potassium currents of rat basilar artery smooth muscle cells. *Pflügers Archive* **421 (1992), 37-42**

Surprenant, A.; Neild, T. O.; Holman, M.: Membrane properties of rabbit basilar arteries and their responses to transmural stimulation. *Pflügers Archive* **410 (1987), 92-101**

Tang, Y. G.; Zheng, Y. F.: Endothelium-derived relaxing factor activates calcium-activated potassium channels of resistance vessel smooth muscle cells. *Science in China Series B* **36 (1993), 439-450**

Tare, M.; Parkington, H. C.; Coleman, H. A.; Neild, T. O.; Dusting, G. J.: Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. *Nature* **346 (1990), 69-71**

Taylor, S. G.; Southerton, J. S.; Weston, A. H.; Baker, J. R. J.: Endothelium-dependent effects of acetylcholine in rat aorta: a comparison with sodium nitroprusside and cromakalim. *British Journal of Pharmacology* **94 (1988), 853-863**

Taylor, S. G.; Weston, A. H.: Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends in Pharmacological Sciences* **9 (1988), 272-274**

Tomita, T.: Current spread in the smooth muscle of the guinea-pig vas deferens. *Journal of Physiology (London)* **189 (1967), 163-176**

Tomita, T.: Electrical responses of smooth muscle to external stimulation in hypertonic solution. *Journal of Physiology (London)* **183 (1966), 450-468**

Tomita, T.: Electrophysiology of mammalian smooth muscle. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **30 (1975), 185-203**

Van de Voorde, J.; Vanheel, B.; Leusen, I.: Endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in aorta from control and renal hypertensive rats. *Circulation Research* **70** (1992), 1-8

Vanheel, B.; Van de Voorde, J., Leusen, I.: Contribution of nitric oxide to the endothelium-dependent hyperpolarization in rat aorta. *Journal of Physiology (London)* **475** (1994), 277-284

Vanhoutte, P. M.: Other endothelium-derived vasoactive factors. *Circulation* **87** (1993), 9-17

Waniishi, Y.; Inoue, R.; Morita, H.; Teramoto, N.; Abe, K.; Ito, Y.: Cyclic GMP-dependent but G-kinase-independent inhibition of Ca^{2+} -dependent Cl^- currents by NO donors in cat tracheal smooth muscle. *Journal of Physiology (London)* **511** (1998), 719-731

Wohlrab, D.; Markwardt, F.: Influence of ion channel blockers on proliferation and free intracellular Ca^{2+} concentration of human keratinocytes. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* **12** (1999), 257-265

Wilde, D. W.; Lee, K. S.: Outward potassium currents in freshly isolated smooth muscle cell of dog coronary arteries. *Circulation Research* **65** (1989), 1718-1734

Yamamoto, Y.; Imaeda, K.; Suzuki, H.: Endothelium-dependent hyperpolarization and intercellular electrical coupling in guinea-pig mesenteric arterioles. *Journal of Physiology (London)* **514** (1999), 505-513

Yatani, A.; Seidel, C. L.; Allen, J.; Brown, A. M.: Whole-cell and single-channel calcium currents of isolated smooth muscle cells from saphenous vein. *Circulation Research* **60** (1987), 523-533

Zhang, H.; Bolton, T. B.: Activation by intracellular GDP, metabolic inhibition and pinacidil of a glibenclamide-sensitive K-channel in smooth muscle cells of rat mesenteric artery. *British Journal of Pharmacology* **114** (1995), 662-672

Danksagung

Dem ehemaligen kommissarischen Direktor des Julius-Bernstein-Instituts für Physiologie, Herrn Prof. Dr. G. Szymanski, sowie dem derzeitigen Direktor des Institutes, Herrn Prof. Dr. G. Isenberg, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Markwardt, Leiter der Abteilung Elektrophysiologie im Julius-Bernstein-Institut für Physiologie, für die Überlassung des Themas, für seine ständige Hilfsbereitschaft, Ansprechbarkeit und die Unterstützung bei allen aufgetretenen Problemen während der Experimente und der Auswertung. Danke auch für die Zugriffsmöglichkeit zu seiner hervorragenden Literatursammlung.

Dank an Herrn Dr. W. Boldt für die Einarbeitung in die Methoden der Ein-Mikroelektroden-Technik und der Gefäßpräparation sowie seine Unterstützung bei den Experimenten.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. M. Klapperstück für ihre hilfreichen Diskussionen und graphischen Tipps bedanken.

Dank sagen möchte ich weiterhin Frau Ch. Girke und Frau M. Schmidt für ihre Hilfe bei der Versuchsvorbereitung sowie Herrn Th. Gerth für die feinmechanische Unterstützung der Experimente und seine gelungenen Messkammerkonstruktionen.

Meiner Frau Annett und meiner Tochter Paula ein herzliches Dankeschön für Geduld und Ansporn.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Halle, im Juni 2000

Tabellarischer Lebenslauf

Thomas Weidelt

geboren am 08.06.1966 in Halle (Saale),

Lafontainestr. 8, 06114 Halle,

seit 1991 verheiratet, eine Tochter

Schulbildung

1973-1983 Polytechnische Oberschule in Halle (Saale)

1983-1985 Spezialklassen 11/12 für Mathematik/Physik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Wehrdienst

1985-1987 18monatiger Grundwehrdienst

Studium

1987-1989 Physik-Diplom an der Friedrich-Schiller-Universität Jena sowie

1989-1993 an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Abschluss als Diplom-Physiker

Beruflicher Werdegang

- 01.08.93 bis 31.12.1999 Wissenschaftlicher Assistent am Julius-Bernstein-Institut für Physiologie, Medizinische Fakultät, MLU Halle-Wittenberg

Mitarbeit im BMFT-Projekt „Elektrophysiologie glatter Muskelzellen kleiner Arterien“, Arbeitsgruppe Prof. Dr. F. Markwardt,

ab April 1996 Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Isenberg, Projekt „Bildgebende Mikroskopie von Kalzium-Verteilungen in Zellkompartimenten“,

ab 1994 Durchführung des Physiologie-Praktikums für Studenten der Medizin

- seit 01.05.2000 Wissenschaftlicher Assistent im Institut für Anatomie und Zellbiologie, Medizinische Fakultät, MLU Halle-Wittenberg, Arbeitsgruppe Prof. Dr. E. Peschke

Weiterbildung

1995-1997 Aufbaustudium „Medizinische Physik“ an der Hochschule für Technik und Wirtschaft Mittweida, Abschluss mit Zertifikat

Publikationsliste

1. Weidelt, Th.; Boldt, W.; Markwardt, F.: Endothelium-dependent K^+ -currents in smooth muscle cells of intact rat small arteries. Pflügers Archiv- European Journal of Physiology **433 (6), Suppl. S (1997), O148-O148**
2. Weidelt, Th.; Boldt, W.; Markwardt, F.: Acetylcholine-induced K^+ -currents in smooth muscle cells of intact rat small arteries. Journal of Physiology (London) **500.3 (1997), 617-630**
3. Weidelt, Th.; Isenberg, G.: Augmentation of SR Ca^{2+} release by rapamycin and FK506 causes K^+ -channel activation and membrane hyperpolarization in bladder smooth muscle. British Journal of Pharmacology **129 (2000), 1293-1300**