

Aus der Klinik für Neurologie  
Abteilung für Experimentelle Neurologie  
der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Rolle der Kaliumkanäle und des cGMP bei  
der Dilatation der perfundierten A. cerebri  
media der Ratte auf Azidose**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin  
von

Johannes A. Vogt

geboren am 02.01.1970 in Bukarest

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter:           1. Frau PD Dr. med vet. Ute Lindauer.....  
                          2. Herr apl. Prof. Dr. med Roman Haberl.....  
                          3. Herr PD Dr. med vet. Johannes Vogel.....

Datum der Promotion: 15.09.2003.....

## Zusammenfassung

Die Azidose gehört zu den stärksten dilatatorischen Stimuli zerebraler Arterien. Obwohl schon 1890 von Roy und Sherrington beschrieben, sind die Faktoren, die die Vasodilatation zerebraler Arterien auf Azidose vermitteln, bis heute nicht bekannt. Untersuchungen über die Rolle des schnell flüchtigen Bioradikals Stickstoffmonoxid (NO) haben gezeigt, daß NO bei der azidotischen Vasodilatation zerebraler Arterien als Modulator agiert. Darüber hinaus nimmt NO in der neurovaskulären Kopplung, d.h. bei der Vermittlung der regionalen Blutflußantwort nach neuronaler Stimulation, eine permissive Funktion ein.

Die Vasodilatation auf Azidose wurde in der vorliegenden Arbeit als Modellstimulus zur Untersuchung der NO-abhängigen Dilatation zerebraler Arterien verwendet. Dabei wurde die Rolle der Kaliumkanäle und die Funktion des cGMP an der Vasodilatation auf Azidose mittels spezifischer Inhibitoren untersucht. Die Experimente erfolgten an der isolierten und perfundierten A. cerebri media der Ratte.

Bei der Untersuchung der Signaltransduktion von NO auf Ebene des cGMP wurde eine ausgeprägte Abhängigkeit der azidotischen Vasodilatation von cGMP beobachtet. Durch Restitution des basalen cGMP-Spiegels nach vorheriger Inhibition der löslichen Guanylatzyklase wurde gezeigt, daß NO über cGMP bei der Vermittlung dieser Reaktion als Modulator wirkt.

Unter Blockade der einzelnen Kaliumkanalfamilien konnte eine Beteiligung der  $K_{Ca}$  an der Vasodilatation auf Azidose sowie am Gefäßtonus unter Ruhebedingungen beobachtet werden. Für eine Beteiligung der  $K_{ATP}$ , der  $K_V$  und der  $K_{ir}$  an diesen Reaktionen wurden dagegen keine Hinweise gefunden. Ebenso sprechen die Untersuchungen unter Blockade der  $Na^+/K^+$ -ATPase gegen eine Beteiligung dieses Enzyms an der Azidosereaktivität zerebraler Arterien.

Um ein mögliches Zusammenwirken der Kaliumkanäle zu erfassen, wurde die Vasodilatation auf Azidose unter Blockade von jeweils zwei Kaliumkanaltypen untersucht. Unter Hemmung der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$ , sowie unter Hemmung der  $BK_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$  wurde keine Vasodilatation mehr auf Azidose beobachtet. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß die Vasodilatation der A. cerebri media auf Azidose durch  $BK_{Ca}$  und  $K_{ATP}$  in redundanter Weise vermittelt wird. Dabei scheinen  $K_{Ca}$  die Funktion der  $K_{ATP}$  vollständig substituieren zu können.

Die Resultate dieser Arbeit bilden den Ausgangspunkt für derzeit laufenden Untersuchungen über die funktionelle Modulation der  $K_{ATP}$  und der  $BK_{Ca}$  durch das NO/cGMP-System. Weiterhin bilden die vorliegenden Untersuchungen eine wichtige Grundlage zur Überprüfung der zentralen Rolle der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$  auf weitere, durch das NO/cGMP-System modulierte Stimuli, wie z.B. der funktionellen Stimulation.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente wurden mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 507), der Hermann und Lilly Schilling Stiftung, sowie der Humboldt Universität zu Berlin gefördert.

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen erschienen:

Lindauer U, Kunz A, Schuh-Hofer S, **Vogt J**, Dreier JP, and Dirnagl U. Nitric Oxide from perivascular nerves modulates cerebral arteriolar pH reactivity. *Am J Physiol*. 2001; 281: H1353-H1363

Lindauer U\*, **Vogt J\***, Schuh-Hofer S, Dreier JP, Dirnagl U. Cerebrovascular dilatation to extraluminal acidosis occurs via combined activation of ATP-sensitive and Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003, *in press*

*\*contributed equally as first author*

Schlagwörter:

zerebraler Blutfluss, Arteria cerebri media, Azidose, Vasodilatation, cGMP, Kaliumkanäle

## Abstract

Acidosis is one of the most potent vasodilators in the cerebral circulation. Although first described 1890 by Roy and Sherrington the mechanisms of vasodilation to acidosis are still unknown. Experimental data show, that nitric oxide (NO) is a modulator but not a mediator of cerebral arterial pH reactivity. NO also acts as a modulator of neurovascular coupling in the rat somatosensory cortex.

We used the experimental in vitro model of the isolated and perfused middle cerebral artery (MCA) to elucidate the general mechanisms of NO-modulated dilations. The present study was performed to clarify the role of cGMP and potassium channels for mediation of acidosis-induced dilation of cerebral arteries.

The results indicate, that vasodilation to acidosis is mediated by cGMP. Restoring the basal cGMP-level we could demonstrate a permissive role of cGMP in the vasodilation to acidosis.

We could also show that  $K_{Ca}$  are active under resting conditions and are able to contribute to the relaxation of the MCA to acidosis. Other potassium channels like  $K_{ATP}$ ,  $K_{ir}$ ,  $K_V$  and the  $Na^+/K^+$ ATPase appeared not to be involved in the process of dilation to acidosis. After administration of a selective inhibitor of  $K_{ATP}$  in addition to an inhibitor of  $K_{Ca}$  the relaxation to acidosis was completely abolished. Simultaneous application of selective inhibitors of  $K_{ATP}$  and  $BK_{Ca}$  also prevented from vasodilation to acidosis. These results indicate, that relaxation to acidosis is mediated by activation of  $K_{ATP}$  and  $BK_{Ca}$ . This potassium channels seem to have a redundant activity, in such a way that  $K_{Ca}$  could substitute for  $K_{ATP}$ .

The present findings are a starting point for further studies concerning the modulation of  $K_{ATP}$  and  $BK_{Ca}$  by the NO/cGMP-System. This studies are a basis for coming experiments to determine the role of  $K_{ATP}$  and  $BK_{Ca}$  in the neurovascular coupling.

## Keywords:

cerebral blood flow, medial cerebral artery, acidosis, vasodilation, cGMP, potassium channels

## Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung</u> .....	10
<u>1.1. Die zerebrale Autoregulation</u> .....	10
<u>1.2. Die neurovaskuläre Kopplung</u> .....	11
• <u>Kaliumionen (<math>K^+</math>)</u> .....	12
• <u>Die lokale Azidose/Wasserstoffionen</u> .....	13
<u>1.3. NO und die NO-Synthasen</u> .....	14
• <u>Rolle der NOS bei der Regulation des zerebralen Ruheblutflusses</u> .....	15
• <u>Rolle der NOS bei der Vermittlung zerebrovaskulärer Antworten</u> .....	16
<u>1.4. Die Azidose und die zerebrale Blutflußregulation</u> .....	18
• <u>Mechanismen der Tonusregulation glatter Muskelzellen unter Azidose</u> .....	18
• <u>Azidose und NO</u> .....	19
• <u>Kaliumkanäle an glatten Gefäßmuskelzellen zerebraler Arterien</u> .....	21
<u>Kalziumabhängige Kaliumkanäle (<math>K_{Ca}</math>)</u> .....	21
<u>ATP-sensitive Kaliumkanäle (<math>K_{ATP}</math>)</u> .....	23
<u>Einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle (<math>K_{ir}</math>)</u> .....	24
<u>Spannungsabhängige Kaliumkanäle (<math>K_v</math>)</u> .....	25
• <u>Die <math>Na^+/K^+</math>-ATPase</u> .....	26
<u>2. Zusammenfassung und Herleitung der Aufgabenstellung</u> .....	27
<u>3. Materialien und Methoden</u> .....	29
<u>3.1. Modellbeschreibung</u> .....	29
<u>3.2. Präparation der Arterie</u> .....	32
<u>3.3. Gründe für die Wahl des Modells</u> .....	32
<u>3.4. Materialien und Erläuterungen</u> .....	34
<u>3.5. Versuchsablauf und verwendete Substanzen</u> .....	35
<u>3.6. Experimentelles Paradigma</u> .....	39
<u>3.7. Statistische Auswertung</u> .....	41
<u>4. Ergebnisse</u> .....	43
<u>4.1. Gütekriterien einer intakten Vasoreaktivität</u> .....	43
<u>4.2. Zeitkontrollen</u> .....	44
<u>4.3. Abhängigkeit der Azidosereaktivität vom NO/cGMP-System</u> .....	46
<u>4.4. Azidosereaktivität unter Inhibition der einzelnen Kaliumkanaltypen</u> .....	49
<u>4.5. Ruhedurchmesser unter Hemmung der einzelnen Kaliumkanaltypen</u> .....	54

4.6.	<a href="#">Rolle der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase unter Ruhe- und Azidosebedingungen</a>	55
4.7.	<a href="#">Azidosensitivität unter Hemmung von jeweils 2 Kaliumkanalfamilien</a>	56
4.8.	<a href="#">Ruhedurchmesser unter gleichzeitiger Hemmung von zwei Kaliumkanaltypen</a>	63
5.	<a href="#">Diskussion</a>	64
5.1.	<a href="#">Zusammenfassung der Ergebnisse</a>	64
5.2.	<a href="#">Beurteilung der Gefäßreaktivität und Diskussion der Kontrollreaktionen</a>	65
•	<a href="#">Rolle des CO<sub>2</sub> versus des pH<sup>+</sup> bei der Vasodilatation zerebraler Arterien auf Azidose</a>	66
5.3.	<a href="#">Rolle des NO/cGMP-Systems an der Vasodilatation auf Azidose</a>	67
5.4.	<a href="#">Rolle des K<sub>Ca</sub> am Ruhetonus und an der Vasodilatation auf Azidose</a>	69
5.5.	<a href="#">Rolle des K<sub>ATP</sub> am Ruhetonus und an der Vasodilatation auf Azidose</a>	70
5.6.	<a href="#">Rolle des K<sub>ir</sub> am Ruhetonus und an der Vasodilatation auf Azidose</a>	72
5.7.	<a href="#">Rolle des K<sub>v</sub> am Ruhedurchmesser und an der Vasodilatation auf Azidose</a>	73
5.8.	<a href="#">Rolle der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase unter pH 7,4 und unter Azidose</a>	75
5.9.	<a href="#">Vasodilatation auf Azidose unter Hemmung von jeweils 2 Kaliumkanalfamilien aus den Reihen 7-14</a>	76
5.10.	<a href="#">Zusammenfassung und Ausblick</a>	81
	<a href="#">Literaturverzeichnis</a>	83
	<a href="#">Danksagung</a>	95
	<a href="#">Lebenslauf</a>	96
	<a href="#">Publikationsliste</a>	97
	<a href="#">Eidstattliche Erklärung</a>	98

## Abbildungsverzeichnis

<a href="#"><u>Abbildung 1 Experimenteller Aufbau</u></a> .....	31
<a href="#"><u>Abbildung 2 Versuchsablauf und verwendete Substanzen (a)</u></a> .....	39
<a href="#"><u>Abbildung 3 Versuchsablauf und verwendete Substanzen (b)</u></a> .....	40
<a href="#"><u>Abbildung 4 Azidosereaktion unter sGC-Hemmung und Restitution mit 8 Br cGMP</u></a> .....	47
<a href="#"><u>Abbildung 5 Ruhedurchmesser unter Hemmung der einzelnen Kaliumkanaltypen</u></a> .....	54
<a href="#"><u>Abbildung 6 Reduktion der Azidosereaktivität unter Hemmung der verschiedenen Kaliumkanalfamilien</u></a> .....	59
<a href="#"><u>Abbildung 7 Azidosereaktivität unter gleichzeitiger Hemmung von zwei Kaliumkanalfamilien</u></a>	62
<a href="#"><u>Abbildung 8 Ruhedurchmesser unter gleichzeitiger Hemmung von zwei Kaliumkanaltypen</u></a> .....	63

**Widmung**

*meinen Eltern Genoveva und Georg-Alexander Vrabie*

## 1. Einleitung

Das Gehirn ist eines der am besten durchbluteten Organe. Es ist wie kein anderes auf eine kontinuierliche Blutversorgung angewiesen. Eine Unterbrechung der Blutzufuhr kann innerhalb weniger Minuten zu einer Zellschädigung mit nachfolgendem Zelluntergang führen (Smith *et al.*, 1984). Unter den zerebrovaskulären Erkrankungen spielt der Schlaganfall in unserer Gesellschaft die epidemiologisch wichtigste Rolle. In den Industrieländern ist der Schlaganfall die zweithäufigste Todesursache und die häufigste Ursache für eine vorzeitige Invalidität (Kolominsky-Rabas *et al.*, 1998; Berger, 2001).

### 1.1. Die zerebrale Autoregulation

Die Leistungen der zerebralen Blutflußregulation lassen sich anhand von Eckdaten der zerebralen Blutversorgung ermessen: das humane Gehirn beansprucht bei einem Eigengewicht von ca. 1500 g und einem Anteil von ca. 2 % am Gesamtkörpergewicht in etwa 15 % des Herzzeitvolumens. Die Gewebperfusions pro 100 g Gehirnmasse beträgt beim Menschen  $54 \pm 12$  ml Blut in der Minute (Kety und Schmidt, 1945). Der zerebrale Gesamtblutfluß wird während systemischer Blutdruckschwankungen, wie sie z.B. unter physiologischen Veränderungen vorkommen (Ruhe versus Aktivität), über weite Bereiche konstant gehalten. Diese Eigenschaft wird als zerebrale Autoregulation bezeichnet (Paulson *et al.*, 1990). Eine Autoregulation wurde an den meisten Organen nachgewiesen und ist im zerebralen Blutkreislauf besonders gut ausgebildet.

In der Ratte wurde ein konstanter zerebraler Blutfluß bei systemischen arteriellen Drücke zwischen 65 und 155 mm Hg gemessen (Harper *et al.*, 1984). Als Grenzen der zerebralen Autoregulation wurden beim Menschen mittlere arterielle Drücke von 60 bis 150 mm Hg ermittelt. Dieser Bereich wird als autoregulatorisches Plateau (Paulson *et al.*, 1990) oder als Autoregulationsbereich bezeichnet (Kuschinsky, 2001).

Die zerebrale Autoregulation erfolgt größtenteils über myogene Regulationsmechanismen. Grundlage des myogenen Mechanismus ist die von Bayliss (1902) publizierte Beobachtung, daß eine intravaskuläre Druckerhöhung eine Gefäßkonstriktion zur Folge hat. Diese Reaktion wird als myogene Antwort bezeichnet. Sie ist sowohl Grundlage des basalen Gefäßtonus als auch der zerebralen Autoregulation. Der Mechanismus der myogenen Gefäßantwort beruht auf einer graduellen Depolarisation des Membranpotentials glatter Gefäßmuskelzellen bei Erhöhung des

transmuralen Druckes. Dadurch werden spannungsabhängige Kalziumkanäle (voltage operated channels, VOC) aktiviert. Die Öffnung der VOC führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  (Knot und Nelson, 1998). Die Gefäßmuskelspannung wird über Veränderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  reguliert: eine Vasokonstriktion korreliert mit einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ , eine Vasodilatation mit einer Abnahme der  $[Ca^{2+}]_i$ . Die biochemische Grundlage der Kontraktion glatter Muskelzellen beruht auf der Bindung von  $Ca^{2+}$ -Ionen an das Kalmodulin. Dieses führt zur Bildung eines  $Ca^{2+}$ -Kalmodulin-Komplexes, der die Myosinleichtkettenkinase aktiviert. Letzteres nimmt auf dem Weg zu einer vermehrten ATP-Hydrolyse eine Schalterfunktion ein. Eine erhöhte ATP-Hydrolyse hat eine Zunahme der Querbrückenzyklen zur Folge und führt zur Kontraktion der glatten Muskelzellen (Somlyo und Somlyo, 1994). Neurogene und endotheliale Mechanismen scheinen dagegen keinen direkten Einfluß auf die druckinduzierte Konstriktion zerebraler Arterien der Ratte zu haben (Meininger und Davis, 1992). Ebenso gibt es bisher nur wenige Hinweise für eine Beteiligung metabolisch-biochemischer Mechanismen an der zerebralen Autoregulation (Paulson *et al.*, 1990; Kuschinsky, 2001).

## 1.2. Die neurovaskuläre Kopplung

Der regionale Blutfluß ist den jeweils vorherrschenden kortikalen Stoffwechselbedürfnissen angepaßt und weist somit erhebliche regionale Unterschiede auf. So erfolgt in funktionell aktiven Kortexarealen eine Erhöhung der Durchblutung. Erste Beschreibungen dieses Phänomens gehen auf Roy und Sherrington (1890) zurück. Quantitative Messungen des regionalen Blutflusses nach funktioneller Aktivierung konnten allerdings erst viele Jahre später durchgeführt werden (Sokoloff, 1961). Es zeigte sich, daß die regionale Blutflußzunahme während erhöhter neuronaler Aktivität zeitlich und räumlich eng begrenzt ist. Der Zusammenhang zwischen neuronaler Aktivität und regionalem Blutfluß wurde seitdem von vielen Autoren beschrieben und untersucht. Er wird heute unter dem Begriff der neurovaskulären Kopplung zusammengefaßt (Villringer und Dirnagl, 1995; Kuschinsky, 1997). Die neurovaskuläre Kopplung ermöglicht eine indirekte Beobachtung neuronaler Aktivität über eine Veränderung des regionalen Blutflußanstieges und der damit verbundenen Veränderung der Sauerstoffsättigung des Blutes in dem aktiven Gehirnareal. Dadurch können funktionelle Kortexareale während motorischer, sensorischer oder kognitiver Aktivität in hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung nichtinvasiv untersucht werden. Die funktionelle Untersuchung des menschlichen Gehirns ermöglicht die

Erforschung der neuroanatomischen Basis der Kognition und hat zur Etablierung der kognitiven Neurowissenschaft geführt. In der klinischen Anwendung nimmt die funktionelle Bildgebung eine immer größer werdende Rolle in der neurologischen Diagnostik und in der Therapiebegleitung ein (Neumann-Haefelin *et al.*, 2000; Scheltens und Korf, 2000).

Weiterhin scheint die neurovaskuläre Kopplung eine wichtige Rolle unter pathophysiologischen Bedingungen einzunehmen. Es wird vermutet, daß die neurovaskuläre Kopplung bei neurologischen Erkrankungen wie z.B. der Ischämie (Iadecola, 1998) oder der Chorea Huntington (Clark *et al.*, 2002) gestört ist und dadurch selbst zum Krankheitsprozeß beiträgt.

Die Mechanismen der neurovaskulären Kopplung sind im Detail noch nicht bekannt. Der Ablauf des regionalen Blutflußanstiegs nach neuronaler Stimulation weist einen initialen (Vorwärtsregulation) und einen unterhaltenden Anteil (Rückkopplung) auf (Kuschinsky, 2001). Zur Erklärung der neurovaskulären Kopplung wurden bisher eine Reihe von möglichen Mechanismen und Mediatoren vorgeschlagen. Dabei wurde die regionale Blutflußantwort sowohl auf die neuronale Aktivität selbst als auch auf den Metabolismus im aktiven Gehirnareal zurückgeführt (Lauritzen, 2001). So führt neuronale Aktivität z.B. zur Freisetzung von Kaliumionen, ein erhöhter Metabolismus u.a. zur Freisetzung von Wasserstoffionen und Adenosin in die extrazelluläre Flüssigkeit.

Neben den genannten Faktoren sollen das Bioradikal NO (Stickstoffmonoxid, engl. nitric oxide), neurogene Mechanismen (Sandor, 1999), sowie Metaboliten der Arachidonsäure (Harder *et al.*, 1998) bei der Vermittlung der Blutflußantwort nach neuronaler Aktivität beteiligt sein. Die Besprechung dieser Faktoren geht jedoch bis auf die Rolle des pH, des NO und der Kaliumkanäle über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinaus.

- **Kaliumionen ( $K^+$ )**

Kaliumionen gehören als Produkt neuronaler Aktivität zu den möglichen Mediatoren der neurovaskulären Kopplung. In der neurovaskulären Kopplung ist das Kalium vor allem in der Vorwärtsregulation als initialer Mediator der Blutflußantwort einzuordnen (Kuschinsky, 2001). Von Paulson und Newman (1987) stammt die Hypothese, nach der Astrozyten aufgenommene  $K^+$ -Ionen über ihre Fortsätze, mit denen sie zerebrale Gefäße umhüllen, abgeben. Dieser Mechanismus wurde als „potassium siphoning“ bezeichnet. Das in unmittelbarer Nähe der Blutgefäße abgegebene Kalium könnte somit über die Aktivierung der einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle eine Hyperpolarisation glatter Gefäßmuskelzellen und eine Vasodilatation

erzeugen (Edwards *et al.*, 1988). Diese Hypothese wird durch direkte Messungen der extrazellulären Kaliumkonzentration  $[K^+]_e$  nach kortikaler Stimulation unterstützt. So soll die  $[K^+]_e$  innerhalb weniger Millisekunden nach Stimulation ansteigen und der regionalen Blutflußantwort vorausgehen (Urbanics *et al.*, 1978). Zahlreiche Arbeiten „in vivo“ und „in vitro“ haben die vasodilatatorische Wirkung extrazellulär applizierten Kaliums nachgewiesen und unterstützen diese Theorie (Kuschinsky *et al.*, 1972; Knot *et al.*, 1996; Chrissobolis *et al.*, 2000). Andere Autoren konnten jedoch den Blutflußanstieg nach direkter zerebellärer Stimulation nicht allein durch die dabei gemessene  $[K^+]_e$  erklären (Caesar *et al.*, 1999). Letztere Arbeit spricht dafür, daß Kaliumionen nicht die einzigen Mediatoren der Blutflußantwort nach funktioneller Stimulation sind.

- **Die lokale Azidose/Wasserstoffionen**

Wasserstoffionen ( $H^+$ ) wurden schon von Roy und Sherrington (1890) als Mediatoren der Blutflußantwort nach neuronaler Aktivität vermutet und werden bis in heutiger Zeit als mögliche Mediatoren der neurovaskulären Kopplung angesehen (Lou *et al.*, 1987). Spektroskopische  $H_1$ NMR-Messungen haben einen Anstieg der Laktatkonzentration während neuronaler Aktivierung gezeigt. Dieses wurde als Hinweis auf eine anaerobe Glykolyse gewertet (Pirchard *et al.*, 1991). Gleichzeitige Messungen des extrazellulären pH-Wertes und des kortikalen Blutflusses (CBF) während physiologischer neuronaler Stimulation wurden bisher jedoch nicht durchgeführt. Unter direkter kortikaler Stimulation wurde ein extrazellulärer pH-Abfall von 0,2 (Chesler *et al.*, 1987) bis 0,4 (Urbanics *et al.*, 1978) registriert. Untersuchungen in vivo haben gezeigt, daß ein pH-Abfall von 0,2 einen Anstieg des Ruheblutflusses um ca. 20% erzeugt (Niwa *et al.*, 1993). Interessanterweise haben Urbanics *et al.* (1978) mit der Rückkehr des pHs auf physiologische Werte eine Abnahme des infolge der Stimulation erhöhten Blutflusses beobachtet. Dieses Phänomen deutet auf eine Beteiligung der extrazellulären Azidose an den unterhaltenden Mechanismen der Blutflußantwort nach kortikaler Stimulation hin.

### 1.3. NO und die NO-Synthasen

1980 wurde von Furchgott und Zawadski ein endothelabhängiger Faktor als Mediator der Gefäßdilatation auf Acetylcholin beschrieben. Dieser Faktor wurde aufgrund seines endothelialen Ursprungs als EDRF (endothelial derived relaxing factor) bezeichnet. Das schnell flüchtige Bioradikal NO wurde später als Hauptbestandteil des EDRF identifiziert (Moncada *et al.*, 1991). NO wird von der NO-Synthase (NOS) produziert, die im Gehirn in Neuronen, in der Neuroglia und im Endothel zerebraler Gefäße nachgewiesen wurde. Man unterscheidet eine induzierbare (iNOS) und zwei konstitutive Isoformen (cNOS). Zu den konstitutiven Isoformen der NOS zählen die zunächst im Endothel nachgewiesene „endotheliale“ NO-Synthase (eNOS) sowie die in Neuronen und Astrozyten gefundene „neuronale“ Isoform (nNOS). Die nNOS wird auch als Typ I NOS, die eNOS auch als Typ III NOS bezeichnet. Beide Isoformen können NO nach glutamaterger Stimulation freisetzen und sind in ihrer Aktivität  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängig. Die cNOS des Hirngewebes hat einen basalen Aktivitätsspiegel und setzt NO in picomolaren Konzentrationen frei. Dadurch entsteht ein kontinuierlicher NO-Spiegel, der auf die Gefäßmuskelzelle einwirkt. Der basale NO-Spiegel nimmt bei der neurovaskulären Kopplung, aber auch bei der Vermittlung vasodilatatorischer Stimuli wie der Azidose eine wichtige funktionelle Rolle ein (Kapitel 1.3.2). Die iNOS weist dagegen unter physiologischen Bedingungen eine vernachlässigbare Aktivität auf (Faraci und Heistad, 1998).

Bei der Untersuchung zerebraler Arterien *in vitro* reduziert sich der Ursprung des NO auf das Endothel und auf perivaskuläre Neurone. Die NOS-haltigen, perivaskulären Neurone der A. cerebri media (middle cerebral artery, MCA) gehören zum parasympathischen Nervensystem, stammen aus dem Ganglion sphenopalatinum und bleiben nach Entnahme und Präparation der MCA funktionell aktiv (Ignacio *et al.*, 1997).

Über die Signaltransduktion nach Aktivierung der cNOS besteht folgende Vorstellung:

Die aktivierte cNOS spaltet unter Bildung von Citrullin aus der Aminosäure L-Arginin NO ab, welches zur Zielzelle frei diffundieren kann. In der glatten Muskelzelle aktiviert NO die lösliche Guanylatzyklase (sGC), die ihrerseits Guanosin-5'-Triphosphat zu zyklischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) umsetzt. Die Wirkung des cGMP wird über die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) vermittelt, die zelluläre Proteine phosphoryliert (Denninger und Marletta, 1999). Die NO/cGMP Signalkaskade vermittelt die meisten bisher bekannten NO-Wirkungen.

Neben den cGMP-abhängigen Effekten wurden an glatten Gefäßmuskelzellen Hinweise auf cGMP-unabhängigen NO-Wirkungen beobachtet. Diese werden über eine NO-abhängige Nitrosylierung von zellulären Proteinen vermittelt (Denninger und Marletta, 1999). So wurde

gezeigt, daß kalziumabhängige Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ ) cGMP-unabhängig aktiviert werden können (Bolotina *et al.*, 1994). Neuere Arbeiten sprechen für eine cGMP-unabhängige Modulation nicht nur der schnelleitenden  $K_{Ca}$  (Onoue und Katusic, 1997; Mistry und Garland, 1998; Plane *et al.*, 1998; Sampson *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2000) sondern auch der spannungsabhängigen Kaliumkanäle ( $K_V$ ) (Sampson *et al.*, 2001).

Zur Untersuchung der Rolle von NO in der zerebralen Zirkulation werden Nitroverbindungen des Arginins als Enzymhemmer verwendet. Dabei erzeugt z.B.  $N^0$ -nitro-L-arginin methyl ester (L-NAME) eine reversible Blockade, während  $N^0$ -nitro-L-arginin (L-NNA) eine irreversible Blockade der NOS hervorruft. Argininanaloge sind allerdings hinsichtlich ihrer Unterscheidung zwischen der eNOS und der nNOS nicht spezifisch. Selektive Blocker sind derzeit lediglich für die nNOS vorhanden. Diese Hemmstoffe, wie z.B. 7 Nitroindazol (7 NI), sind bezüglich ihrer Spezifität jedoch nicht unumstritten (Faraci und Heistad, 1998).

Auf Ebene des cGMP kann die Signaltransduktion durch Hemmung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) untersucht werden. Die sGC kann durch Substanzen wie Methylenblau (MB) und 6-anilino-5,8-quinolinedion (LY-83583) blockiert werden. Diese Substanzen weisen jedoch Nebenwirkungen auf, die ihre Spezifität einschränken und die Interpretation der damit durchgeführten Untersuchungen erschweren. So soll MB die NO-abhängige Vasodilatation durch Erzeugung von Sauerstoffradikalen verhindern (Wolin *et al.*, 1990; Marczin *et al.*, 1992; Kontos und Wei, 1993) und die NOS direkt inhibieren (Mayer *et al.*, 1993). Ebenso gibt es bezüglich der Wirkung von LY-83583 Hinweise für die Generierung von Sauerstoffradikalen (Gidari *et al.*, 1989; Barbier *et al.*, 1992; Kontos und Wei, 1993) und für eine direkte Hemmung der eNOS (Mulsch *et al.*, 1988).

Eine erst in den vergangenen Jahren entwickelte Substanz, das ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a]quinoxalin-1-eins) führt dagegen zu einer spezifischen Hemmung der sGC (Garthwaite *et al.*, 1995; Moro *et al.*, 1996). Neuere Untersuchungen von Feelisch *et al.* (1999) geben zwar Hinweise auf eine mögliche Unspezifität dieses Hemmstoffes. Dennoch bleibt ODQ die derzeit selektivste Substanz zur Hemmung der sGC und eignet sich vor allem zur Untersuchung der biologischen Funktionen von cGMP *in vitro* (Hobbs, 1997).

- **Rolle der NOS bei der Regulation des zerebralen Ruheblutflusses**

NOS-Inhibitoren senken den zerebralen Ruheblutfluß um 15-30% (Iadecola, 1992; Dirnagl *et al.*, 1993). Diese Abnahme scheint auf einem rein vaskulären Effekt zu beruhen, da unter NOS-Blockade keine Abnahme der Glukoseutilisation beobachtet wurde (Iadecola und Xu, 1994).

Untersuchungen in vivo haben gezeigt, daß die Reduktion des zerebralen Ruheblutflusses unter dem nNOS-Blocker 7 NI in etwa der Wirkung unspezifischer NOS-Blocker entspricht (Wang *et al.*, 1995; Okamoto *et al.* 1997; Lindauer *et al.*, 1999). Diese Daten weisen auf eine signifikante Beteiligung der nNOS bei der Regulation des Ruheblutflusses hin. Untersuchungen an eNOS knockout Mäusen konnten jedoch keine Abnahme des zerebralen Ruheblutflusses unter unspezifischer NOS-Blockade feststellen, so daß eine Beteiligung der eNOS am zerebralen Ruheblutfluss nicht ausgeschlossen werden kann (Ma *et al.*, 1996; Ayata *et al.*, 1996).

- **Rolle der NOS bei der Vermittlung zerebrovaskulärer Antworten**

Mit der Identifikation von NO als EDRF wurde innerhalb kurzer Zeit evident, daß NO an der Vermittlung einer Vielzahl von zerebrovaskulären Antworten beteiligt ist. Dazu zählen u.a. die Vasodilatation auf Hyperkapnie (Iadecola *et al.*, 1994), extrazelluläre Azidose (Niwa *et al.*, 1993), Adenosin (Ko *et al.*, 1990), extrazelluläres K<sup>+</sup> (Dreier *et al.*, 1995) sowie die regionale Blutflußantwort nach funktioneller Stimulation (Lindauer *et al.*, 1996). Von seinen Eigenschaften her schien NO ein idealer Kandidat für die Vermittlung zerebrovaskulärer Antworten zu sein: es wird von Neuronen und von Astrozyten nach glutamaterger Stimulation freigesetzt, kann frei diffundieren, hat eine kurze Halbwertszeit und ist ein potenter Vasodilatator (Iadecola, 1993). Dennoch scheint NO an den einzelnen zerebrovaskulären Antworten keine einheitliche Funktion zu haben: während NO bei der endothelabhängigen Vasodilatation auf Acetylcholin vermehrt ausgeschüttet wird und die Vasodilatation vermittelt, scheint für die Vasodilatation auf Azidose lediglich das Vorhandensein eines basalen NO-Spiegels auszureichen (Iadecola und Zhang, 1996).

Zur Erklärung der unterschiedlichen Funktionen von NO/cGMP bieten sich zwei Modelle an:

- Das NO/cGMP-System agiert als **Mediator** der zerebralen Blutflußantwort: auf ein Stimulus hin wird NO vermehrt produziert, welches zur glatten Muskelzelle frei diffundiert. In der glatten Gefäßmuskelzelle wird die lösliche Guanylatzyklase stimuliert und führt über einen Anstieg des cGMP-Spiegels zu einer Vasodilatation des Gefäßes.
- Das NO/cGMP-System agiert als **Modulator/Verstärker** der zerebralen Blutflußantwort: dabei gewährleistet der basale NO/cGMP-Spiegel, eine optimale Wirkung der freigesetzten Mediatoren. Das NO bzw. das cGMP üben hierbei eine **permissive** Wirkung aus. Experimentell bedeutet dieses, daß die unter NOS-Blockade verminderte/aufgehobene Blutflußantwort auf exogene Stimuli durch Wiederherstellung des basalen NO/cGMP-Spiegels erneut ausgelöst werden kann.

In den letzten Jahren wurden diese Hypothesen intensiv untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß NO bei einer Vielzahl von zerebrovaskulären Reaktionen eine **permissive** Funktion innehat. Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, daß die unter NOS-Blockade verminderte funktionelle Blutflußantwort nach physiologischer Stimulation durch Restitution eines basalen NO-Spiegels wiederhergestellt werden kann. Die experimentellen Daten weisen somit darauf hin, daß NO nicht nur bei der Vasodilatation auf Azidose, sondern auch während funktioneller Aktivierung (neurovaskuläre Kopplung) die Rolle eines **Verstärkers/Modulators** einnimmt. Das daran beteiligte NO scheint dabei am ehesten neuronalen Ursprungs zu sein (Lindauer *et al.*, 1999).

Daneben wirkt NO als **Modulator** bei der zerebralen Vasodilatation auf extern appliziertes Kalium in vivo (Dreier *et al.*, 1996) und auf Hyperkapnie/Azidose (Iadecola *et al.*, 1994; Niwa *et al.*, 1993; Lindauer *et al.*, 2001). Als mögliche Mechanismen zur Vermittlung dieser Reaktionen durch NO bzw. cGMP wurde eine Nitrosylierung bzw. Phosphorylierung zellulärer Proteine z.B. an Kaliumkanälen beschrieben. Die Nitrosylierung bzw. Phosphorylierung zellulärer Proteine an Kaliumkanälen führt zu einer Konformationsänderung und zu deren Aktivierung. Diese Mechanismen wurden bisher hauptsächlich an dissoziierten Gefäßmuskelzellen in vitro beschrieben. Es ist jedoch anzunehmen, daß diese Mechanismen an der Vermittlung der o.g. zerebrovaskulären Reaktionen und somit auch an der Vasodilatation auf Azidose eine wichtige Rolle spielen.

Um einen möglicherweise allgemeinen Mechanismus der Leitfähigkeitserhöhung von Kaliumkanälen durch das NO/cGMP-System zu untersuchen, habe ich im Rahmen meiner Doktorarbeit die extrazelluläre Azidose als Modell für einen NO-abhängigen vasodilatatorischen Stimulus verwendet und funktionelle Untersuchungen an perfundierten zerebralen Gefäßen durchgeführt. Im nächsten Kapitel wird daher zunächst ein aktueller Überblick über mögliche Mechanismen der azidotischen Vasodilatation zerebraler Arterien gegeben.

## 1.4. Die Azidose und die zerebrale Blutflußregulation

Azidotische pH-Veränderungen gehören neben der Hypoxie zu den potentesten chemischen Reizen zur Steigerung der Hirndurchblutung (Paulson *et al.*, 1990). Der Zusammenhang zwischen einer Azidose und der Vasodilatation zerebraler Gefäße wurde erstmals von Gaskell (1880) beschrieben. Eine Dilatation pialer Gefäße unter Hypoventilation wurde allerdings schon 1841 von Donders in einer Präparation mit einem kraniellen Fenster beobachtet. Roy und Sherrington publizierten im Jahre 1890 eine seitdem vielzitierte Arbeit über die Regulation des zerebralen Blutflusses. Darin stellten sie die Hypothese auf, daß der zerebrale Blutfluß mit den metabolischen Erfordernissen des Gehirns korreliert. Azidotische pH-Veränderungen wurden in dieser Arbeit als sehr potente vasodilatatorische Stimuli beschrieben. Neben ihrer Bedeutung unter physiologischen Bedingungen spielt die Azidose auch unter pathophysiologischen Bedingungen eine wichtige Rolle. So gehören pH-Veränderungen zu den ersten Ereignissen während einer fokalen zerebralen Ischämie (Mabe *et al.*, 1983).

Obwohl die Vasodilatation auf Azidose zu den ältesten beschriebenen zerebrovaskulären Reaktionen gehört, ist bis heute nicht bekannt, wie die Vasodilatation zerebraler Gefäße auf Azidose vermittelt wird. Die Erforschung der Mechanismen, die der azidotischen Vasodilatation zerebraler Gefäße zugrundeliegen, ist aus mehreren Gründen aufschlußreich. Auf der einen Seite ist die Azidose als NO-abhängiger Modell-Stimulus zur Aufklärung der Mechanismen der zerebralen Blutflußregulation und der neurovaskulären Kopplung unter physiologischen Bedingungen relevant. Auf der anderen Seite ist die Identifikation dieser Mechanismen Voraussetzung dafür, Störungen der zerebralen Blutflußregulation und der neurovaskulären Kopplung unter pathophysiologischen Bedingungen, wie sie z.B. im Rahmen der zerebralen Ischämie vorkommen, untersuchen und mögliche therapeutische Konsequenzen daraus abzuleiten zu können.

- **Mechanismen der Tonusregulation glatter Muskelzellen unter Azidose**

Während der extrazelluläre pH-Wert  $[pH]_o$  glatter Gefäßmuskelzellen relativ konstant bei Werten um 7,4 liegt, bewegt sich der intrazelluläre pH-Wert  $[pH]_i$  in einem Bereich von 7,1-7,3 (Smith *et al.*, 1998). Experimente an zerebralen Arterien haben gezeigt, daß unter Azidose vor allem ein Abfall des  $[pH]_o$  für die Dilatation dieser Arterien verantwortlich ist (Tian *et al.*, 1995). Die Signaltransduktion beginnend mit der Veränderung des  $[pH]_o$  bis hin zur Vasodilatation ist

im Detail noch nicht bekannt. Die gemeinsame Endstrecke pH-induzierter Tonusveränderungen ist die Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  glatter Gefäßmuskelzellen. Die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wird hauptsächlich über spannungsabhängige Kalziumkanäle (VOC) reguliert. In der glatten Muskelzelle existieren mindestens zwei Typen von VOC: Kanäle vom T- und vom L-Typ. Der pH-modulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom erfolgt überwiegend über VOC vom L-Typ (Austin und Wray, 2000). Eine Membranhyperpolarisation korreliert dabei positiv mit einer Inaktivierung der VOC. Dadurch nimmt der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  ab und führt über eine verminderte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zu einer Tonusabnahme der glatten Muskelzellen. Dieser Mechanismus wird auch für die Vasodilatation zerebraler Arterien auf Azidose vermutet. Elektrophysiologische Daten haben gezeigt, daß gleichermaßen unter hyper- und hypokapnischer Azidose eine Membranhyperpolarisation erfolgt. Die beobachtete Vasodilatation verläuft dabei linear zu der Veränderung des Membranpotentials und der pH-Abnahme (Dietrich und Dacey, 1994). Eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Gefäßdurchmesser und dem  $[\text{pH}]_o$  wurde nicht nur an zerebralen Gefäßen sondern auch in anderen Gefäßbetten beschrieben (Austin und Wray, 1995).

- **Azidose und NO**

Untersuchungen *in vivo* haben gezeigt, daß die hyperkapnische Vasodilatation (Iadecola, 1992) und die Vasodilatation auf extrazelluläre Azidose (Niwa *et al.*, 1993) unter Blockade der NOS signifikant vermindert sind. Durch Wiederherstellung eines basalen NO- (Iadecola *et al.*, 1994) und cGMP-Spiegels (Iadecola und Zhang, 1996) konnte die hyperkapnische Vasodilatation *in vivo* restituiert werden. Diese Daten weisen auf eine modulatorische Rolle des NO/cGMP-Systems bei diesen Reaktionen hin. Andere *in vivo* Studien haben unter hyperkapnischer Azidose einen erhöhten cGMP-Gehalt vorgefunden. Ein erhöhter cGMP-Gehalt deutet hingegen eher auf eine Mediator-Rolle des cGMP hin (Irikura *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1999). Bei noch nicht aufgeklärter Signaltransduktion und ausstehenden cGMP-Messungen auf Ebene der glatten Muskelzellen sprechen diese Befunde nach Ansicht der Autoren jedoch nicht gegen eine permissive Rolle des cGMP an der hyperkapnischen Azidose (Wang *et al.*, 1999). Experimente *in vitro* an der A. basilaris der Ratte haben dagegen keinen Anstieg der cGMP-Konzentration unter Azidose gefunden und sprechen somit für eine permissive Rolle des NO/cGMP-Systems an der hyperkapnischen Vasodilatation (You *et al.*, 1994). Die permissive Rolle des NO an der Vasodilatation auf Azidose wird weiterhin durch funktionelle Untersuchungen an der MCA der Ratte unterstützt (Lindauer *et al.*, 2001). Letztere bilden die Grundlage für die funktionelle

Untersuchung der Rolle des cGMP an der Vasodilatation auf Azidose in der vorliegenden Arbeit. Das Endothel scheint bei der Azidoseantwort großer zerebraler Gefäße wie der A. basilaris und der MCA eine untergeordnete Rolle zu spielen (You *et al.*, 1994; Lindauer *et al.*, 2001). An pialen Gefäßen, bei denen das Endothel zerstört wurde, konnte in vivo eine ebenfalls unveränderte Azidoseantwort beobachtet werden (Wang *et al.*, 1994). Im Bereich der Arteriolen war dagegen die Azidosereaktivität nach Entfernen des Endothels vermindert (Horiuchi *et al.*, 2002). Diese Daten zeigen, daß bei der Untersuchung von Gefäßen verschiedener Größenordnung erhebliche Unterschiede bestehen können.

Geht man davon aus, daß das NO/cGMP-System an der Vasodilatation auf Azidose eine permissive Rolle einnimmt, stellt sich die Frage nach den eigentlichen Mediatoren der Vasodilatation. Aufgrund der starken Abhängigkeit der VOC vom Membranpotential kommen vor allem jene Mechanismen in Frage, die das Membranpotential beeinflussen. Dieses trifft insbesondere für die Kaliumkanäle zu, die wichtige Determinanten des Membranpotentials sind (Nelson und Quayle, 1995). Experimentelle Daten, die eine Modulation der Kaliumkanäle durch das NO/cGMP-System nahelegen, wurden in unterschiedlichen Systemen in vitro gewonnen. In diesem Zusammenhang wurden folgende Mechanismen beschrieben:

- a) direkte Modulation von Kaliumkanälen durch Nitrosylierung (Bolotina *et al.*, 1994; Mistry und Garland, 1998; Plane *et al.*, 1998; Lang *et al.*, 2000 ; Sampson *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2002)
- b) cGMP-abhängige Modulation von Kaliumkanälen durch Phosphorylierung über die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) (Robertson *et al.*, 1993; Archer *et al.*, 1994; Fukao *et al.*, 1999)
- c) indirekte cGMP-abhängige Modulation der BK<sub>Ca</sub> über eine Modulation der Ca<sup>2+</sup>-Sparks (Porter *et al.*, 1998)

Diese Untersuchungen wurden hauptsächlich an dissoziierten Gefäßmuskulzellen durchgeführt. Eine funktionelle Untersuchung an zerebralen Gefäßen zum Nachweis dieser Mechanismen im Rahmen der Vasodilatation zerebraler Gefäße auf Azidose ist bisher jedoch nicht erfolgt.

- **Kaliumkanäle an glatten Gefäßmuskelzellen zerebraler Arterien**

Das Membranpotential glatter Muskelzellen liegt bei  $-37,5$  bis  $-55$  mV (Dietrich und Dacey, 1994; Knot und Nelson, 1998; Peng *et al.*, 1998) und wird größtenteils von der Aktivität der Kaliumkanäle bestimmt. Änderungen des Membranpotentials um nur wenige mV können die Leitfähigkeit der VOC verändern und erhebliche Auswirkungen auf den Vasotonus haben (Nelson *et al.*, 1990). An glatten Muskelzellen zerebraler Gefäße wurden im wesentlichen folgende Kaliumkanalfamilien beschrieben: kalziumabhängige Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ ), ATP-sensitive Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ ), spannungsabhängige Kaliumkanäle ( $K_V$ ) und einwärts gleichrichtende (rektifizierende) Kaliumkanäle der Klasse 2.1 (inward rectifier,  $K_{ir}$ ) (Nelson und Quayle, 1995). Die Rolle dieser Kanäle bei der zerebralen Blutflußregulation wird im folgenden unter Berücksichtigung einer Modulation durch das NO/cGMP-System und ihrer Funktion bei der azidotischen Vasodilatation besprochen. Die Daten aus der zerebralen Zirkulation, werden durch Befunde aus anderen Gefäßbetten ergänzt.

Über die oben erwähnten Kaliumkanäle hinaus wurden in letzter Zeit weitere Klassen von Kaliumkanäle beschrieben. Einige dieser Kaliumkanalfamilien, wie z.B. die pH-sensitiven RACTK 1 Kanäle, wurden an zerebralen Gefäßen des Kaninchens nachgewiesen. Es handelt sich hierbei um einwärts gleichrichtende Kanäle, die durch Bariumchlorid gehemmt werden (Suzuki *et al.*, 1995). Die funktionelle Rolle dieser Kanäle ist im einzelnen jedoch noch nicht bekannt.

### **Kalziumabhängige Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ )**

Unter den Isoformen dieser Kanäle sind in der zerebralen Gefäßregulation vor allem die schnelleitenden  $K_{Ca}$ , auch „big“  $K_{Ca}$  ( $BK_{Ca}$ ) oder „maxi“  $K_{Ca}$  genannt, von Bedeutung. Die  $BK_{Ca}$  bestehen aus einer spannungssensitiven  $\alpha$ - und einer  $Ca^{2+}$ -sensitiven  $\beta 1$ -Untereinheit (Nelson und Quayle, 1995). Daraus erklärt sich die Spannungs- und Kalziumabhängigkeit dieser Kanäle: die  $BK_{Ca}$  werden sowohl durch eine Membrandepolarisation als auch durch lokale Kalziumausstöße aus dem sarkoplasmatischen Retikulum ( $Ca^{2+}$ -Sparks) aktiviert. Die Regulation der  $BK_{Ca}$  durch  $Ca^{2+}$ -Sparks wurde erst kürzlich beschrieben.  $Ca^{2+}$ -Sparks werden über ryanodinsensitive Kalziumkanäle aus dem sarkoplasmatischen Retikulum ausgeschüttet und durch Ryanodinrezeptoren reguliert. Die  $Ca^{2+}$ -Sparks modulieren ihrerseits die  $\beta 1$ -Untereinheit der  $BK_{Ca}$ , aktivieren diese Kanäle und führen über die Hyperpolarisation des Membranpotentials

zur Vasodilatation des Gefäßes (Brenner *et al.*, 2000). Durch die Nähe des sarkoplasmatischen Retikulums zur Zellmembran können  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks hohe lokale Kalziumkonzentrationen (10-100  $\mu\text{M}$ ) erzeugen. Diese sind ausreichend, um die  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  zu aktivieren, sind allerdings zu schwach, um weiter entfernte  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Strukturen zu beeinflussen oder die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zu erhöhen (Nelson *et al.*, 1995; Knot *et al.*, 1998). Durch die Öffnung der  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  wird das Membranpotential glatter Muskelzellen hyperpolarisiert und die Aktivität der VOC gehemmt. Ein einzelner  $\text{Ca}^{2+}$ -Spark soll eine Hyperpolarisation von bis zu - 20 mV erzeugen (Ganitkevitch und Isenberg, 1990). Die Frequenz der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks wird durch zyklische Nukleotide wie cGMP und cAMP erhöht (Porter *et al.*, 1998) und durch Vasokonstriktoren verringert (Bonev *et al.*, 1997). Die Ryanodinrezeptoren und somit die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks, die durch Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aktiviert werden, bilden zusammen mit den VOC und den  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  eine funktionelle Einheit zur Regulation des Gefäßtonus zerebraler Arterien (Jaggar *et al.*, 1998). Diese funktionelle Einheit scheint auch an humanen Zerebralarterien eine wichtige Rolle zu spielen (Wellman *et al.*, 2002).

Experimentell können die  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  durch 1 mM Tetraethylammonium (TEA) spezifisch gehemmt werden. Eine wesentlich höhere Spezifität weisen Charybdotoxin (CHTX) und Iberiotoxin (IBTX) in einer jeweiligen Konzentration von 100 nM auf (Nelson und Quayle, 1995).

Funktionell sind die  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  großer Zerebralarterien unter Ruhebedingungen aktiv und am Ruhetonus beteiligt. Eine Inhibition der  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  erzeugt eine Hypopolarisation und eine Vasokonstriktion dieser Gefäße (Brayden und Nelson, 1992).

Bezüglich einer Modulation durch NO sprechen experimentelle Befunde sowohl für eine direkte Modulation durch NO als auch für eine Modulation auf Ebene des cGMP. Elektrophysiologische Messungen an glatten Muskelzellen aus der Aorta des Kaninchens konnten eine direkte, cGMP-unabhängige Aktivierung der  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  durch NO nachweisen. Als Mechanismus wurde eine Nitrosylierung von Sulfhydrylgruppen vermutet (Bolotina *et al.*, 1994). Eine mögliche Angriffstelle bilden Cysteinreste auf der zytosolischen Seite der  $\alpha$ -Untereinheit der  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ . Diese wurden an glatten Muskelzellen der *Taenia caeci* des Schweines identifiziert (Lang *et al.*, 2000).

Auf Ebene des cGMP wurden Hinweise sowohl für eine direkte, als auch für eine indirekte Kanalmodulation gefunden. Eine direkte Wirkung über die Phosphorylierung des Kanals durch die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) wurde von Robertson *et al.* (1993) und von Fukao *et al.* (1999) beschrieben. Die indirekte Wirkung wird über die bereits beschriebene Steigerung der Frequenz der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks vermittelt (Porter *et al.*, 1998). Während die indirekte Wirkung über  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks die Kanalaktivität bis auf das dreifache steigern kann, scheint die direkte Wirkung auf die  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  wesentlich geringer zu sein (Jaggar *et al.*, 2000).

Elektrophysiologische Daten weisen darauf hin, daß die Leitfähigkeit der  $\text{K}_{\text{Ca}}$  an glatten

Muskelzellen von Herzkranzgefäßen durch Azidose erhöht wird (Hayabuchi *et al.*, 1998). Interessanterweise zeigen Hayabuchi *et al.* (1998), daß die Vasodilatation koronarer Gefäße auf Azidose sowohl über die  $K_{Ca}$  als auch über die  $K_{ATP}$  vermittelt wird.

Eine Beteiligung der  $K_{Ca}$  an der Vasodilatation zerebraler Gefäße auf Azidose wurde bisher nicht beschrieben. Dennoch enthält die Arbeit von Wang *et al.* (1998) Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der  $K_{Ca}$  an der Vasodilatation zerebraler Gefäße auf Azidose (Siehe Kapitel 5.9).

### **ATP-sensitive Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ )**

$K_{ATP}$  werden durch ATP gehemmt und durch ADP aktiviert. Dadurch kommt den  $K_{ATP}$  eine besondere Rolle bei der metabolischen Blutflußregulation zu. Die  $K_{ATP}$  bestehen aus einem Sulphonylharnstoffrezeptor und einem schwach einwärts gleichrichtenden Kanal der Klasse 6.0. Die Inaktivierung der  $K_{ATP}$  durch ATP in physiologischen Konzentrationen spricht für eine geringe Aktivität dieser Kanäle unter Ruhebedingungen.  $K_{ATP}$  werden durch Sulphonylharnstoffe wie Glibenclamid in einer Konzentration bis zu 10  $\mu$ M spezifisch blockiert. Zu den Kanalöffnern der  $K_{ATP}$  gehören Cromakalim und Pinacidil (Nelson und Quayle, 1995).

$K_{ATP}$  sind Ziel zahlreicher endogener Vasodilatoren und Vasokonstriktoren (Quayle *et al.*, 1997). Dabei konnte beobachtet werden, daß die Wirkung der Vasodilatoren hauptsächlich über die Produktion von cAMP und letztlich über die Proteinkinase A (PKA) vermittelt wird. Vasokonstriktoren führen dagegen zu einer Hemmung der  $K_{ATP}$  über die Proteinkinase C (PKC) (Quayle *et al.*, 1997). Weiterhin sprechen elektrophysiologische Daten für eine Aktivierung der  $K_{ATP}$  durch cGMP (Kubo *et al.*, 1994; Murphy und Brayden, 1995). Neben der Modulation durch cGMP gibt es Hinweise für eine direkte pH-Modulation der Kanalaktivität. Dabei sollen die  $K_{ATP}$  durch einen pH-Abfall direkt aktiviert werden (Xu *et al.*, 2001). Funktionelle Experimente konnten die pH-abhängige Modulation der  $K_{ATP}$  bestätigen: ein Abfall des extrazellulären pH auf 7,2 ging mit einer verminderten Hemmung der  $K_{ATP}$  durch Lidocain einher (Kinoshita *et al.*, 2001).

An zerebralen Gefäßen konnte durch Experimente *in vivo* gezeigt werden, daß die hyperkapnische Vasodilatation pialer Gefäße unterschiedlicher Spezies unter Glibenclamid verringert ist (Faraci *et al.*, 1994; Kontos und Wei, 1996; Rosenblum *et al.*, 2001). Experimente *in vitro* an der A. basilaris des Hundes (Kinoshita und Katusic, 1997) sowie an Arteriolen der Ratte (Horiuchi *et al.*, 2002) ergaben ebenfalls Hinweise auf eine wichtige Rolle der  $K_{ATP}$  bei der azidotischen Vasodilatation.

Im Gegensatz dazu haben andere Untersuchungen an der Ratte weder in vitro (Janigro *et al.*, 1997) noch in vivo (Wahl *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1998, Golding *et al.*, 2000a) Hinweise für eine Beteiligung der  $K_{ATP}$  an der Vasodilatation zerebraler Gefäße auf Azidose gefunden. Die Rolle der  $K_{ATP}$  an der Vasodilatation auf Azidose ist somit nicht vollständig aufgeklärt und wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

### **Einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle ( $K_{ir}$ )**

Die  $K_{ir}$  werden durch eine Hyperpolarisation des Membranpotentials aktiviert und weisen einen einwärts gerichteten Kaliumfluß auf. Sie unterscheiden sich damit wesentlich von anderen Kaliumkanalfamilien wie z.B. den  $K_{Ca}$  und den  $K_V$ . Letztere werden durch eine Membranhypopolarisation aktiviert und weisen einen auswärts gerichteten Kaliumfluß auf. Die Aktivität der  $K_{ir}$  ist vom Membranpotential  $E_m$  sowie von der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration abhängig. Ein prinzipiell möglicher auswärts gerichteter Kaliumstrom wird unter physiologischen Bedingungen durch intrazelluläre  $Mg^{2+}$ -Ionen und spannungs- sowie pH-abhängig durch Polyamine inhibiert. Die Effektivität dieser Blockade variiert allerdings mit der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration  $[K^+]_e$ : so kann bei einer unphysiologisch hohen  $[K^+]_e$  dennoch ein Auswärtsstrom durch diese Kanäle gemessen werden (Quayle *et al.* 1997).

An glatten Muskelzellen zerebraler Arterien konnte die Isoform  $K_{ir}$  2.1 nachgewiesen werden (Nelson und Quayle, 1995). Die  $K_{ir}$  werden spezifisch durch Bariumionen ( $Ba^{2+}$ ) in einer Konzentration  $< 50 \mu M$  gehemmt. Diese Hemmung ist spannungsabhängig und nimmt mit negativem Membranpotential ( $E_m$ ) zu (Quayle *et al.*, 1997).

Die  $K_{ir}$  sind an der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials und am Ruhetonus zerebraler Gefäße beteiligt (Quayle *et al.*, 1993). Dieses wurde vor allem an Arteriolen und an kleineren Arterien beobachtet. Funktionelle Untersuchungen am Hauptstamm der MCA sprechen für eine mögliche Beteiligung der  $K_{ir}$  am Ruhetonus auch in diesem Gefäßabschnitt (Johnson *et al.*, 1998). Eine Beteiligung der  $K_{ir}$  an der Vasodilatation zerebraler Gefäße auf Azidose ist bisher nicht beschrieben worden.

Eine wichtige Rolle wurde diesen Kanälen in der neurovaskulären Kopplung zugesprochen. Eine Erhöhung der  $[K^+]_e$  im Bereich von 5-20 mM führt zur Hyperpolarisation glatter Muskelzellen und somit zu einer Dilatation zerebraler Arterien (Johnson *et al.*, 1998; Chrissobolis *et al.*, 2000; Schuh-Hofer *et al.*, 2001). Da bei neuronaler Aktivität eine Erhöhung der  $[K^+]_e$  in diesem

Bereich erfolgt, zählen die  $K_{ir}$  zu den potentiellen Vermittler der neurovaskulären Kopplung (Zaritsky *et al.*, 2000).

### **Spannungsabhängige Kaliumkanäle ( $K_V$ )**

$K_V$  werden durch Membrandepolarisation aktiviert und sollen bei der Limitierung der Membrandepolarisation glatter Gefäßmuskelzellen eine wichtige Rolle einnehmen. In vitro durchgeführte Studien an isolierten Gefäßmuskelzellen der Ratte schreiben den  $K_V$  eine Beteiligung an der Regulation des Ruhemembranpotentials und des basalen Gefäßtonus zu (Robertson und Nelson, 1994). Pharmakologisch werden die  $K_V$  durch 1 mM 4 Aminopyridin (4 AP) spezifisch gehemmt (Nelson und Quayle, 1995).

An der A. basilaris der Ratte wurden Hinweise für eine Modulation der  $K_V$  durch das NO/cGMP-System gefunden (Sobey und Faraci, 1999). Darüber hinaus sprechen elektrophysiologische Messungen für eine Aktivitätserhöhung der  $K_V$  unter extrazellulärer Azidose (Bonnet *et al.*, 1991). Eine Beteiligung der  $K_V$  an der Vasodilatation zerebraler Arterien auf Azidose wurde in funktionellen Untersuchungen bisher weder in vivo noch in vitro nachgewiesen. An koronaren Gefäßen sollen dagegen die  $K_V$  an der Vasodilatation auf Azidose beteiligt sein (Berger *et al.*, 1998).

- **Die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase**

Die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ist für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials glatter Gefäßmuskelzellen verantwortlich und könnte somit an der Regulation des Ruhedurchmessers und der Gefäßreaktivität teilnehmen (Blaustein, 1993). Die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase kann durch Herzglykoside wie z.B. durch g-Strophanthin (Ouabain) in einer Konzentration von 0,5 mM gehemmt werden (McCarron und Halpern, 1990).

In der Literatur lassen sich Hinweise für eine Beteiligung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase an der neurovaskulären Kopplung finden. So berichten Nguyen *et al.* (2000) über eine Beteiligung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase an der Vasodilatation zerebraler Arteriolen auf eine Erhöhung der [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub> auf 5-10 mM. Als Mechanismus wird die Aktivierung der K<sub>ATP</sub> als Folge eines ATP-Verbrauchs durch die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase vermutet.

Weiterhin gibt es Hinweise auf eine Modulierung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase durch NO. Diese Modulation soll sowohl über einen cGMP-abhängigen (Rapoport *et al.*, 1985) als auch über einen cGMP-unabhängigen Mechanismus erfolgen (Gupta *et al.*, 1994). Weiterhin weisen funktionelle Untersuchungen auf eine mögliche Beteiligung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase an der Vasodilatation zerebraler Arterien auf Azidose hin (Toda *et al.*, 1989).

## 2. Zusammenfassung und Herleitung der Aufgabenstellung

Die Mechanismen der Vasodilatation auf Azidose sind derzeit nicht vollständig geklärt. Der Tonus glatter Gefäßmuskelzellen hängt von der intrazellulären Kalziumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  ab. Die  $[Ca^{2+}]_i$  ist ihrerseits von der Aktivität spannungsabhängiger Kalziumkanäle (VOC) abhängig. Die Aktivität der VOC wird vom Membranpotential bestimmt. Dabei geht eine Membranhypopolarisation mit einer Aktivitätszunahme der VOC und einem erhöhten Gefäßtonus einher. Eine Membranhyperpolarisation hat dagegen eine Inaktivierung der VOC und eine Abnahme des Gefäßtonus zur Folge (Austin und Wray, 2000). Dieser Mechanismus wird auch für die Tonusänderung zerebraler Gefäße während einer Veränderung des extrazellulären pH-Wertes vermutet: elektrophysiologische Messungen haben gezeigt, daß sowohl die hyperkapnische als auch die hypokapnische Azidose mit einer Membranhyperpolarisation einhergehen (Dietrich und Dacey, 1994). Somit gelten jene Faktoren, die das Membranpotential beeinflussen, als potentielle Kandidaten für die Vermittlung der Vasodilatation auf Azidose.

Tierexperimentelle Untersuchungen weisen darauf hin, daß die Vasodilatation auf Azidose primär vom basalen NO-Spiegel abhängig ist. Dabei nimmt das NO an dieser Reaktion eine permissive Rolle ein. Eine permissive Rolle wird auch für das cGMP, das in der Signalkaskade auf NO folgt, vermutet. Die bisherigen Untersuchungen in vitro über die Rolle des NO/cGMP-Systems an der Vasodilatation auf Azidose wurden allerdings sowohl auf Ebene des NO als auch auf Ebene des cGMP an unterschiedlichen Gefäßen verschiedener Spezies durchgeführt, so daß kein einheitliches Bild vorliegt. Darüber hinaus weisen die Substanzen Methylenblau und LY-83583, die bisher zur Blockade der löslichen Guanylatzyklase verwendet wurden, Nebenwirkungen auf, welche die Interpretation der Befunde erschweren.

Die Aktivität der Faktoren, welche die Vasodilatation zerebraler Arterien auf Azidose vermitteln, hängt somit von einem basalen NO-Spiegel ab. Als mögliche Kandidaten für die Vermittlung der Vasodilatation auf Azidose bieten sich die Kaliumkanäle glatter Gefäßmuskelzellen an. Schon geringe Änderungen der Kanalaktivität können große Auswirkungen auf das Membranpotential und den Tonus glatter Gefäßmuskelzellen haben (Nelson und Quayle, 1995). Weiterhin sprechen viele Hinweise dafür, daß die Leitfähigkeit der Kaliumkanäle durch das NO/cGMP-System moduliert wird. Funktionelle Untersuchungen über die Rolle der Kaliumkanäle an der azidotischen Vasodilatation zerebraler Gefäße haben unterschiedliche, teils widersprüchliche Resultate erbracht. Diese können einerseits auf speziesbedingten Unterschieden beruhen, können andererseits durch eine unterschiedliche Kanalexpression und -aktivität der jeweiligen Kaliumkanalfamilien in den untersuchten Gefäßbetten bedingt sein. So bestehen beispielsweise

nicht nur Unterschiede zwischen dem koronaren und dem zerebralen Gefäßbett, sondern auch zwischen der Kanalaktivität unterschiedlicher zerebraler Gefäße, wie z.B. zwischen den Arteriolen der A. cerebri media und der A. basilaris (Horiuchi *et al.*, 2001).

Aufbauend auf vorausgegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe war es somit Ziel meiner Doktorarbeit, in einem einheitlichen System an der isolierten und perfundierten A. cerebri media der Ratte, ein vollständiges Bild über die cGMP-Abhängigkeit der Vasodilatation auf Azidose und über die Rolle der Kaliumkanäle an dieser Reaktion zu gewinnen.

Im Einzelnen habe ich mich mit der Untersuchung folgender Hypothesen beschäftigt:

1. Die NO-abhängige Modulation der Vasodilatation zerebraler Arterien auf Azidose erfolgt hauptsächlich über das cGMP.
2. Die Vasodilatation auf Azidose wird primär über Kaliumkanäle vermittelt. Dabei läßt sich aus den bisher publizierten Daten vermuten, daß sowohl  $K_{ATP}$  als auch  $K_{Ca}$  an dieser Reaktion beteiligt sind.
3. Die  $Na^+/K^+$ -ATPase ist an der Vermittlung der Vasodilatation auf Azidose nicht beteiligt.

### 3. Materialien und Methoden

Untersuchungen an isolierten Zerebralarterien haben sich als Modell zur Erforschung von Regulationsmechanismen der Gehirnperfusion bewährt. Während im Tierexperiment die beobachtete Gefäßdilataion Ausdruck verschiedener, aufeinander abgestimmter und gleichzeitig ablaufender Prozesse ist, existieren im Modell der isolierten Arterie definierte und standardisierte Kompartimente. Diese bestehen aus der Arterie selbst und einem dichten perivaskulären Nervengeflecht. Dadurch ist eine durch parenchymale Einflüsse ungestörte Untersuchung der Vasodilatation zerebraler Gefäße auf Azidose möglich. Im Gegensatz dazu kann im Tierexperiment aufgrund der engen Nachbarschaft zerebraler Gefäße mit der Neuroglia und den Neuronen nur schwer zwischen metabolischen, neuronalen und astrozytären Einflüssen auf das untersuchte Gefäß unterschieden werden. Die Überschaubarkeit der gegebenen Faktoren *in vitro* erlaubt eine optimale Standardisierung der Untersuchungsbedingungen und die Identifizierung der auf den glatten Gefäßmuskelzellen einwirkenden Faktoren. Bei der Untersuchung isolierter Arterien haben sich zwei grundsätzliche Untersuchungstechniken etabliert: Untersuchungen an nichtperfundierten, ringförmigen Arteriensegmenten und Untersuchungen an perfundierten Arterien. Die Unterschiede zwischen diesen beiden Ansätzen werden im Kapitel 3.3 besprochen.

Die Ergebnisse meiner Doktorarbeit habe ich an perfundierten Zerebralarterien der Ratte gewonnen. Dabei habe ich ausschließlich den Hauptstamm der A. cerebri media verwendet.

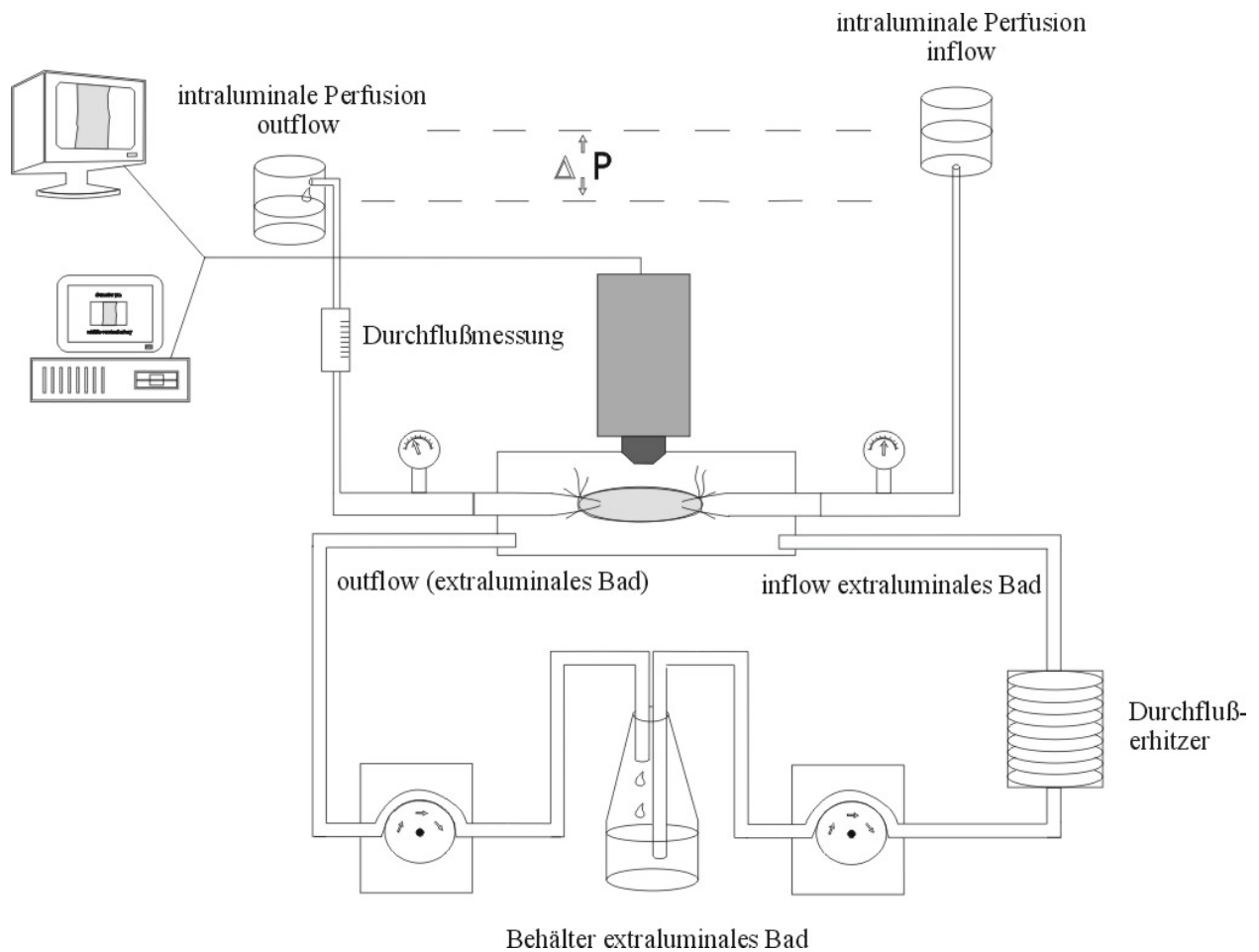
#### 3.1. Modellbeschreibung

Ziel dieses Modells ist, experimentelle Bedingungen zu schaffen, die eine physiologische Gefäßreaktivität der Arterien gewährleisten. Voraussetzung für das Experiment ist eine möglichst sorgfältige Präparation eines ca. 1 cm langen Abschnittes aus dem Hauptstamm der MCA. Nach der Präparation (Kap. 3.2) wurde die Arterie mittels einer Pipette in die Arteriographenkammer übertragen, die mit eisgekühltem, physiologischen Puffer gefüllt war. Dort wurde sie auf den darin befindlichen Glaskapillaren aufgezoogen (Abbildung 1). Um ein Abrutschen von den Glaskapillaren zu vermeiden, wurde die Arterie mit einem 10/0 Operationsfaden befestigt. Das zwischen den Kapillaren befindliche MCA-Segment sollte eine Länge von ca. 1 mm haben, um eine einwandfreie Gefäßreaktivität entwickeln zu können (Bryan *et al.*, 1996). Neben der Länge spielen abzweigende Arterienabgänge eine wichtige Rolle. Diese

erzeugen im Versuchsablauf einen intraluminalen Druckabfall und gefährden die Reaktivität der Arterien. Neben der Auswahl eines geeigneten Arteriensegments können, abzweigende Arterienabgänge mit einem Operationsfaden abgebunden werden. Der MCA-Gefäßstamm hat eine optimale Reaktivität bei einem intraluminalen Druck von 60 - 120 mm Hg. Dieser Druck entspricht den physiologischen Gegebenheiten (Golding *et al.*, 1998).

Die an den Kapillaren befestigte Arterie wurde anschließend durch das Anheben des Inflow- und des Outflow-Behälters einem steigenden intraluminalen Druck ausgesetzt. Der intraluminale Druck wurde dabei innerhalb von 15 Minuten auf 80 mm Hg angehoben. Der in die Arteriographenkammer einströmende Puffer hatte eine Temperatur von ca. 4 °C. Dadurch war der Gefäßmetabolismus reduziert, sodass die Arterie druckpassiv gedehnt wurde. Um eine Erwärmung des Puffers in der Arterienkammer (extraluminale Bad) zu vermeiden, wurde dieser mit frisch gekühlter Pufferlösung kontinuierlich ausgetauscht.

Nach Aufbau des intraluminalen Druckes wurde der Durchflußerhitzer eingeschaltet und der extraluminale Puffer auf 37° C erwärmt. Darunter entwickelten die Arterien einen spontanen Gefäßmuskeltonus. Der Gefäßdurchmesser verringerte sich dabei auf Werte, die mindestens 20 % unterhalb des maximalen Durchmessers lagen. Diese spontane Reaktion erfolgte ohne Zugabe von Vasokonstriktoren und entspricht der im Rahmen der Autoregulation beschriebenen myogenen Reaktion. Sie wurde als Hinweis auf eine intakte Gefäßreaktivität gewertet. Die ursprünglich von Dacey und Duling (1982) beschriebene Methode wurde von Bryan *et al.* (1996) zu der nun vorliegenden Form modifiziert. In unserem Labor wurde die Methode weiterverändert. Dabei wurde die verwendete Pufferlösung in Anlehnung an Duling und Rivers (1986) mit MOPS (3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid) gepuffert. Zur intraluminalen Pufferlösung wurde 1% bovines Serumalbumin hinzugegeben. Die Zugabe von Serumalbumin dient der Integrität der endothelialen Zellen und der luminalen Matrix (Duling und Rivers 1986). Während des Versuches wurde der Arteriograph auf ein inverses Mikroskop gestellt. Über eine daran angeschlossene CCD-Kamera wurden kontinuierlich Bilder von der Arterie aufgenommen und auf den Bildschirm übertragen. Der Arterienradius wurde unter Ruhebedingungen sowie 1, 5 und 10 Minuten nach Einwaschen der azidotischen Pufferlösung am Bildschirm gemessen. Als Messparameter diente der innere Durchmesser der Arterie. Die Messungen wurden als online-Analyse am Bildschirm durchgeführt. Die Kamera war an einem Computer angeschlossen, auf den die Arterienbilder gespeichert wurden. Dadurch war es möglich, bei Bedarf die Bilder einer späteren Analyse zu unterziehen.



**Abbildung 1 Experimenteller Aufbau**

Erklärung: Der Arteriograph besteht aus einem intraluminalen und einem extraluminalen Kreislauf. Der intraluminalen Kreislauf ist ein offenes Kreislaufsystem, während der extraluminalen Kreislauf ein in sich geschlossenes Kreislaufsystem darstellt.

Aufgabe des intraluminalen Kreislaufs ist es, eine intraluminale Perfusion mit konstantem Druck und konstantem Durchfluß zu erzeugen. Der Mitteldruck lag bei 80 mm Hg und wurde durch das Anheben der Vorratsgefäßen mit der intraluminalen Pufferlösung erreicht. Der entstehende hydrostatische Druck wurde kontinuierlich gemessen. Um physiologische Verhältnisse zu erzeugen, wurde das Outflowgefäß soweit angehoben, daß der Durchfluß ca. 0,1 ml/min oder 6 ml/h betrug. Im extraluminalen Kreislauf wurde der auf 37° C equilibrierte Puffer von der Umwälzpumpe kontinuierlich ausgetauscht. Der experimentelle Aufbau ermöglicht Pharmaka unabhängig voneinander extra- und intraluminal ein- und auszuwaschen.

### 3.2. Präparation der Arterie

Die Wistar-Ratten wurden mit 4 % Halothan narkotisiert. Das Erreichen der gewünschten Narkostiefe wurde durch das Ausbleiben der Stellreflexe beurteilt. Anschließend wurden die Tiere mittels einer speziellen Kleintierguillotine dekapitiert. Das Fell und die Kopfschwarte wurden mit einem Skalpell entlang der Sagittallinie aufgetrennt. Die Nackenmuskulatur sowie der vertikale Anteil der Okzipitalschuppe wurden mit einem Rongeur abpräpariert. In der entstehenden Öffnung wurden Halsteadklammern zur Eröffnung des Neurokraniums eingeführt und die Kalotte durch lateralen Druck eröffnet. Mit einer Semkenpinzette wurde das Gehirn vom Hirnstamm aus vorsichtig mobilisiert, von der Schädelbasis gelöst und in eine mit 4°C kaltem Albuminpuffer gefüllten Petrischale übertragen. Das Gehirn wurde darin vollständig vom Puffer bedeckt.

Unter einem Präparationsmikroskop wurde, vom Circulus arteriosus Willisii ausgehend, die A. cerebri media (MCA) über eine Länge von ca. 20 mm entfernt. Es wurde ein ca. 1,5 cm langes Stück der MCA entnommen, in eine mit frischem Puffer gefüllten Petrischale übertragen und aus der pialen Scheide stumpf herauspräpariert. Dabei wurde darauf geachtet, die Arterie nicht zu verletzen, da jede Berührung der Arterie mit den Pinzetten mechanische Schäden hinterlassen kann. Diese beeinträchtigen nachhaltig die Reaktivität der Arterie und machen sie für den Versuch unbrauchbar (Duling und Rivers, 1986). Für die durchgeführten Versuche habe ich üblicherweise nur eine Arterie pro Ratte verwendet. Wenn im Einzelfall beide Arterien genutzt wurden, so sind sie für unterschiedliche Studien verwendet worden.

### 3.3. Gründe für die Wahl des Modells

Wie schon eingangs erwähnt, besteht *in vitro* grundsätzlich die Möglichkeit, Arterien als perfundierte Gefäße oder als vorkontrahierte ringförmige Gefäßstücke zu untersuchen. In der Literatur findet man oftmals Untersuchungen zum selben Thema, die sowohl mit der einen, als auch mit der anderen Methode durchgeführt wurden. Es erscheint deshalb wichtig, die grundsätzlichen Unterschiede zwischen diesen am weitesten verbreiteten Methoden zu erläutern. Untersuchungen an nicht perfundierten Arterienringen sind isometrische Versuchsanordnungen. Dabei werden bei einer eingestellten Vordehnung Veränderungen der Zugspannung auf unterschiedliche Stimuli gemessen. Arterienringe bilden im Gegensatz zu perfundierten Arterien keinen myogenen Spontantonus aus. Sie werden daher z.B. mit Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  vorkontrahiert

und unter Zugspannung gesetzt. Durch die Zugspannung kommt es nachfolgend zu einer langsamen Erhöhung der Gefäßmuskelspannung. Der entscheidende Faktor bei dieser Versuchsanordnung ist somit die Länge des vorgedehnten Gefäßmuskels.

Im Gegensatz dazu entwickeln perfundierte Arterien bei Anhebung des intraluminalen Druckes einen myogenen Spontantonus. Der intraluminale Druck bleibt dabei über die Versuchsdauer konstant (isobare Bedingungen). Es wird vermutet, daß unter isobaren Bedingungen die Wandspannung der entscheidende Faktor der myogenen Antwort ist. Der myogene Spontantonus ist auf eine Membrandepolarisation mit nachfolgender Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle zurückzuführen (Knot und Nelson, 1998).

Aus den unterschiedlichen Versuchsanordnungen ergeben sich funktionelle Unterschiede. So zeigen isometrische Versuchsanordnungen maximale Gefäßmuskelantworten unter Vordehnungen, die nach Meinung einiger Autoren nicht physiologisch sind. Isobare Versuchsanordnungen zeigen dagegen maximale Konstriktionen (Gefäßmuskelantworten) bei viel geringeren, physiologischen Gefäßmuskeldehnungen (Übersicht bei Davis und Hill, 1999).

Weiterhin zeigen Untersuchungen an Gefäßen mit vergleichbaren Durchmessern aus dem gleichen Gefäßbett, daß die Gefäße in den zwei Präparationsformen eine unterschiedliche Sensitivität auf Vasokonstriktoren aufweisen (Falloon *et al.*, 1995), die sich auch auf Ebene des Membranpotentials widerspiegelt (Schubert *et al.*, 1996).

Die Methode der perfundierten isolierten Arterie bietet außerdem über die Trennung der intra- und extraluminalen Perfusion die Möglichkeit, Stimuli in diesen Kompartimenten getrennt zu applizieren und deren Wirkung zu untersuchen. Darüber hinaus ist bei dieser Versuchsanordnung kein exogener Konstriktor nötig. Ein exogener Konstriktor könnte die Gefäßantwort auf den applizierten Stimulus beeinflussen und müsste bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die NO-haltigen perivaskulären Nerven nach der Präparation erhalten bleiben und einen funktionell bedeutsamen NO-Spiegel generieren (Ignacio *et al.*, 1997; Lindauer *et al.*, 2001). Somit erscheint das in dieser Arbeit gewählte isobare System insgesamt der physiologischen Situation eher zu entsprechen und somit zur Beantwortung der aufgestellten Hypothesen besser geeignet zu sein.

### 3.4. Materialien und Erläuterungen

Tiere: Ratte, Wistar, männlich, 270-300 gr.

Züchter: Charles River Laboratories, D-97633 Sulzfeld

Haltung: die Ratten haben freien Zugang zu Futter und Wasser, konventionelle Haltung in der Tierhaltung der Experimentellen Neurologie, Charité  
Tötungsanzeige Nr. T 0032/99

Futter: Alleinfuttermittel für Haltung, keimarm, Altromin GmbH, 32791 Lage

Puffer: extraluminal: 3 mM MOPS (3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid), 144 mM NaCl, 3 mM KCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,21 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,02 mM EDTA, 2 mM Pyruvat, 5 mM Glucose

intraluminal: wie extraluminal, zusätzlich 1 % Albumin, Bovine Fraction V  
alle Substanzen wurden von der Firma Sigma bezogen

Der untitrierte Puffer hat einen pH-Wert von ca 6,80. Für den Versuch wurde der Puffer auf pH 7,4 +/- 0,05 mit 0,1 M NaOH titriert. Für die Azidoseversuche wurde der extraluminale Puffer auf einen pH-Wert von  $7,0 \pm 0,05$  eingestellt.

pH-Messung: AVL Compact 2

OP-Mikroskop: Leica Wild M3 Z

OP-Lampe: Leica KL 1500 electronic

Narkose: Halothan ASID, W. Rusch Hospital Vertriebs GmbH, Böblingen  
Narkosesteuerung auf 4 % Halothan und 96 % Sauerstoff durch Halothan Vapor 19.3 von Drägerwerk AG, Lübeck, Narkosetopf der Firma Schott

Guillotine: Stoelting, Wood Dale, Illinois, USA

Präparationsbesteck: Knochenzange: Rongeur nach Friedman-Pearson

Arterienkammer: Arteriograph, Living Systems, Burlington, Vermont, USA

Verbindungsschläuche: C-Flex von Cole-Parmer

Kapillaren: K-series borosilcate glass capillaries, Kwik-Fil™ von WIP

Kapillaren-Puller: Sutter Instrument Co., Model P-97

Umwälzpumpe: Masterflex-Pumpe L/S Cole-Parmer, economy drive

Anschlüsse: Masterflex-Schläuche C-Flex 6424 Größe 16 von Cole-Parmer

Druckmesser:	Hellige Servomed
Mikroskop:	inverses Mikroskop: Leika Leitz DM IL
Kamera:	JVC 3 CCD
Bildschirm:	Sony Trinitron
Bildverarbeitung:	Lion Eletronics Pentium I/233 MHZ, Video-Capturix 2.1

### 3.5. Versuchsablauf und verwendete Substanzen

Vor jedem Versuch wurde die Reaktivität der untersuchten Arterien auf standardisierte Stimuli getestet um zu gewährleisten, daß die Gefäßreaktivität nicht durch die Präparation beeinträchtigt wurde. Dieses geschah durch Erhöhung der extraluminalen  $K^+$ -Konzentration auf 20 mM und durch Erfassung der Vasodilatation auf Azidose. Der weitere Versuchsablauf ist im Abschnitt 3.6 (Experimentelles Paradigma) für jede Reihe graphisch dargestellt.

Alle im folgenden aufgeführten Substanzen wurden, soweit nicht anders vermerkt, von der Firma Sigma bezogen und in aqua bidest gelöst. Die Substanzen wurden extraluminal appliziert und über 20 Minuten eingewaschen. Anschließend wurde die Dilatation auf Azidose erneut getestet. Wie unter Kontrollbedingungen wurde der Gefäßdurchmesser nach 10minütiger Azidose gemessen.

In den Reihen 2, 4, 8, 9, 10 und 14 wurde Ethanol in einer Konzentration von 1 ‰ als Lösungsmittel verwendet. Um einen Einfluß des verwendeten Lösungsmittels auszuschließen, wurden Kontrollexperimente mit 1 ‰ Ethanol durchgeführt. Sie sind im Ergebnissteil in der Tabelle 6 zusammengefaßt.

Weiterhin wurde das Vorhandensein von  $K_{Ca}$  und  $K_{ATP}$  sowie die Wirksamkeit der spezifischen Blockade durch 1 mM TEA und durch 10  $\mu$ M Glibenclamid funktionell durch Applikation der jeweiligen spezifischen Kanalöffner der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$  getestet. Das Vorhandensein von  $K_{Ca}$  und die Wirksamkeit der spezifischen Blockade durch 1 mM TEA wurde mit dem Kanalöffner NS-1619 (Research Biochemical International) untersucht. NS 1619 wurde in einer Konzentration von 10  $\mu$ M verwendet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 8 aufgeführt. Das Vorhandensein von  $K_{ATP}$  und deren spezifische Blockade durch 10  $\mu$ M Glibenclamid wurde durch die Applikation von Pinacidil getestet. Pinacidil wurde in einer Konzentration von 10  $\mu$ M verwendet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 10. aufgeführt. Beide Kanalöffner wurden in Ethanol gelöst. Ethanol wurde in einer Endkonzentration von 1 ‰ verwendet.

## **Reihe 1    Repetitive Azidosereaktionen**

Repetitive Azidosereaktionen wurden unter Normalbedingungen durchgeführt um zu überprüfen, ob der Ruhedurchmesser und die Azidosereaktivität im Versuchsablauf konstant bleiben.

## **Reihe 2    Azidosereaktion vor und nach Inhibition der löslichen Guanylatzyklase mit 5µM ODQ und anschließender Restitution durch 30µM 8 Br-cGMP**

Zur Hemmung der löslichen Guanylatzyklase wurde ODQ (Research Biochemical International) verwendet. Die verwendete Dosis von 5 µM entspricht den Literaturangaben, die je nach Präparation und Gefäßbett eine wirksame Dosis von 3 - 10 µM ODQ angeben (Sobey und Faraci, 1997a; Feelisch *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2000). Die Substanz wurde für das Experiment in 1‰ Ethanol (ETOH) gelöst. Die Gesamteinwirkzeit der Substanz betrug 20 Minuten. Anschließend wurde die Vasodilatation auf Azidose gemessen. Die Wiederherstellung des cGMP-Spiegels unter fortdauernder Enzymblockade erfolgte mit 30 µM 8 Br-cGMP (8-Bromoguanosin 3',5'-zyklisches Monophosphat), das für 20 Minuten eingewaschen wurde. Anschließend wurden der Ruhedurchmesser und die Azidosereaktivität erneut gemessen. Als Hinweis auf einen vollständig wiederhergestellten basalen cGMP-Spiegel wurde das Wiedererreichen des Ruhedurchmessers unter Kontrollbedingungen gewertet.

Weiterhin wurden Kontrollversuche mit dem Lösungsmittel (1 ‰ ETOH) durchgeführt, um einen Einfluß des Vehikels auf die Gefäßdilatation unter Azidose auszuschließen.

## **Reihe 3    Untersuchung der Vasodilatation der MCA auf Azidose unter Hemmung der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Kaliumkanäle (K<sub>Ca</sub>) mit 1 mM Tetraethylammonium (TEA)**

Kanäle der K<sub>Ca</sub>-Familie werden durch TEA in einer Konzentration von 1 mM spezifisch inhibiert. Unter dieser Konzentration kommt es zu einer wirksamen Inhibition der K<sub>Ca</sub>, ohne daß andere Kaliumkanaltypen betroffen sind (Quayle *et al.*, 1995; Nelson und Quayle, 1995). Dabei liegt die Konzentration sowohl für eine wirksame als auch für eine selektive Hemmung der K<sub>Ca</sub> in engen Grenzen: Konzentrationen unter 1 mM sollen zu einer unvollständigen Blockade der K<sub>Ca</sub> führen (Nelson und Quayle, 1995), während Konzentrationen > 1 mM TEA eine

unspezifische Inhibition weiterer Kaliumkanäle bewirken. Dabei sollen unter einer Konzentration von  $> 1$  mM TEA die  $K_{ATP}$  (Quayle *et al.*, 1995 und 1997), möglicherweise aber auch die  $K_V$  gehemmt werden (Nelson und Quayle, 1995).

#### **Reihe 4 Untersuchung der Vasodilatation der MCA auf Azidose unter Hemmung der ATP-sensitiven Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ ) durch 10 $\mu$ M Glibenclamid (Glib)**

Glibenclamid wurde von der Firma Research Biochemical International bezogen und für die Experimente in 1 ‰ Ethanol (ETOH) gelöst. Kanäle der  $K_{ATP}$ -Familie werden in Konzentrationen von bis zu 10  $\mu$ M Glibenclamid spezifisch blockiert (Quayle *et al.*, 1995). Die Konzentration für eine 50 %ige Hemmung der  $K_{ATP}$  beträgt je nach Gefäßbett zwischen 20 nM und 3  $\mu$ M. Die unterschiedliche Ansprechbarkeit ist möglicherweise auf das Vorkommen verschiedener Isoformen der  $K_{ATP}$  in den untersuchten Präparaten zurückzuführen (Zhang und Bolton, 1996). Elektrophysiologische Studien an zerebralen Gefäßen konnten zeigen, daß die  $K_{ATP}$  durch 10  $\mu$ M Glibenclamid spezifisch gehemmt werden (Kleppisch und Nelson, 1995). In dieser Konzentration soll Glibenclamid die Leitfähigkeit anderer Kaliumkanalfamilien nicht beeinflussen (Nelson und Quayle, 1995). Konzentration von bis zu 10  $\mu$ M Glibenclamid wurden daher zur Hemmung der  $K_{ATP}$  in einer Vielzahl von funktionellen Studien an zerebralen Arterien verwendet (Petersson *et al.*, 1997; Toyoda *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 1998; Najarian *et al.*, 2000).

#### **Reihe 5 Untersuchung der Vasodilatation der MCA auf Azidose unter Hemmung der einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle ( $K_{ir}$ ) mit 40 $\mu$ M und mit 100 $\mu$ M Bariumchlorid ( $BaCl_2$ )**

Kanäle der  $K_{ir}$ -Familie werden gemäß Literaturangabe in einer Konzentration  $< 50$   $\mu$ M  $BaCl_2$  spezifisch blockiert (Nelson und Quayle, 1995; Knot *et al.*, 1996). In unseren Experimenten konnte die Vasodilatation auf 20 mM  $K^+$ , die alleinig über  $K_{ir}$  vermittelt wird (Johnson *et al.*, 1998) durch 40  $\mu$ M  $BaCl_2$  nicht aufgehoben werden. Es ist somit davon auszugehen, daß die Blockade der  $K_{ir}$  nicht vollständig war (siehe Diskussion Kapitel 5.6). Deshalb wurde eine zweite Experimentenreihe mit einer Konzentration von 100  $\mu$ M  $BaCl_2$  durchgeführt. Diese Konzentration erzeugte eine verlässliche Blockade der  $K_{ir}$ -vermittelten Dilatation auf 20 mM  $K^+$ .

**Reihe 6 Untersuchung der Vasodilatation der MCA auf Azidose unter Hemmung der spannungsabhängigen Kaliumkanäle ( $K_V$ ) mit 1 mM 4 Aminopyridin (4 AP)**

Kanäle der  $K_V$ -Familie werden spezifisch durch 1 mM 4 AP gehemmt. In dieser Konzentration soll die Leitfähigkeit der  $K_{Ca}$ ,  $K_{ATP}$  und  $K_{ir}$  durch 4 AP nicht beeinträchtigt werden (Knot und Nelson, 1995).

**Reihe 7 Untersuchung der Vasodilatation der MCA der Ratte unter Inhibition der  $Na^+/K^+$ -ATPase durch 1 mM Ouabain.**

Die  $Na^+/K^+$ -ATPase wurde durch Ouabain in einer Konzentration von 1 mM spezifisch gehemmt (McCarron und Halpern, 1990; Johnson *et al.*, 1998).

**Reihen 8-14: Untersuchung der Azidosereaktivität unter gleichzeitiger Hemmung von zwei Kaliumkanalfamilien**

In diesen Reihen wurde bis auf die Reihe 9 dieselben Substanzen und Konzentrationen wie in den Reihen 3-6 verwendet. In der Reihe 9 wurde zur Charakterisierung der beteiligten  $K_{Ca}$ -Untergruppe Charybdotoxin in einer Konzentration von 100 nM verwendet. Dieser Blocker gilt als hochselektiv für die Blockade der  $BK_{Ca}$  an Gefäßmuskelzellen (Nelson und Quayle, 1995).

### 3.6. Experimentelles Paradigma

#### Reihe 1: Kontrollen



*Azidose unter Blockade der sGC und Restitution mit 8 Br-cGMP*

#### Reihe 2: ODQ+cGMP



*Azidose unter Kaliumkanalblockade*

#### Reihe 3: TEA



#### Reihe 4: Glibenclamid



#### Reihe 5: BaCl<sub>2</sub>



#### Reihe 6: 4 AP

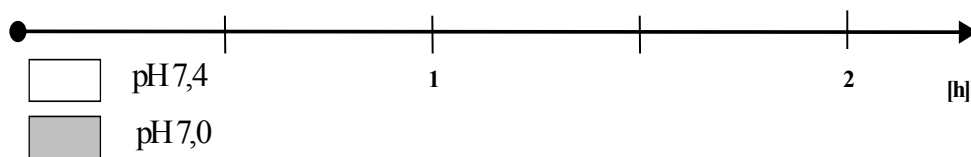
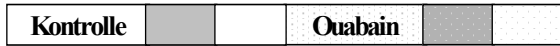


Abbildung 2 Versuchsablauf und verwendete Substanzen (a)

*Azidose unter Blockade der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase*

Reihe 7: Ouabain



*Azidose unter Kaliumkanalkombinationsblockade*

Reihe 8: Glib + TEA



Reihe 9: Glib + CHTX



Reihe 10: Glib +  $\text{BaCl}_2$



Reihe 11: TEA +  $\text{BaCl}_2$

Reihe 12: TEA + 4 AP



Reihe 13: 4 AP +  $\text{BaCl}_2$

Reihe 14: 4 AP + Glib

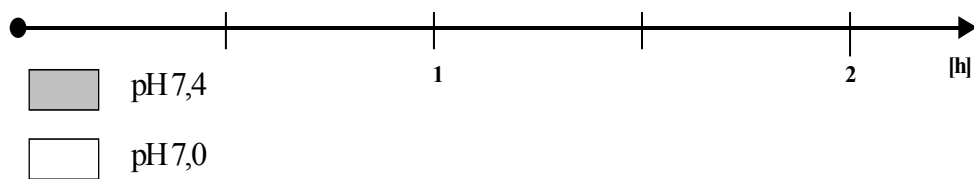


Abbildung 3 Versuchsablauf und verwendete Substanzen (b)

### 3.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen und wurde bei statistisch signifikanten Unterschieden ( $P < 0.05$ ) durch einen post hoc Test nach Bonferroni ergänzt. Dieser Test wurde zur Beurteilung der Gefäßdurchmesser während Azidose sowie für die Beurteilung der Ruhedurchmesserveränderungen unter Zugabe der Kaliumkanalhemmer verwendet. Daten, die keine Normalverteilung aufwiesen, wurden mittels einer nichtparametrischen Friedmanschen Varianzanalyse nach Rängen getestet und bei statistisch signifikanten Unterschieden ( $P < 0.05$ ) mit einem post hoc Test nach Student-Newman-Keuls untersucht. Für den Vergleich einzelner Datenreihen, wie z.B. für den Vergleich der Azidosereaktivität aus den Reihen 3, 8, 9 und 11 wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) für unabhängige Stichproben durchgeführt, die bei statistisch signifikanten Unterschieden ( $P < 0,05$ ) von einem post hoc Test nach Student-Newman-Keuls gefolgt wurde. Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Statistikprogramm SigmaStat Version 2.03 der Firma SPSS.

Bei der Auswertung der Daten stellte sich die Frage, ob die beobachtete Verminderung der Vasodilatation auf Azidose in den einzelnen Reihen gleich stark oder unterschiedlich stark ausgeprägt war. Die alleinige Berücksichtigung eines verminderten Gefäßdurchmessers in Mikrometer unter Kaliumkanalblockade berücksichtigt nicht die Tatsache, dass die Azidosereaktivität unter Kontrollbedingungen in den einzelnen Reihen unterschiedlich ausfallen kann. Dieses beruht auf natürlich vorkommenden Schwankungen, die in einem biologischen System gegeben sind. Damit ist die Möglichkeit eines systematischen Fehlers gegeben (Vergleich abhängiger Daten). Um die Azidosereaktionen der einzelnen Kaliumkanalreihen miteinander vergleichen zu können, wurde die prozentuale Azidosereaktivität unter Kontrollbedingungen und unter Kaliumkanalblockade berechnet.

Hiermit wurde die Azidosereaktivität (A) als Prozentangabe der maximalen Dilatation nach der Formel von Horiuchi *et al.* (2002) berechnet:

$$A = [(D_{\text{pH}7,0} - D_{\text{pH}7,4}) / (D_{\text{max}} - D_{\text{pH}7,4})] \times 100$$

$D_{\text{max}}$  repräsentiert dabei den maximalen Gefäßdurchmesser unter 80 mm Hg vor Erwärmung der Pufferlösung (= maximale passive Dehnung),  $D_{\text{pH}7,4}$  und  $D_{\text{pH}7,0}$  die Durchmesser der Arterie unter pH 7,4 und pH 7,0.

Die Reduktion der Azidosereaktivität wurde als Verhältnis der Azidosereaktivität (A) unter

Kontroll- und unter Versuchsbedingungen berechnet und in Prozent angegeben. Es wurde dabei folgende Formel benutzt:

$$\text{Reduktion der Azidosereaktivität} = (A_{\text{Blocker}} / A_{\text{Kontrolle}}) \times 100$$

$A_{\text{Kontrolle}}$  und  $A_{\text{Blocker}}$  stehen dabei für die Azidosereaktivität unter Kontrollbedingungen und unter Kaliumkanalblockade.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Gütekriterien einer intakten Vasoreaktivität

Nachdem das Gefäß präpariert und aufgespannt wurde, erfolgte eine Anhebung des intraluminalen Druckes auf 80 mm Hg. Der extraluminale Puffer in der Arteriografenkammer wurde kontinuierlich mit frisch gekühltem Puffer ausgetauscht. Die Arterie wurde dabei aufgrund des gekühlten intra- und extraluminalen Puffers druckpassiv gedehnt. Ein druckindizierter Spontantonus der glatten Muskulatur konnte aufgrund des reduzierten Metabolismus nicht erfolgen. Experimentelle Daten zeigen, dass der Durchmesser, der unter diesen Umständen gemessen wird, mit dem Durchmesser, der sich unter 10  $\mu\text{M}$  Papaverin einstellt, und dem Gefäßdurchmesser, der unter kalziumfreien Bedingungen gemessen wird, vergleichbar ist (Dietrich *et al.*, 1994; Golding *et al.*, 1998; Knot und Nelson, 1998). Somit kann der Gefäßdurchmesser, der unter gekühlten Bedingungen (4° C) und einem intraluminalen Druck von 80 mm Hg gemessen wird, als maximaler Gefäßdurchmesser verstanden werden. Anschließend wurde das Wasserbad in Betrieb gesetzt. Die Arterien wurden über mindestens 45 Minuten mit 37° C warmen Puffer equilibriert. In dieser Zeit bauten die Gefäße einen myogenen Spontantonus auf. Der Gefäßdurchmesser lag anschließend bei ca. 53 % des Ausgangswertes. Der Tonusaufbau (1. Gütekriterium) und die nachfolgende Dilatation auf 20 mM K<sup>+</sup> (2. Gütekriterium) sind allgemein anerkannte Vasoreaktionen und wurden zur Feststellung einer intakten Reaktivität vor jedem Experiment durchgeführt (Bryan *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1998). Sie sind in der Tabelle 1 zusammengefasst. In der Tabelle 1, wie auch in allen darauf folgenden Tabellen, sind die Mittelwerte und die dazu gehörigen Standardabweichungen aufgeführt.

Als drittes und für das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit wichtigstes Kriterium zur Beurteilung einer funktionellen Unversehrtheit der aufgespannten Arterien wurde, basierend auf Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe, eine mindestens 20%ige Vasodilatation auf Azidose (pH 7,00  $\pm$  0,05) aufgestellt. Der Zeitraum für die Einstellung einer stabilen Gefäßdilatation betrug für diese wie für alle übrigen durchgeführten Messungen 10 Minuten (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 1 Zusammenfassung der Gütekriterien 1. und 2. aus den Reihen 1-14**

n = 90	
Maximaldurchmesser	252 ± 29 µm
Ruhedurchmesser	132 ± 13 µm
Vasodilatation auf 20 mM K <sup>+</sup>	187 ± 34 µm
Dilatation auf 20 mM K <sup>+</sup> in µm	57 ± 31
Dilatation auf 20 mM K <sup>+</sup> in %	43 ± 24

## 4.2. Zeitkontrollen

### Reihe 1 Repetitive Azidosereaktionen

Um die Vergleichbarkeit der einzelnen aufeinander folgenden Reaktionen beurteilen zu können, wurde eine Grundreihe repetitiver Azidoseantworten durchgeführt. Insgesamt wurde die Vasoreaktivität auf vier aufeinander folgenden pH-Absenkungen ( $7,00 \pm 0,05$ ) in einem Intervall von 20 min und über einen Zeitraum von 10 min getestet. Dazwischen wurde das Gefäß bei pH  $7,40 \pm 0,05$  für 20 Minuten equilibriert. Der Gefäßdurchmesser kehrte darunter zum Ausgangswert zurück. Die erste Reaktion wurde als Testreaktion gewertet und ging nicht in die Auswertung ein. Ziel dieser Kontrollreihe war es, zu untersuchen, inwieweit der Ruhedurchmesser und die Azidosereaktivität über den gesamten Zeitraum des Experimentes konstant bleiben.

**Tabelle 2 Zeitkontrollen**

n = 7	Testreaktion	1. Reaktion	2. Reaktion	3. Reaktion	Signifikanz <sup>#</sup>
pH 7,4	127 ± 11 µm	132 ± 10 µm	135 ± 10 µm	138 ± 7 µm	n.s. <sup>#</sup>
pH 7,0	163 ± 15 µm	169 ± 8 µm	176 ± 8 µm	178 ± 11 µm	n.s. <sup>#</sup>
Dilatation in µm	36 ± 10	37 ± 8	41 ± 15	40 ± 14	
Dilatation in %	29 ± 9	28 ± 8	32 ± 15	28 ± 11	
Signifikanz*	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	

\* bezogen auf den Unterschied zwischen den Durchmesser unter pH 7,4 und pH 7,0

<sup>#</sup> bezogen auf den Unterschied zwischen den Werten der Testreaktion, der 1., 2. und 3. Reaktion

Alle Azidosereaktionen (pH 7,0) wiesen einen hoch signifikanten Unterschied ( $P < 0,001$ ) zum Ruhedurchmesser (pH 7,4) auf. Zwischen den jeweiligen Durchmessern unter pH 7,4 bzw. pH 7,0 bestand kein statistisch signifikanter Unterschied. Man kann somit von reproduzierbaren, konstanten Reaktionen ausgehen. Um die Dynamik der Reaktionen miteinander vergleichen zu können, wurden zusätzlich die Durchmesser nach 1 und nach 5 Minuten gemessen (Tabelle 3). Lediglich der Durchmesser der Testreaktion in der ersten Minute wich signifikant von den vergleichbaren Werten der 2. und 3. Reaktion ab. Ansonsten wiesen die Werte der einzelnen Reaktionen keinen signifikanten Unterschied auf. Sowohl der Ruhedurchmesser als auch die Azidosereaktivität waren über die gesamte Versuchsdauer konstant.

**Tabelle 3 Azidosereaktivität nach 1, 5 und 10 Minuten**

n = 7	Testreaktion	1. Reaktion	2. Reaktion	3. Reaktion
pH 7,4	127 ± 11 µm	132 ± 10 µm	135 ± 10 µm	138 ± 7 µm
pH 7,0				
1 min	172 ± 20 µm*	188 ± 25 µm	195 ± 21 µm	203 ± 22 µm
5 min	168 ± 23 µm	179 ± 14 µm	188 ± 14 µm	180 ± 12 µm
10 min	163 ± 15 µm	169 ± 8 µm	176 ± 8 µm	178 ± 11 µm

\* $P < 0,05$  im Vergleich zu den entsprechenden Werten aus der 2. und 3. Reaktion

Die Durchmesser waren zu den jeweils gemessenen Zeitpunkten während der Vasodilatation auf Azidose (Reaktionen 1-3) sehr konstant und zeigten nur geringe Standardabweichungen. Dieses trifft vor allem für den 5 und den 10 Minutenwert zu. Zwischen dem 5 und dem 10 Minutenwert bestand kein statistisch signifikanter Unterschied. Es ist somit davon auszugehen, dass sich ab der 5ten Minute ein Gleichgewichtszustand eingestellt hat, der in einem konstanten Gefäßdurchmesser zum Ausdruck kommt. Die erste Reaktion auf Azidose, im folgenden Kontrollazidose genannt, aller in dieser Arbeit untersuchten Gefäße sind in der Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4 Zusammenfassung der Kontrollazidosen aus den Reihen 2-14**

n = 90	
pH 7,4	129 ± 11 µm
pH 7,0	174 ± 19 µm
Dilatation in µm	44 ± 13
Dilatation in %	34 ± 10

### 4.3. Abhängigkeit der Azidosereaktivität vom NO/cGMP-System

#### **Reihe 2 Azidosereaktion vor und nach Inhibition der löslichen Guanylatzyklase (sGC) mit 5 $\mu$ M ODQ und anschließender Restitution durch 30 $\mu$ M 8 Br-cGMP**

Nach Ablauf der Kontrollreaktion auf Azidose wurden 5  $\mu$ M ODQ, gelöst in 1% Ethanol, über 20 Minuten appliziert. Anschließend wurde die Vasoreaktivität auf Azidose erneut getestet. Um anschließend den basalen cGMP-Spiegel wieder herzustellen, wurde das zellgängige 8 Br-cGMP in einer Konzentration von 30  $\mu$ M verwendet. Nach einer Einwirkzeit von 20 Minuten wurde die Azidosereaktivität erneut getestet (siehe experimentelles Paradigma). Um einen möglichen Einfluss des Lösungsmittels auf die Gefäßreaktivität auszuschließen, wurden Kontrollversuche mit dem Vehikel (1 % Ethanol) durchgeführt.

**Tabelle 5 pH-Reaktivität unter sGC-Blockade und Restitution durch 8 Br-cGMP**

	Kontrolle (n = 8)	5 $\mu$ M ODQ (n = 8)	30 $\mu$ M 8 Br-cGMP (n = 3)	Signifikanz
pH 7,4	128 $\pm$ 11 $\mu$ m	107 $\pm$ 11 $\mu$ m*	137 $\pm$ 37 $\mu$ m	*P = 0,001
pH 7,0	171 $\pm$ 18 $\mu$ m	114 $\pm$ 6 $\mu$ m <sup>#</sup>	213 $\pm$ 34 $\mu$ m	<sup>#</sup> P < 0,001
Dilatation in $\mu$ m	43 $\pm$ 12	7 $\pm$ 9	76 $\pm$ 11	
Dilatation in %	33 $\pm$ 9	7 $\pm$ 10	59 $\pm$ 22	
Ruhedurchmesser pH-Reaktivität	vorhanden	sign. Abnahme vollst. aufgehoben	wieder hergestellt wieder hergestellt	

\* bezogen auf den Ruhedurchmesser unter pH 7,4 vor Gabe von ODQ

<sup>#</sup> bezogen auf den entsprechenden Kontrollwert unter pH 7,0

Unter Hemmung der sGC war der Ruhedurchmesser bei pH 7,4 signifikant verringert. Zwischen dem Gefäßdurchmesser unter pH 7,4 und pH 7,0 war kein signifikanter Unterschied mehr festzustellen. Die Azidosereaktivität unter sGC-Blockade war somit aufgehoben (siehe Abbildung 4).

Unter der Vorstellung, den basalen cGMP-Spiegel wieder herzustellen, wurde 8 Br-cGMP zugegeben. Durch Zugabe des zellgängigen 8 Br-cGMP konnte der Ruhedurchmesser wiedererreicht werden. Es ist somit davon auszugehen, dass somit auch der basale cGMP-Spiegel restituiert wurde. Die anschließend getestete Vasodilatation auf Azidose zeigt, dass die Azidosereaktivität des Gefäßes alleinig durch den basalen cGMP-Spiegel während fortdauernder

Hemmung der sGC wieder hergestellt wurde.

### Azidosereaktion unter sGC-Blockade und Restitution mit 8 Br cGMP

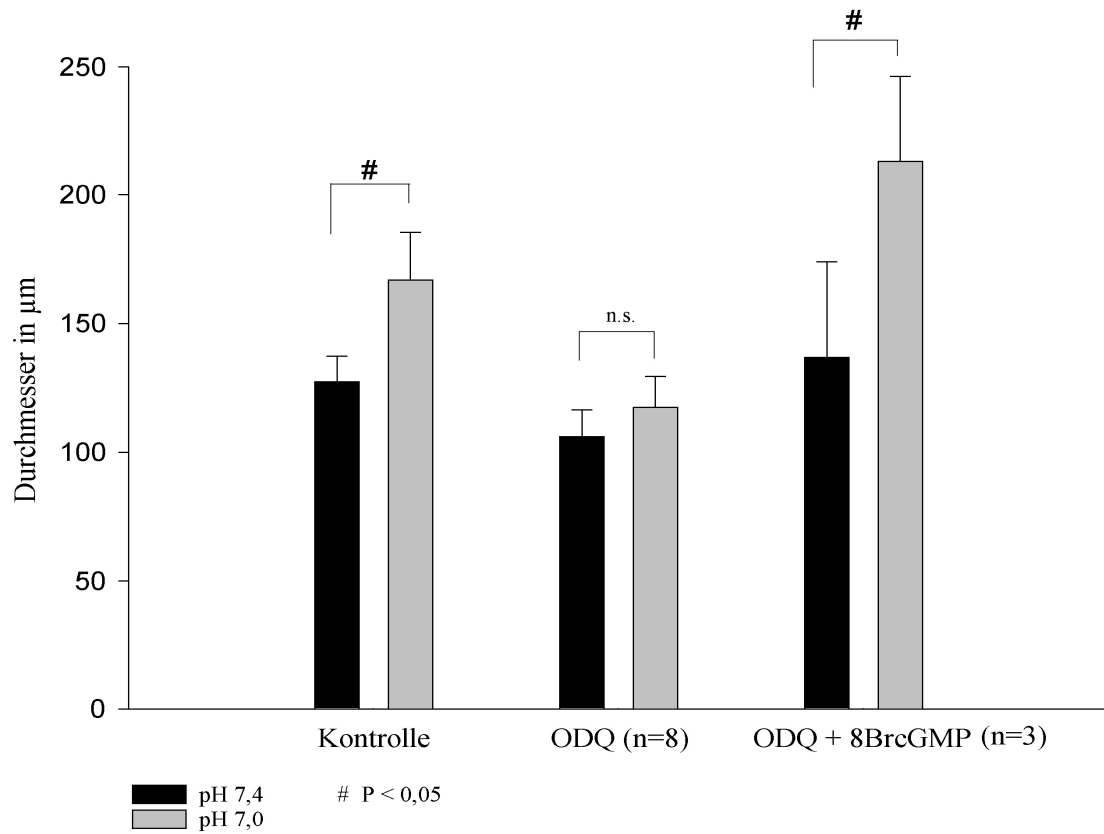


Abbildung 4 Azidosereaktion unter sGC-Hemmung und Restitution mit 8 Br cGMP

**Tabelle 6 Vehikelkontrolle**

n = 3	Kontrolle	1 ‰ Ethanol	Signifikanz*
pH 7,4	127 ± 5 µm	134 ± 6 µm	n.s.
pH 7,0	170 ± 15 µm	176 ± 20 µm	n.s.
Dilatation in µm	43 ± 9	43 ± 13	
Dilatation in %	34 ± 6	31 ± 9	
pH-Reaktivität	vorhanden	vorhanden	

\* bezogen auf die entsprechenden Kontrollwerte

Die Gefäße wiesen unter Zugabe des Lösungsmittels Ethanol in einer Konzentration von 1 ‰ eine unveränderte Vasoreaktivität auf.

#### 4.4. Azidosereaktivität unter Inhibition der einzelnen Kaliumkanaltypen

In den folgenden Untersuchungen (Reihen 3-6) wurde die Vasoreaktivität auf Azidose unter Blockade der einzelnen Kaliumkanalfamilien untersucht. Im Anschluss an die Kontrollreaktion wurde der jeweilige Blocker extraluminal eingewaschen und die Gefäßreaktivität auf Azidose erneut getestet. Dosis, Lösungsmittel und Einwaschzeiten wurden im Abschnitt Materialien und Methoden erläutert.

#### Reihe 3 Untersuchung der Vasodilatation der MCA auf Azidose unter Hemmung der $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Kaliumkanäle ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) mit 1 mM Tetraethylammonium (TEA)

Tabelle 7 pH-Reaktivität unter Blockade der  $\text{K}_{\text{Ca}}$

n = 19	Kontrolle	1 mM TEA	Signifikanz
pH 7,4	133 ± 14 µm	128 ± 10 µm <sup>#</sup>	<sup>#</sup> P < 0,05
pH 7,0	177 ± 20 µm	162 ± 20 µm <sup>#</sup>	<sup>#</sup> P < 0,05
Dilatation in µm	45 ± 13	34 ± 17	
Dilatation in %	34 ± 10	26 ± 14	
pH-Reaktivität	vorhanden	signifikant vermindert	

<sup>#</sup>bezogen auf die entsprechenden Kontrollwerte (siehe auch Kapitel 4.5)

Unter Blockade der  $\text{K}_{\text{Ca}}$  mit 1 mM TEA war die Azidosereaktivität im Vergleich zu der azidotischen Vasodilatation unter Kontrollbedingungen signifikant vermindert ( $P < 0,05$ ). Dieses deutet darauf hin, dass  $\text{K}_{\text{Ca}}$  an der Vasodilatation auf Azidose beteiligt sind.

Um zu überprüfen ob  $\text{K}_{\text{Ca}}$  an der MCA der Ratte funktionell von Bedeutung sind, wurde in einer separaten Reihe von Experimenten der spezifische Kanalöffner NS 1619 in einer Konzentration von 10 µM verwendet. Anschließend wurde die Wirksamkeit des  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Hemmers TEA in einer Konzentration von 1 mM untersucht. Die Daten sind in der Tabelle 8. aufgeführt und sprechen für das Vorhandensein von  $\text{K}_{\text{Ca}}$  an der MCA der Ratte und der Wirksamkeit der  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Blockade durch 1 mM TEA.

**Tabelle 8**

n = 3	
pH 7,4	135 ± 10 µm
pH 7,4 + 10 µM NS 1619	165 ± 18 µm*
pH 7,4 + 10 µM NS 1619 + 1 mM TEA	134 ± 12 µm

\*P < 0,05 bezogen auf den Durchmesser vor Applikation von NS 1619

**Reihe 4 Untersuchung der Vasodilatation der MCA auf Azidose unter Hemmung der ATP-sensitiven Kaliumkanäle (K<sub>ATP</sub>) durch 10 µM Glibenclamid**

**Tabelle 9 pH-Reaktivität unter Blockade der K<sub>ATP</sub>**

n = 15	Kontrolle	10 µM Glibenclamid Signifikanz*	
pH 7,4	131 ± 12 µm	136 ± 13 µm	n.s.
pH 7,0	180 ± 27 µm	178 ± 31 µm	n.s.
Dilatation in µm	49 ± 20	42 ± 26	
Dilatation in %	37 ± 14	31 ± 19	
pH-Reaktivität	vorhanden	erhalten	

\* bezogen auf die entsprechenden Kontrollwerte

Die Azidosereaktivität wies unter 10 µM Glibenclamid im Vergleich zur Kontrollreaktivität keinen statistisch signifikanten Unterschied auf. Aus den vorliegenden Daten ergeben sich somit keine Hinweise auf eine Beteiligung der K<sub>ATP</sub> an der Vasodilatation der MCA auf Azidose.

Eine funktionelle Bedeutung der K<sub>ATP</sub> an der MCA der Ratte wurde mit dem K<sub>ATP</sub>-Öffner Pinacidil in einer Konzentration von 10 µM untersucht. Während der Applikation von Pinacidil wurde eine signifikante Vasodilatation beobachtet. Diese konnte durch 10 µM Glibenclamid blockiert werden. Die Daten sind in Tabelle 10. aufgeführt und sprechen für das Vorhandensein von K<sub>ATP</sub> an der MCA der Ratte und für eine effektive Hemmung der K<sub>ATP</sub> durch 10 µM Glibenclamid.

**Tabelle 10**

n = 3	
pH 7,4	143 ± 17 µm
pH 7,4 + 10 µM Pinacidil	172 ± 9 µm*
pH 7,4 + 10 µM Pinacidil + 10 µM Glibenclamid	142 ± 10 µm

\*P < 0,05 bezogen auf den Durchmesser vor Applikation von Pinacidil

**Reihe 5 Untersuchung der Vasodilatation der MCA auf Azidose unter Hemmung der einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle (K<sub>ir</sub>) mit 40 µM und mit 100 µM Bariumchlorid (BaCl<sub>2</sub>)**

Zur Blockade der K<sub>ir</sub> wurde zunächst BaCl<sub>2</sub> in einer Konzentration von 40 µM über 20 Minuten extraluminal appliziert. Anschließend wurde die Reaktion des Gefäßes auf Azidose getestet. Die Werte sind in der Tabelle 11 dargestellt. Da unter 40 µM BaCl<sub>2</sub> keine Blockade der Vasodilatation auf 20 mM K<sup>+</sup> erreicht wurde, ist in einer separaten Versuchsreihe mit aufsteigenden BaCl<sub>2</sub>-Konzentrationen jene Konzentration ermittelt worden, die eine verlässliche Blockade der K<sub>ir</sub> erbrachte. Diese lag zwischen 80 und 100 µM BaCl<sub>2</sub>. Es erfolgten deshalb weitere Experimente zur Untersuchung der Azidosereaktivität unter 100 µM BaCl<sub>2</sub> (Tabelle 12). In der Tabelle 13. sind die Werte der Gefäßreaktion auf 20 mM K<sup>+</sup> unter Blockade der K<sub>ir</sub> durch 100 µM BaCl<sub>2</sub> aufgeführt.

**Tabelle 11 pH-Reaktivität unter 40 µM BaCl<sub>2</sub>**

n = 10	Kontrolle	40 µM BaCl <sub>2</sub> Signifikanz*	
pH 7,4	133 ± 10 µm	134 ± 12 µm	n.s.
pH 7,0	178 ± 16 µm	173 ± 19 µm	n.s.
Dilatation in µm	45 ± 11	39 ± 14	
Dilatation in %	34 ± 8	30 ± 11	
pH-Reaktivität	vorhanden	erhalten	

\* bezogen auf die entsprechenden Kontrollwerte

**Tabelle 12** pH-Reaktivität unter 100  $\mu\text{M}$   $\text{BaCl}_2$

n = 5	Kontrolle	100 $\mu\text{M}$ $\text{BaCl}_2$ Signifikanz*	
pH 7,4	127 $\pm$ 9 $\mu\text{m}$	122 $\pm$ 6 $\mu\text{m}$	n.s.
pH 7,0	168 $\pm$ 8 $\mu\text{m}$	159 $\pm$ 18 $\mu\text{m}$	n.s.
Dilatation in $\mu\text{m}$	41 $\pm$ 5	37 $\pm$ 13	
Dilatation in %	33 $\pm$ 5	31 $\pm$ 10	
pH-Reaktivität	vorhanden	erhalten	

\* bezogen auf die entsprechenden Kontrollwerte

**Tabelle 13**  $\text{K}_{\text{ir}}$ -Blockade durch 100  $\mu\text{M}$   $\text{BaCl}_2$

n = 3	Kontrolle	100 $\mu\text{M}$ $\text{BaCl}_2$
3 mM $\text{K}^+$	130 $\pm$ 9 $\mu\text{m}$	126 $\pm$ 8 $\mu\text{m}$
20 mM $\text{K}^+$	187 $\pm$ 38 $\mu\text{m}$	126 $\pm$ 4 $\mu\text{m}$
Dilatation auf 20 mM $\text{K}^+$	P < 0,05	n.s.

$\text{K}_{\text{ir}}$  werden in einer Konzentration von < 50  $\mu\text{M}$   $\text{BaCl}_2$  spezifisch gehemmt (Edwards *et al.*, 1988; Nelson und Quayle, 1995). Dennoch gibt es auch in der Literatur Hinweise, dass an der perfundierten MCA der Ratte *in vitro* keine vollständige Blockade der  $\text{K}_{\text{ir}}$  unter dieser Konzentration stattfindet (Johnson *et al.*, 1998; Marrelli *et al.*, 1998). In der Arbeit von Johnson *et al.* (1998) war die Vasodilatation auf 20 mM  $\text{K}^+$  unter 40  $\mu\text{M}$   $\text{BaCl}_2$  auf ca. 30% des ursprünglichen Wertes reduziert. Aufgrund der in jener Arbeit erstellten Konzentrationskurve wurden von Marrelli *et al.* (1998) 75  $\mu\text{M}$   $\text{BaCl}_2$  zur Blockade der  $\text{K}_{\text{ir}}$  verwendet.

Die Azidosereaktivität wies in der vorliegenden Arbeit weder unter 40  $\mu\text{M}$  noch unter 100  $\mu\text{M}$   $\text{BaCl}_2$  eine signifikante Veränderung gegenüber den Kontrollversuchen auf.

**Reihe 6 Untersuchung der Vasodilatation der MCA auf Azidose unter Hemmung der spannungsabhängigen Kaliumkanäle (K<sub>v</sub>) mit 1 mM 4 Aminopyridin (4 AP)**

**Tabelle 14 pH-Reaktivität unter Blockade der K<sub>v</sub>**

n = 7	Kontrolle	1 mM 4 AP Signifikanz*	
pH 7,4	131 ± 9 μm	135 ± 14 μm	n.s.
pH 7,0	169 ± 14 μm	167 ± 21 μm	n.s.
Dilatation in μm	40 ± 8	33 ± 11	
Dilatation in %	29 ± 6	24 ± 8	
pH-Reaktivität	vorhanden	erhalten	

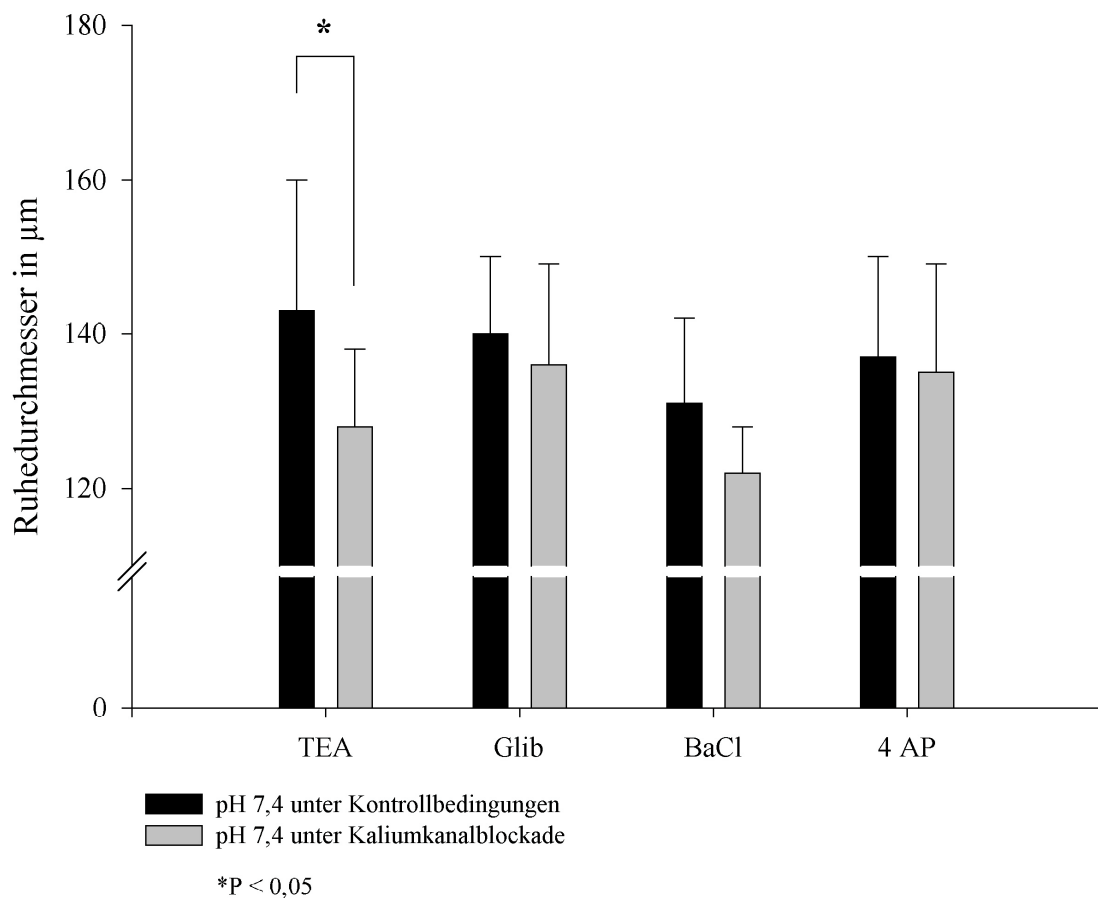
\* bezogen auf die entsprechenden Kontrollwerte

Unter Blockade der K<sub>v</sub> wurde keine signifikante Veränderung der Azidosereaktivität gesehen. Es gibt somit keine Hinweise für eine Beteiligung der K<sub>v</sub> an dieser Reaktion.

Unter 1 mM 4 AP wurden allerdings rhythmische Durchmesser-schwankungen (so genannte Vasomotion) mit Amplitudenoszillationen von 7,5 – 15,2 μm um den Mittelwert und einer Frequenz von 7-9 Zyklen/Minute (~0,1 Hz) beobachtet. Unter Kontrollbedingungen als auch unter Blockade der anderen Kaliumkanäle wurde eine solche Vasomotion nicht beobachtet.

#### 4.5. Ruhedurchmesser unter Hemmung der einzelnen Kaliumkanaltypen

Um die Rolle der untersuchten Kaliumkanäle am Aufbau des Ruhetonus zu beurteilen, wurden die Ruhedurchmesser und deren Veränderung unter Kaliumkanalblockade in Abbildung 5 zusammenfassend dargestellt. Die Gefäßdurchmesser wurden vor und 20 Minuten nach dem Einwaschen der Substanzen miteinander verglichen.



**Abbildung 5 Ruhedurchmesser unter Hemmung der einzelnen Kaliumkanaltypen**

Unter Blockade der einzelnen Kaliumkanäle war lediglich unter Hemmung der  $K_{Ca}$  eine signifikante Abnahme der Ruhedurchmesser zu beobachten. Die Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung der  $K_{Ca}$  am Ruhetonus hin. Unter Blockade der  $K_{ATP}$ , der  $K_{ir}$  und der  $K_V$  wiesen die Ruhedurchmesser keine signifikanten Veränderungen auf.

#### 4.6. Rolle der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase unter Ruhe- und Azidosebedingungen

##### Reihe 7 Untersuchung der Vasodilatation der MCA der Ratte auf Azidose unter Inhibition der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase mit 1 mM Ouabain.

Tabelle 15 pH-Reaktivität unter Blockade der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase

n = 4	Kontrolle	1 mM Ouabain	
			Signifikanz*
pH 7,4	119 ± 6 μm	125 ± 8 μm	n.s.
pH 7,0	163 ± 11 μm	174 ± 21 μm	n.s.
Dilatation in μm	44 ± 10	49 ± 21	
Dilatation in %	37 ± 9	39 ± 11	
pH-Reaktivität	vorhanden	erhalten	

\* bezogen auf die entsprechenden Kontrollwerte

Unter Blockade der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase zeigten die Gefäßdurchmesser weder unter Ruhebedingungen noch unter Azidose einen signifikanten Unterschied zu den Kontrollreaktionen.

#### 4.7. Azidosereaktivität unter Hemmung von jeweils 2 Kaliumkanalfamilien

Die Untersuchung der Gefäßreaktivität der MCA der Ratte auf Azidose unter gleichzeitiger Blockade der  $K_{ATP}$  und der  $K_{Ca}$  wurde durchgeführt, um eine mögliche gemeinsame Vermittlung der Vasodilatation auf Azidose durch diese Kanäle aufzudecken. Literaturhinweise, die eine solche gemeinsame Beteiligung möglich erscheinen lassen, wurden in der Einleitung diskutiert (Kapitel 1.4.). Um zu überprüfen, ob die Ergebnisse aus den Reihen 8 und 9 spezifisch sind, habe ich anschließend weitere mögliche Kombinationsblockaden durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Reihen 10 bis 14 aufgeführt.

#### **Reihe 8 Untersuchung der Vasodilatation der MCA auf Azidose unter gleichzeitiger Inhibition der $K_{ATP}$ mit 10 $\mu$ M Glibenclamid (Glib) und der $K_{Ca}$ mit 1 mM TEA**

**Tabelle 16** pH-Reaktivität unter gleichzeitiger Hemmung der  $K_{ATP}$  und der  $K_{Ca}$

	Kontrolle (n = 6)	1mM TEA + 10 $\mu$ M Glib 1. Reaktion (n = 6)	1mM TEA + 10 $\mu$ M Glib 2. Reaktion (n = 5)	Signifikanz
pH 7,4 pH 7,0	140 $\pm$ 10 $\mu$ m 178 $\pm$ 17 $\mu$ m	127 $\pm$ 6 $\mu$ m <sup>#</sup> 137 $\pm$ 9 $\mu$ m <sup>*</sup>	127 $\pm$ 7 $\mu$ m <sup>#</sup> 135 $\pm$ 6 $\mu$ m <sup>*</sup>	<sup>#</sup> P < 0,05 <sup>*</sup> P < 0,001
Dilat. in $\mu$ m Dilat. in %	38 $\pm$ 9 27 $\pm$ 5	9 $\pm$ 10 7 $\pm$ 8	9 $\pm$ 8 7 $\pm$ 7	
pH-Reaktivität	vorhanden	aufgehoben	aufgehoben	

<sup>#</sup> bezogen auf den Wert vor Applikation der Kaliumkanalblocker (siehe auch Kapitel 4.8)

<sup>\*</sup> bezogen auf den entsprechenden Kontrollwert

Als wichtigster Befund dieser Untersuchung war ein hoch signifikanter Unterschied (P < 0,001) der azidotischen Vasodilatation unter gleichzeitiger Blockade der  $K_{ATP}$  und der  $K_{Ca}$  im Vergleich zu den Kontrollversuchen zu verzeichnen. Dabei war die Vasoreaktivität auf Azidose vollständig aufgehoben (P = 0,35), während unter Kontrollbedingungen eine hoch signifikante (P < 0,001) Vasodilatation auf Azidose beobachtet wurde. Um zu überprüfen, ob der Befund konstant war, wurde die Gefäßreaktion auf Azidose unter Blockade der  $K_{ATP}$  und der  $K_{Ca}$  wiederholt.

**Reihe 9 Untersuchung der Vasodilatation der MCA auf Azidose unter gleichzeitiger Inhibition der  $K_{ATP}$  mit 10  $\mu$ M Glibenclamid und unter spezifischer Inhibition der  $BK_{Ca}$  durch 100 nM Charybdotoxin (CHTX)**

**Tabelle 17 pH-Reaktivität unter gleichzeitiger Hemmung der  $K_{ATP}$  und der  $BK_{Ca}$**

n = 4	Kontrolle	100 nM CHTX +10 $\mu$ M Glib. Signifikanz
pH 7,4 pH 7,0	122 $\pm$ 7 $\mu$ m 173 $\pm$ 18 $\mu$ m	117 $\pm$ 9 $\mu$ m <sup>#</sup> 123 $\pm$ 4 $\mu$ m* #P < 0,05 *P < 0,001
Dilatation in $\mu$ m Dilatation in %	51 $\pm$ 12 41 $\pm$ 8	7 $\pm$ 6 6 $\pm$ 6
pH-Reaktivität	vorhanden	vollständig aufgehoben

<sup>#</sup> bezogen auf den Wert vor Applikation der Kaliumkanalblocker (siehe auch Kapitel 4.8)

\* bezogen auf den entsprechenden Kontrollwert

Analog zu den Ergebnissen unter Inhibition der  $K_{Ca}$  mit TEA (unter gleichzeitiger Blockade der  $K_{ATP}$ ) war unter spezifischer Blockade der  $BK_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$  die Azidosereaktivität im Vergleich zur Kontrolldilatation vollständig aufgehoben. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass aus der Familie der  $K_{Ca}$  vor allem die  $BK_{Ca}$  an der Vasodilatation auf Azidose beteiligt sind.

**Reihe 10 Untersuchung der Vasodilatation der MCA auf Azidose unter gleichzeitiger Inhibition der  $K_{ATP}$  mit 10  $\mu$ M Glibenclamid und der  $K_{ir}$  mit 100  $\mu$ M  $BaCl_2$**

**Tabelle 18 pH-Reaktivität unter unter gleichzeitiger Hemmung der  $K_{ATP}$  und der  $K_{ir}$**

n = 5	Kontrolle	10 $\mu$ M Glib. + 100 $\mu$ M $BaCl_2$ Signifikanz*
pH 7,4 pH 7,0	127 $\pm$ 9 $\mu$ m 168 $\pm$ 8 $\mu$ m	123 $\pm$ 8 $\mu$ m 164 $\pm$ 14 $\mu$ m n.s. n.s.
Dilatation in $\mu$ m Dilatation in %	41 $\pm$ 5 33 $\pm$ 5	42 $\pm$ 11 34 $\pm$ 9
pH-Reaktivität	vorhanden	erhalten

\* bezogen auf die entsprechenden Kontrollwerte

Unter Kontrollbedingungen als auch unter gleichzeitiger Blockade der  $K_{ATP}$  und der  $K_{ir}$  zeigten die Gefäße keine signifikante Veränderung der Vasoreaktivität auf Azidose.

**Reihe 11 Untersuchung der Vasodilatation der MCA auf Azidose unter gleichzeitiger Inhibition der  $K_{Ca}$  mit 1 mM TEA und der  $K_{ir}$  mit 100  $\mu$ M  $BaCl_2$**

**Tabelle 19** pH-Reaktivität unter unter gleichzeitiger Hemmung der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ir}$

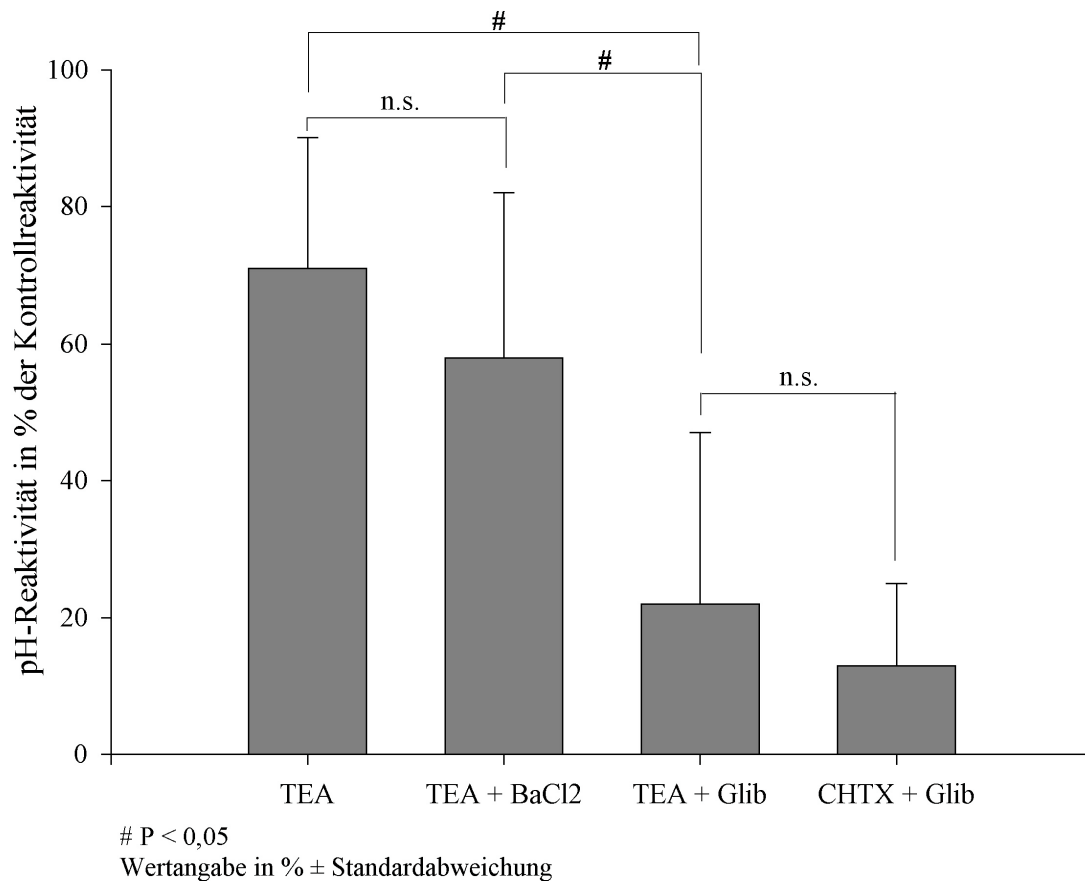
n = 6	Kontrolle	1 mM TEA + 100 $\mu$ M $BaCl_2$	Signifikanz
pH 7,4	128 $\pm$ 6 $\mu$ m	118 $\pm$ 5 $\mu$ m	n.s.
pH 7,0	186 $\pm$ 20 $\mu$ m	154 $\pm$ 18 $\mu$ m*	*P < 0,001
Dilatation in $\mu$ m	57 $\pm$ 16	36 $\pm$ 19	
Dilatation in %	45 $\pm$ 12	31 $\pm$ 17	
pH-Reaktivität	vorhanden	sign. vermindert	

\* bezogen auf die entsprechenden Kontrollwerte

Unter gemeinsamer Blockade der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ir}$  trat eine signifikante Reduktion der Azidosereaktivität auf. Es stellt sich somit die Frage, ob  $K_{ir}$  an der Vermittlung der Azidosereaktivität beteiligt sind, oder ob die beobachtete Reduktion der azidotischen Vasodilatation lediglich auf die Hemmung der  $K_{Ca}$  zurückzuführen ist. Eine mögliche Alternative wäre, dass unter 100  $\mu$ M  $BaCl_2$  auch die Leitfähigkeit der  $K_{ATP}$  unspezifisch beeinträchtigt wird.

Aus diesem Grund wurde die Azidosereaktivität der Gefäße aus den Reihen 3 (unter Hemmung der  $K_{Ca}$ ) und 11 (unter Hemmung der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ir}$ ) miteinander verglichen. Weiterhin wurde die Azidosereaktivität aus den Reihen 8 (unter Hemmung der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$ ) und 9 (unter Hemmung der  $BK_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$ ) berechnet und mit jenen aus den Reihen 3 und 11 verglichen. Zur Berechnung der Reduktion der Azidosereaktivität wurde die im Kapitel 3.7 vorgestellte Formel von Horiuchi *et al.* (2002) verwendet. Dabei wurden die Azidosereaktivität unter Kontrollbedingungen als Maßstab genommen (100 %) und die Restreaktivität auf Azidose unter Blockade der jeweiligen Kaliumkanäle berechnet. Zur Veranschaulichung sind die Ergebnisse in Prozentwertangaben für die jeweilige Reihe in Abbildung 6. grafisch dargestellt.

## Reduktion der Azidosereaktivität



**Abbildung 6 Reduktion der Azidosereaktivität unter Hemmung der verschiedenen Kaliumkanalfamilien**

Die statistische Auswertung zeigt, dass zwischen der Reduktion der Azidosereaktivität unter alleiniger Blockade der  $K_{Ca}$  (Reihe 3) und der gleichzeitigen Blockade der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ir}$  (Reihe 11) kein signifikanter Unterschied besteht. Dagegen besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Azidosereaktivität dieser beiden Reihen und jener unter gemeinsamer Blockade der  $K_{ATP}$  und  $K_{Ca}$  bzw.  $BK_{Ca}$ . Auf diesen Befund wird im Kapitel 5.9 näher eingegangen.

**Reihe 12 Untersuchung der Vasodilatation der MCA auf Azidose unter gleichzeitiger Inhibition der  $K_{Ca}$  mit 1 mM TEA und der  $K_V$  mit 1 mM 4 AP**

**Tabelle 20** pH-Reaktivität unter unter gleichzeitiger Hemmung der  $K_{Ca}$  und der  $K_V$

n = 6	Kontrolle	1 mM TEA + 1 mM 4 AP Signifikanz*	
pH 7,4	128 ± 6 µm	128 ± 7 µm	n.s.
pH 7,0	186 ± 20 µm	176 ± 16 µm	n.s.
Dilatation in µm	57 ± 16	47 ± 12	
Dilatation in %	45 ± 12	37 ± 9	
pH-Reaktivität	vorhanden	vorhanden	

\* bezogen auf die entsprechenden Kontrollwerte

Im Gegensatz zu den Untersuchungen aus der Reihe 3, bei denen unter Blockade der  $K_{Ca}$  mit 1 mM TEA eine verminderte Azidosereaktivität beobachtet wurde, war die Azidosereaktivität unter gleichzeitiger Blockade der  $K_{Ca}$  und der  $K_V$  unverändert. Dieses könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Gefäße unter simultaner Blockade der  $K_{Ca}$  und der  $K_V$  eine deutliche Vasomotion von 16 bis 40 µm aufwiesen. Die Vasomotion wurde in der Auswertung als Mittelwert zwischen dem kleinsten und dem größten Durchmesser berücksichtigt.

**Reihe 13 Untersuchung der Vasodilatation der MCA auf Azidose unter gleichzeitiger Inhibition der  $K_{ir}$  mit 100 µM BaCl<sub>2</sub> und der  $K_V$  mit 1 mM 4 AP**

**Tabelle 21** pH-Reaktivität unter unter gleichzeitiger Hemmung der  $K_{ir}$  und der  $K_V$

n = 5	Kontrolle	100 µM BaCl <sub>2</sub> + 1 mM 4 AP Signifikanz*	
pH 7,4	124 ± 6 µm	126 ± 7 µm	n.s.
pH 7,0	178 ± 14 µm	165 ± 12 µm	n.s.
Dilatation in µm	53 ± 9	36 ± 10	
Dilatation in %	43 ± 6	31 ± 9	
pH-Reaktivität	vorhanden	erhalten	

\* bezogen auf die entsprechenden Kontrollwerte

Wie in der vorhergehenden Reihe konnte auch unter gleichzeitiger Blockade der  $K_{ir}$  und der  $K_v$  eine deutliche Vasomotion beobachtet werden. Unter dieser Kombination konnte weder eine signifikante Veränderung des Ruhedurchmessers noch eine signifikante Veränderung der Azidosensitivität festgestellt werden.

**Reihe 14 Untersuchung der Vasodilatation der MCA auf Azidose unter gleichzeitiger Inhibition der  $K_{ATP}$  mit 10  $\mu$ M Glibenclamid und der  $K_v$  mit 1 mM 4 AP**

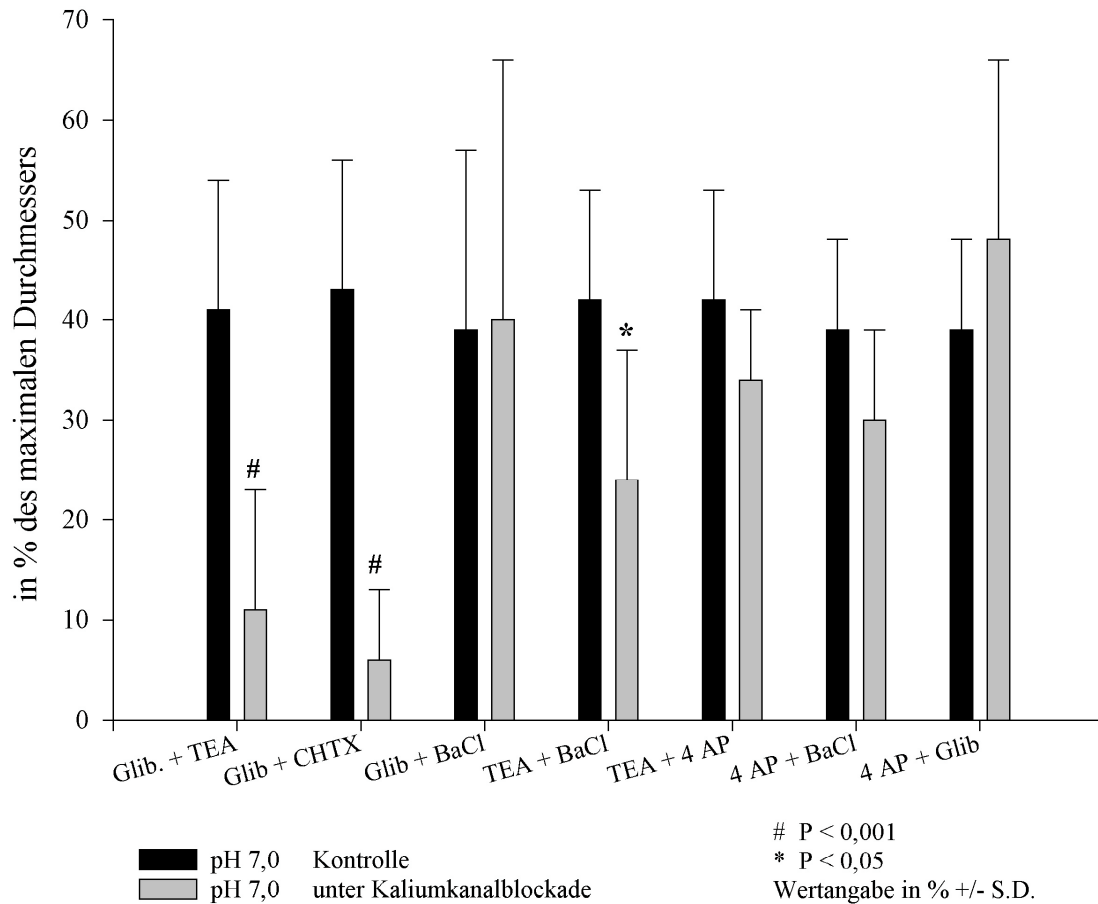
**Tabelle 22** pH-Reaktivität unter unter gleichzeitiger Hemmung der  $K_{ATP}$  und der  $K_v$

n = 5	Kontrolle	10 $\mu$ M Glib. + 1 mM 4 AP Signifikanz*	
pH 7,4 pH 7,0	124 $\pm$ 6 $\mu$ m 178 $\pm$ 14 $\mu$ m	132 $\pm$ 11 $\mu$ m 194 $\pm$ 13 $\mu$ m	n.s.
Dilatation in $\mu$ m Dilatation in %	53 $\pm$ 9 43 $\pm$ 6	63 $\pm$ 23 49 $\pm$ 20	
pH-Reaktivität	vorhanden	erhalten	

\* bezogen auf die entsprechenden Kontrollwerte

Unter Blockade der  $K_{ATP}$  und der  $K_v$  waren im Vergleich zu den Kontrollreaktionen sowohl der Ruhedurchmesser als auch die Vasoreaktivität auf Azidose unverändert. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Experimenten, die unter Mitinhibition der  $K_v$  durchgeführt wurden, war eine Vasomotion in dieser Reihe nicht festzustellen. Dieser Befund spricht für eine Beteiligung der  $K_{ATP}$  an der festgestellten Vasomotion unter Blockade der  $K_v$ .

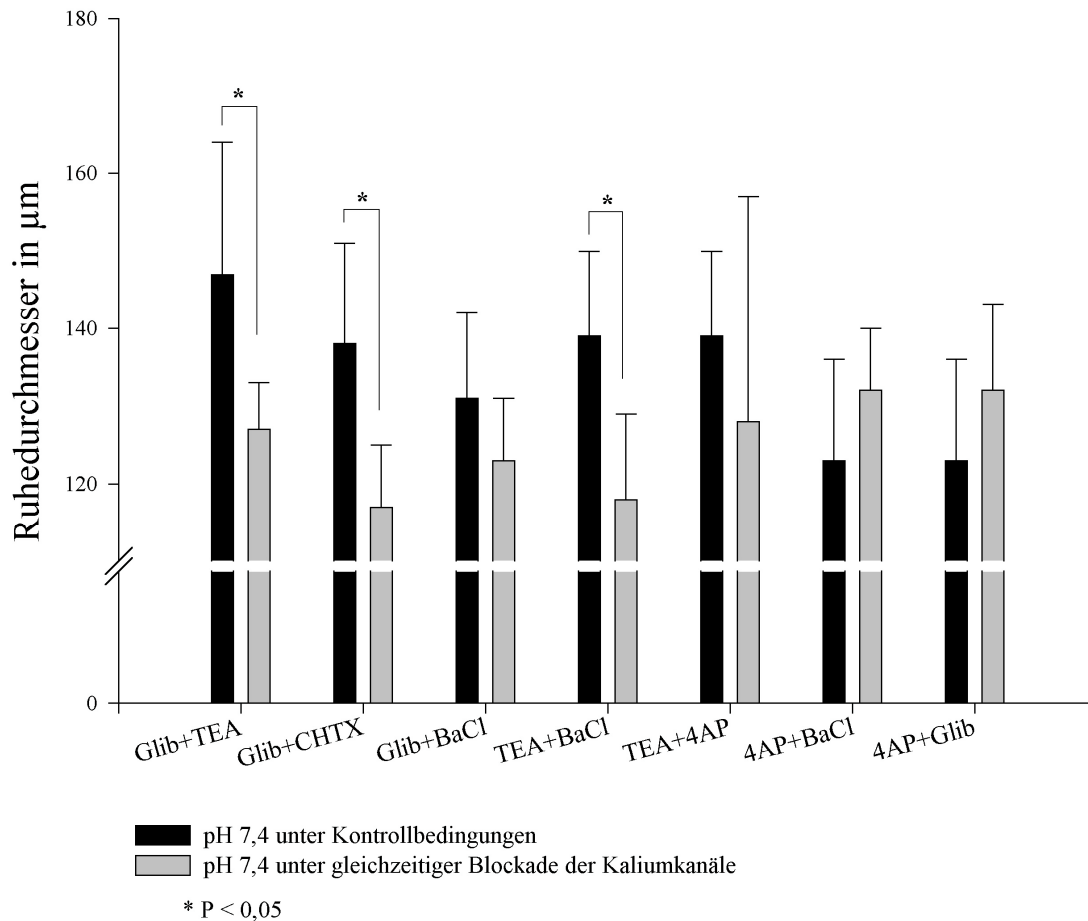
## Zusammenfassende Darstellung der Azidosereaktivität unter zweifacher Kaliumkanalblockade



**Abbildung 7** Azidosereaktivität unter gleichzeitiger Hemmung von zwei Kaliumkanalfamilien

In Abbildung 7 wurde die Azidosereaktivität der Kontrollreaktion gegen jene unter Kombinationsblockade für die einzelnen Reihen aufgetragen. Die Azidosereaktivität wurde anhand des Verhältnisses zwischen der Dilatation unter Azidose und der maximalen Dilatation des Gefäßes berechnet. Die Berechnung erfolgte auf Grundlage der Formel von Horiuchi *et al.* (2002), die im Kapitel 3.7 vorgestellt wurde. Die Abbildung zeigt eine aufgehobene Vasodilatation unter gleichzeitiger Blockade der  $K_{ATP}$  und der  $K_{Ca}$  (Reihe 8), der  $K_{ATP}$  und der  $BK_{Ca}$  (Reihe 9) sowie eine verminderte Azidosereaktivität unter gleichzeitiger Blockade der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ir}$  (Reihe 11).

#### 4.8. Ruhedurchmesser unter gleichzeitiger Hemmung von zwei Kaliumkanaltypen



**Abbildung 8 Ruhedurchmesser unter gleichzeitiger Hemmung von zwei Kaliumkanaltypen**

Die Ruhedurchmesser waren unter gleichzeitiger Blockade der  $K_{ATP}$  und der  $K_{Ca}$  (Reihe 8), der  $K_{ATP}$  und der  $BK_{Ca}$  (Reihe 9), sowie der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ir}$  (Reihe 11) signifikant vermindert. Um zu überprüfen, ob die beobachtete Konstriktion der Gefäße unter Ruhebedingungen (pH 7,4) in allen Reihen vergleichbar war, wurde die Abnahme der Ruhedurchmesser in den Reihen, die unter Kaliumkanalblockade eine Konstriktion aufwiesen (Reihe 3, Reihe 8, Reihe 9 und Reihe 11), in Prozent berechnet und mittels einer Varianzanalyse für unabhängige Stichproben miteinander verglichen. Dabei wurden auch die Ergebnisse der Reihe 3 (unter 1 mM TEA) berücksichtigt. Zwischen den einzelnen Reihen gab es keine signifikante Unterschiede. Dieses weist darauf hin, dass die Konstriktion der Ruhedurchmesser primär auf eine Hemmung der  $K_{Ca}$ , bzw. der  $BK_{Ca}$  zurückgeführt werden kann.

## 5. Diskussion

### 5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die Reaktion zerebraler Gefäße auf Azidose stellt eine robuste Gefäßantwort dar. Die Gefäße wiesen über den gemessenen Zeitraum (10 Minuten) eine stabile Vasodilatation auf Azidose auf. Die Vasodilatation auf Azidose war bei repetitiver Untersuchung über den gesamten Verlauf des Versuches vergleichbar.
2. Die Azidosensitivität zerebraler Gefäße hängt von einem basalen NO/cGMP-Spiegel ab. Nach Inhibition der löslichen Guanylatzyklase mit ODQ war die Vasodilatation auf Azidose vollständig aufgehoben. Nach Wiederherstellung des basalen cGMP-Spiegels mit 8-Br-cGMP konnte eine vollständig restituierte Azidosensitivität beobachtet werden. Neben einer Beteiligung an der Vasodilatation auf Azidose wurde gezeigt, dass der basale cGMP-Spiegel eine wichtige Rolle bei der Regulation des Ruhedurchmessers spielt.
3. Unter Inhibition der  $K_{Ca}$  wurde sowohl eine signifikante Abnahme des Ruhedurchmessers als auch der Azidosensitivität beobachtet. Unter der jeweiligen Blockade der  $K_{ATP}$ , der  $K_{ir}$  und der  $K_V$  zeigten die Gefäße keine Veränderung des Ruhedurchmessers und eine unveränderte Vasodilatation auf Azidose.
4. Unter gleichzeitiger Blockade der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$  zeigten die Gefäße keine Dilatation mehr auf Azidose. Unter Verwendung eines spezifischen Blockers der  $BK_{Ca}$  und unter gleichzeitiger Blockade der  $K_{ATP}$  war die Dilatation auf Azidose ebenfalls aufgehoben. Diese Ergebnisse bilden eine wichtige Evidenz dafür, dass die Vasodilatation auf Azidose über die  $K_{ATP}$  und die  $BK_{Ca}$  vermittelt wird.
5. Die Untersuchung der Vasodilatation auf Azidose unter weiteren Kombinationen von Kaliumkanalhemmern ( $K_{ATP} + K_{ir}$ ;  $K_{Ca} + K_{ir}$ ;  $K_{Ca} + K_V$ ;  $K_V + K_{ir}$ ;  $K_{ATP} + K_V$ ) ergab keine Hinweise auf eine Beteiligung weiterer Kaliumkanäle an der azidotischen Vasodilatation.
6. Die  $Na^+/K^+$ -ATPase scheint weder bei der Regulation des Ruhetonus noch bei der Vermittlung der Vasodilatation auf Azidose beteiligt zu sein.

## 5.2. Beurteilung der Gefäßreaktivität und Diskussion der Kontrollreaktionen

Nach der Präparation und dem Aufspannen des Gefäßes im Arteriografen wurde bei immer noch gekühltem Puffer der intraluminale Druck auf 80 mm Hg angehoben. Aufgrund des gekühlten Puffers war der zelluläre Metabolismus der Arterie reduziert, sodass ein myogener Spontantonus nicht ausgebildet wurde. Die Arterie wurde dabei passiv gedehnt. Der darunter gemessene Durchmesser ist mit dem Gefäßdurchmesser unter kalziumfreien Bedingungen vergleichbar und kann als maximale Vasodilatation betrachtet werden (Golding *et al.*, 1998; Knot und Nelson, 1998). Nach anschließender Erwärmung des Puffers auf 37° C bildeten die Arterien einen myogenen Spontantonus aus. Die myogene Spontankontraktion wurde als Hinweis auf eine erhaltene Gefäßreaktivität gewertet und entspricht den Befunden aus der Literatur (Bryan *et al.*, 1995; Knot und Nelson, 1998).

Als zweiten Hinweis für eine erhaltene Reaktivität wurde die Vasodilatation auf 20 mM K<sup>+</sup> gewertet. Das von uns gesetzte Maß einer mindestens 20%igen Dilatation ist mit den in der Literatur angegebenen Werten vergleichbar (Johnson *et al.*, 1998).

Die anschließend getestete Dilatation auf Azidose (pH 7,0) stellt die für diese Arbeit wichtigste Kontrollreaktion dar. Sie gilt als Hinweis auf ein funktionell intaktes Gefäß und ist gleichzeitig Kontrollreaktion für die Experimente unter Kaliumkanalblockade. Als Kriterium für eine erhaltene Azidosereaktivität wurde empirisch eine Dilatation von mindestens 20% festgelegt.

Da pH-Veränderungen im zerebralen Blutkreislauf zu den stärksten vasodilatatorischen Stimuli gehören (Paulson *et al.*, 1990), ist auch von einem Versuchsaufbau „in vitro“ eine wiederholbare, robuste Reaktion zu erwarten. Die Azidosereaktivität der MCA wurde auf vier aufeinander folgende Azidosestimuli in jeweils 30minütigem Abstand getestet (Tabelle 3). Die Gefäßdilatation wurde nach 1, 5 und 10 Minuten gemessen. Mit Einwaschen der extrazellulären Pufferlösung (pH 7,00 ± 0,05) wurde eine spontane Dilatation beobachtet, die ab der 5ten Minute einen konstanten Wert aufwies. Die Azidoseantworten waren über den gesamten Versuchsablauf reproduzierbar. Insgesamt betrug die Versuchsdauer bis zu 180 Minuten. Dieser Zeitraum deckt sich mit Literaturangaben, die von einer erhaltenen Vasoreaktivität über 3-6 Stunden berichten (Dacey und Duling, 1982).

- **Rolle des CO<sub>2</sub> versus des pH<sup>+</sup> bei der Vasodilatation zerebraler Arterien auf Azidose**

Glatte Muskelzellen zerebraler Arterien zeigen unter Azidose eine Tonusverminderung, die sich als Vasodilatation äußert. Während im Tierexperiment eine respiratorische Azidose durch Erhöhung des Kohlendioxidgehaltes (pCO<sub>2</sub>) induziert wird, wurde die Azidose in unserem Versuchsaufbau durch Erniedrigung des extrazellulären pH-Wertes erreicht. Es stellt sich somit die Frage, in wieweit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit jenen, die im Rahmen einer hyperkapnischen Azidose gemessen werden, vergleichbar sind. Untersuchungen in vivo (Kontos *et al.*, 1977) und in vitro (Toda *et al.*, 1989) zeigen, dass eine Veränderung des pCO<sub>2</sub> bei konstantem pH-Wert wenig Einfluss auf den Gefäßtonus zerebraler Arterien hat, und die Dilatation zerebraler Gefäße auf Azidose hauptsächlich vom pH-Wert abhängt. Weitere Untersuchungen belegen, dass bei der Dilatation zerebraler Gefäße auf Azidose der extrazelluläre pH-Wert ausschlaggebend ist (Tian *et al.*, 1995).

Elektrophysiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass unter hyperkapnischer Azidose eine Hyperpolarisation des Membranpotenzials glatter Muskelzellen erfolgt (Harder, 1982). Die Membranhyperpolarisation führt über die Schließung spannungsabhängiger Kalziumkanäle und nachfolgender Verminderung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> zu einer Tonusabnahme glatter Muskelzellen (Kapitel 1.1). Eine Membranhyperpolarisation konnte in vitro sowohl unter hyperkapnischer Azidose als auch in einem CO<sub>2</sub>-freien Puffersystem gemessen werden (Dietrich und Dacey, 1994). Die hyperkapnische Vasodilatation und die Dilatation auf einer Erniedrigung des extrazellulären pH-Wertes scheinen somit durch einen gemeinsamen Mechanismus vermittelt zu werden. Dabei besteht zwischen der pH-Reduktion und der Vasodilatation über weite pH-Bereiche eine lineare Abhängigkeit. Diese spiegelt sich sowohl auf Ebene des Membranpotenzials (Dietrich und Dacey, 1994) als auch auf Ebene der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> wider (Austin und Wray, 1995).

### 5.3. Rolle des NO/cGMP-Systems an der Vasodilatation auf Azidose

Vorausgegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die Vasodilatation der MCA auf Azidose fast vollständig auf einem basalen NO-Spiegel beruht. Nach NOS-Blockade konnte durch Gabe von NO-Donoren die Vasodilatation auf Azidose wieder hergestellt und die permissive Rolle des NO an dieser Reaktion bestätigt werden (Lindauer *et al.*, 2001).

Die Untersuchung der weiteren Signaltransduktion von NO auf Ebene des cGMP an der MCA der Ratte war u.a. Gegenstand vorliegender Arbeit. Untersuchungen an der A. basilaris der Ratte *in vitro* sprechen für eine permissive Rolle des cGMP an der azidotischen Vasodilatation (You *et al.*, 1994). Die bei diesen Untersuchungen zur Inhibition der sGC verwendete Substanz Methylenblau ist allerdings mit Nebenwirkungen behaftet, welche die Interpretation der Ergebnisse erschweren (siehe Kapitel 1.3). Die von uns verwendete Substanz ODQ führt dagegen zu einer spezifischen Hemmung der sGC *in vitro* (Garthwaite *et al.*, 1995; Moro *et al.*, 1996; Hobbs, 1997).

Die Resultate der Reihe 2 sprechen für eine Beteiligung des cGMP am Ruhetonus. Die Ruhedurchmesser, die unter Blockade der sGC beobachtet wurden, sind mit den Gefäßdurchmessern unter NOS-Blockade vergleichbar: Unter NOS-Blockade fand eine Abnahme des Ruhedurchmessers auf 74 % des Ausgangswertes statt (Lindauer *et al.*, 2001), während in der vorliegenden Arbeit unter Blockade der sGC eine Konstriktion auf 75 % des Ausgangswertes beobachtet wurde. Die Daten wurden mit demselben Versuchsaufbau und unter gleichen Versuchsbedingungen erhoben und sind somit direkt vergleichbar.

Unter Blockade der sGC mit ODQ wiesen die Durchmesser der Gefäße unter Azidose zu den Durchmessern unter pH 7,4 keinen signifikanten Unterschied mehr auf. Die Azidosereaktivität der MCA war somit aufgehoben.

Die Schlussfolgerung, dass die basale Konzentration von cGMP sowohl am Ruhetonus als auch an der Vasodilatation auf Azidose den größten Anteil der NO-Wirkung vermittelt, konnte durch Zugabe des zellgängigen 8 Br-cGMP überprüft werden. Unter Applikation von 8 Br-cGMP war der Ruhedurchmesser wieder hergestellt, was auf einen restituierten basalen cGMP-Spiegel hindeutet. Bei anschließender Applikation des Azidosepuffers (pH 7,0) zeigte sich eine vollständig wieder hergestellte Azidosereaktivität.

Die Wiederherstellung der Azidosereaktivität durch Restitution des cGMP-Spiegels während sGC-Blockade spricht für eine permissive Rolle des cGMP an der Vasodilatation der MCA auf Azidose. Die Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen von You *et al.* (1994) und bestätigen die modulatorische Rolle des cGMP an der Azidosereaktivität zerebraler Arterien.

Zusammengefasst lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

- a. Die Wirkung von NO an der isolierten MCA der Ratte wird fast ausschließlich über cGMP vermittelt
- b. Der basale cGMP-Spiegel ist an der Regulation des Ruhedurchmessers beteiligt
- c. Die Gefäßreaktivität auf Azidose hängt von einem basalen cGMP-Spiegel ab
- d. cGMP nimmt an der Vasodilatation auf Azidose eine permissiver Rolle ein

In Primärkulturen kortikaler Neuronen haben Wang *et al.* (1999) innerhalb der ersten Minute während Azidose einen Anstieg der cGMP-Konzentration beobachtet. Die cGMP-Konzentration fiel anschließend auf basale Werte zurück. Diese Beobachtung wurde von Wang *et al.* (1999) als Argument gegen eine permissive Rolle des cGMP an der Vasodilatation auf Azidose angeführt. Die Vasodilatation auf Azidose ist jedoch über die erste Minute hinaus vorhanden und weist, wie vorliegende Untersuchungen zeigen, einen stabilen Durchmesser über mindestens 10 Minuten auf. Ein nur kurzzeitiger, transients Anstieg der cGMP-Konzentration im Hirngewebe kann daher die Vasodilatation auf Azidose nicht erklären. Die Befunde von Wang *et al.* (1999) sprechen somit nicht gegen eine permissive Rolle des cGMP an der Azidosereaktivität zerebraler Arterien.

Durch Blockade der sGC mit ODQ und Restitution des basalen cGMP-Spiegels mit 8 Br-cGMP konnte gezeigt werden, dass die in vivo beobachtete permissive Rolle des NO/cGMP-Systems an der Vasodilatation auf Azidose (Iadecola *et al.*, 1994; Iadecola und Zhang, 1996) auch in vitro Gültigkeit besitzt. Weiterhin weisen die vorliegenden Untersuchungen darauf hin, dass der basale NO/cGMP-Spiegel von perivaskulären oder vaskulären Strukturen bereitgestellt wird und von parenchymalen Quellen unabhängig ist.

#### 5.4. Rolle des $K_{Ca}$ am Ruhetonus und an der Vasodilatation auf Azidose

Die Expression von  $K_{Ca}$  in dem untersuchten Gefäßabschnitt der MCA der Ratte wurde mit dem  $K_{Ca}$ -Öffner NS 1619 funktionell untersucht (Tabelle 8). Die Daten zeigen, dass  $K_{Ca}$  am Gefäßstamm der MCA der Ratte vorhanden sind und durch TEA in einer Konzentration von 1 mM gehemmt werden. Unsere Ergebnisse spiegeln die in der Literatur publizierten Befunde im Wesentlichen wider (Nelson und Quayle, 1995).

Die Abnahme des Ruhedurchmessers (pH 7,4) nach Zugabe von 1 mM TEA spricht für eine Beteiligung der  $K_{Ca}$  am Ruhetonus der MCA. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit Studien, die den  $K_{Ca}$  eine wichtige Rolle bei der Regulation des Ruhetonus zerebraler Gefäße zuschreiben (Brayden und Nelson, 1992; Nelson *et al.*, 1995).

Die Ergebnisse der Reihe 3 sprechen für eine Beteiligung der  $K_{Ca}$  an der Dilatation auf Azidose: Unter Blockade der  $K_{Ca}$  war die Azidosereaktivität um ca. 29 % signifikant verringert.

Die Rolle der  $K_{Ca}$  an der Vasodilatation auf Azidose wird in der Literatur kontrovers diskutiert. An Herzkranzgefäßen wurden in vitro sowohl Hinweise für (Hayabuchi *et al.*, 1998) als auch gegen (Ishizaka und Kuo, 1996) eine Beteiligung der  $K_{Ca}$  an der Vasodilatation auf Azidose gefunden. Untersuchungen an Zerebralarterien in vitro haben dagegen keinen Hinweis für eine Beteiligung der  $K_{Ca}$  an der Azidosereaktivität der A. basilaris des Hundes (Kinoshita und Katusic, 1997) und an penetrierenden Arteriolen der MCA der Ratte (Horiuchi *et al.*, 2002) erbracht. Die Divergenz zwischen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und jenen von Kinoshita und Katusic (1997) ist wahrscheinlich auf speziesspezifische Unterschiede sowie auf Unterschiede zwischen den untersuchten Gefäßabschnitten zurückzuführen. Die Existenz von Speziesunterschieden im Rahmen der zerebrovaskulären Reaktivität wird durch mehrere Studien belegt. So soll z.B. Indometacin den Blutflussanstieg unter hyperkapnischer Azidose bei der Ratte verhindern (Iadecola, 1992; Wang *et al.*, 1994). Beim Kaninchen (Busija, 1983) und bei der Katze (Wei *et al.*, 1980; Busija, 1983) wurden dagegen unter Indometacin eine unveränderte piale Vasodilatation und ein unveränderter Blutflussanstieg unter Azidose beobachtet. Weiterhin könnte eine unterschiedliche Kanalexpression und -aktivität im zerebralen Gefäßbaum für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein. So fanden Horiuchi *et al.* (2001) keinen Hinweis für eine Beteiligung der  $K_{Ca}$  am Ruhedurchmesser penetrierender Arteriolen der MCA.  $K_{Ca}$  sind jedoch an der Regulation des Ruhedurchmessers des MCA-Hauptstammes beteiligt (Brayden und Nelson, 1992; Nelson *et al.*, 1995). Die dargestellten Unterschiede bieten auch eine mögliche Erklärung dafür, dass Horiuchi *et al.* (2002) keine Beteiligung der  $K_{Ca}$  an der Dilatation penetrierender Arteriolen der MCA auf Azidose gefunden haben, während

vorliegende Daten auf eine Beteiligung der  $K_{Ca}$  an der azidotischen Reaktivität des MCA-Hauptstammes hinweisen.

Zusammengefasst sprechen die Ergebnisse der Reihe 3 sowohl für eine Beteiligung der  $K_{Ca}$  am Ruhedurchmesser der MCA als auch an der Vasodilatation der MCA auf Azidose.

### 5.5. Rolle des $K_{ATP}$ am Ruhetonus und an der Vasodilatation auf Azidose

Die Expression von  $K_{ATP}$  am Hauptstamm der MCA wurde mit dem  $K_{ATP}$ -Öffner Pinacidil funktionell untersucht (Tabelle 10). Die Daten weisen darauf hin, dass  $K_{ATP}$  an der MCA der Ratte vorhanden sind und durch 10  $\mu$ M Glibenclamid gehemmt werden. Die Anwesenheit von  $K_{ATP}$  an zerebralen Gefäßmuskelzellen wird durch viele Publikationen gestützt (Nelson und Quayle, 1995; Quayle *et al.*, 1997).

Die Ruhedurchmesser (pH 7,4) in der Reihe 4 wiesen vor und nach Gabe von Glibenclamid keinen signifikanten Unterschied auf. Es gibt somit keinen Anhalt für eine funktionelle Beteiligung der  $K_{ATP}$  am Ruhetonus der MCA. Die vorliegenden Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen, die gegen eine Beteiligung von  $K_{ATP}$  am Gefäßwiderstand, Gefäßtonus und Membranpotenzial zerebraler Arterien unter Ruhebedingungen sprechen (Quayle *et al.*, 1997).

Die Azidosereaktivität war unter Hemmung der  $K_{ATP}$  unverändert. Diese Daten müssen vor dem Hintergrund einer kontroversen Datenlage über die Rolle der  $K_{ATP}$  an der Vasodilatation auf Azidose eingehend diskutiert werden. Angesichts der Fülle und der Unterschiedlichkeit der Arbeiten erscheint es angebracht, zwischen den Daten *in vitro* und *in vivo* zu unterscheiden, und die Spezies, an denen diese Daten erhoben wurden, zu berücksichtigen.

Untersuchungen *in vitro* an der A. basilaris des Hundes (Kinoshita und Katusic, 1997) und an penetrierenden Arteriolen der MCA der Ratte (Horiuchi *et al.*, 2002) sprechen für eine Beteiligung der  $K_{ATP}$  an der Vasodilatation auf Azidose. Janigro *et al.* (1997) konnten dagegen an perfundierten intrazerebralen Arteriolen der Ratte keinen Hinweis für eine Beteiligung der  $K_{ATP}$  an der azidotischen Vasodilatation finden.

Die unterschiedlichen Ergebnisse können vielfältige Ursachen haben. So wurde beispielsweise in Untersuchungen an Arterien des hinteren Stromgebietes eine unterschiedliche Gefäßreaktivität auf  $K_{ATP}$ -Öffner festgestellt. Kaudal gelegen Arterien zeigten dabei eine größere Ansprechbarkeit als weiter kranial gelegene Arterien. Dieses wurde sowohl am Kaninchen (Nagao *et al.*, 1996) als auch an der Ratte festgestellt (McPherson und Stork, 1992). Weiterhin sollen  $K_{ATP}$  am Ruhedurchmesser der A. vertebralis, nicht jedoch am Ruhedurchmesser weiter

kranial gelegenen Arterien beteiligt sein (Nagao *et al.*, 1996). Somit ist eine kaudalwärts stärker ausgeprägte funktionelle Beteiligung der  $K_{ATP}$  an den Arterien im vertebrobasilären Kreislauf anzunehmen. Diese Unterschiede beruhen möglicherweise auf eine veränderte Kanalexpression und –aktivität der  $K_{ATP}$  in den untersuchten Arterien und können für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein.

In der Arbeit von Kinoshita und Katusic (1997) war weiterhin die Vasodilatation der A. basilaris auf Azidose unter Blockade der  $K_{ATP}$  nur bei einer mäßigen Absenkung des extrazellulären pH-Wertes von 7,4 auf 7,3-7,2 signifikant vermindert. Bei einer weitergehenden pH-Absenkung auf 7,1-7,0 wurde dagegen unter Blockade der  $K_{ATP}$  keine Veränderung der Vasodilatation auf Azidose beobachtet.

Inwieweit die Ergebnisse der Arbeit von Horiuchi *et al.* (2002) an penetrierenden Arteriolen im MCA-Versorgungsgebiet der Ratte mit den vorliegenden Daten vergleichbar sind, ist schwer zu beurteilen. Eine Untersuchung der Kanaldichte der  $K_{ATP}$  pro Gefäßmuskelzelle am MCA-Stamm und an den Arteriolen der MCA ist bisher nicht erfolgt. Eine unterschiedliche Kanaldichte könnte eine unterschiedliche funktionelle Beteiligung der  $K_{ATP}$  an der Vasoreaktivität dieser Gefäße zur Folge haben. Funktionelle Unterschiede zwischen den  $K_{ATP}$  am Gefäßstamm und an den daraus entspringenden Arteriolen wurden an der A. basilaris beobachtet. An der A. basilaris sollen  $K_{ATP}$  im Bereich der Arteriolen, nicht jedoch am Gefäßstamm die hypotensive Vasodilatation vermitteln (Toyoda *et al.*, 1997).

Wie die Untersuchungen über die Vasodilatation zerebraler Gefäße auf Azidose *in vitro*, weisen auch die Untersuchungen *in vivo* eine kontroverse Datenlage auf. Faraci *et al.* (1994) haben am Kaninchen eine signifikante Abnahme der Dilatation pialer Arteriolen unter Blockade der  $K_{ATP}$  bei einem  $pCO_2$  von 54 mm Hg, nicht jedoch bei einem  $pCO_2$  von 66 mm Hg beobachtet. Kontos und Wei (1996) fanden dagegen an der Katze eine Verminderung der Azidosereaktivität unter  $K_{ATP}$ -Blockade über den gesamten  $pCO_2$ -Bereich von 54–67 mm Hg.

Im Gegensatz zu diesen Studien beobachteten Wahl *et al.* (1994), Wang *et al.* (1998) und Golding *et al.* (2000a) in der Ratte eine unveränderte Vasodilatation pialer Gefäße unter Inhibition der  $K_{ATP}$ . Weiterhin wurde in der Ratte unter  $K_{ATP}$ -Blockade ein unveränderter Anstieg des zerebralen Blutflusses auf Azidose gemessen (Reid *et al.*, 1993). Die Daten einer *in vivo* durchgeführten Studie am Menschen sprechen ebenfalls gegen eine Beteiligung der  $K_{ATP}$  an der azidotischen Vasodilatation zerebraler Gefäße (Bayerle-Eder *et al.*, 2000).

Die aufgeführten Daten weisen somit erhebliche Diskrepanzen auf. Die kontroversen Befunde können sowohl auf speziesbedingten Unterschieden als auch auf unterschiedliche Expressionsmuster der Kaliumkanäle an den untersuchten Arterien beruhen. Eine mögliche

Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse über die Rolle der Kaliumkanäle an der Vasodilatation auf Azidose wird bei der Besprechung der Kombinationsblockaden (Kapitel 5.9) vorgestellt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen weder für eine Beteiligung der  $K_{ATP}$  am Ruhedurchmesser noch an der Vasodilatation der MCA auf Azidose.

## 5.6. Rolle des $K_{ir}$ am Ruhetonus und an der Vasodilatation auf Azidose

Die Funktion der  $K_{ir}$  wurde vor allem an zerebralen Arteriolen untersucht (Quayle *et al.*, 1997; Horiuchi *et al.*, 2001). Weitere Arbeiten belegen, dass diese Kanäle auch an vorgeschalteten Gefäßen, wie dem MCA-Stamm funktionell aktiv sind (Johnson *et al.*, 1998; Marrelli *et al.*, 1998). Elektrophysiologische Untersuchungen an zerebralen Arteriolen weisen darauf hin, dass die  $K_{ir}$  durch  $BaCl_2$  in Konzentrationen von bis zu 50  $\mu M$  spezifisch gehemmt werden (Quayle *et al.*, 1993; Knot *et al.*, 1996).

Die Vasodilatation auf 20 mM  $K^+$  wird durch  $K_{ir}$  vermittelt (Zaritsky *et al.*, 2000). Funktionelle Untersuchungen an der MCA der Ratte haben gezeigt, dass die Vasodilatation auf 20 mM  $K^+$  unter 40  $\mu M$   $BaCl_2$  um ca. 70 % geringer ausfällt (Johnson *et al.*, 1998) und erst ab ca. 60  $\mu M$   $BaCl_2$  aufgehoben ist. In einer nachfolgenden Arbeit aus der gleichen Arbeitsgruppe wurde daraufhin für eine spezifische Blockade der  $K_{ir}$  am Hauptstamm der MCA eine Konzentration von 75  $\mu M$   $BaCl_2$  gewählt (Marrelli *et al.*, 1998). Von dieser Datenlage ausgehend wurden vorliegende Experimente zunächst unter 40  $\mu M$   $BaCl_2$  durchgeführt. Unter 40  $\mu M$   $BaCl_2$  wurde weder eine signifikante Beteiligung der  $K_{ir}$  am Ruhedurchmesser noch an der Vasodilatation der MCA auf Azidose beobachtet. Die Vasodilatation auf 20 mM  $K^+$  konnte jedoch durch 40  $\mu M$   $BaCl_2$  nicht blockiert werden. Deshalb wurde unter ansteigender  $BaCl_2$ -Konzentration die Konzentration ermittelt, unter der die Gefäßdilataion auf 20 mM  $K^+$  aufgehoben war. Diese lag zwischen 80-100  $\mu M$   $BaCl_2$ . Es wurde deshalb eine zweite Reihe von Experimenten mit 100  $\mu M$   $BaCl_2$  durchgeführt. Unter 100  $\mu M$   $BaCl_2$  waren der Ruhedurchmesser und die Azidosreaktivität ebenfalls unverändert.

Die Ursache für die unvollständige Blockade der Dilatation auf 20 mM  $K^+$  und somit der  $K_{ir}$  unter 40  $\mu M$   $BaCl_2$  könnte in dieser Arbeit, wie in den Arbeiten von Johnson *et al.* (1998) und Marrelli *et al.* (1998) in einem unterschiedlichen Ansprechen von zerebralen Arteriolen (Quayle *et al.*, 1993; Knot *et al.*, 1996) und des MCA-Stammes auf  $BaCl_2$  liegen. Darauf weisen die unterschiedlichen Gefäßreaktionen der Arteriolen im Vergleich zum Gefäßstamm der MCA auf

Erhöhungen der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration hin. So zeigten Arteriolen der MCA in der Arbeit von Knot *et al.* (1996) maximale Dilatationen unter 11 und 16 mM  $K^+$ . Unter 21 mM  $K^+$  wurde dagegen keine Dilatation mehr beobachtet. Bei einer Erhöhung der  $K^+$ -Konzentration auf über 26 mM wiesen die zerebralen Arteriolen in derselben Arbeit eine Konstriktion auf. Am Hauptstamm der MCA dagegen wurde die größte Dilatation unter 20 mM  $K^+$  beobachtet (Johnson *et al.*, 1998), während unter 40 mM  $K^+$  eine immer noch signifikante Dilatation gemessen wurde (Golding *et al.*, 2000b; Schuh-Hofer *et al.*, 2001).

Die gewählte  $BaCl_2$ -Konzentration von 100  $\mu M$  ist für die Blockade der  $K_{ir}$  dennoch selektiv (Quayle *et al.*, 1997) und wurde deshalb auch in anderen Arbeiten verwendet (Horiuchi *et al.*, 2001; Chrissobolis *et al.*, 2000). In höheren Konzentrationen ( $> 100 \mu M$ ) könnte  $BaCl_2$  die Leitfähigkeit der  $K_{ATP}$  beeinträchtigen (Nelson und Quayle, 1995). In den durchgeführten Untersuchungen wurde unter 100  $\mu M$   $BaCl_2$  kein Effekt und somit auch kein potenziell unspezifischer Effekt beobachtet. Dafür sprechen auch die Untersuchungen der Reihe 11. Unter gleichzeitiger Gabe von 100  $\mu M$   $BaCl_2$  und 1 mM TEA (Reihe 11) wurde im Vergleich zu 1 mM TEA (Reihe 3) keine weitere Abnahme der Azidosereaktivität (Abbildung 3) gesehen. Diese Daten sprechen sowohl gegen eine Beteiligung der  $K_{ir}$  an der Vasodilatation auf Azidose als auch gegen eine unspezifische Blockade der  $K_{ATP}$  durch 100  $\mu M$   $BaCl_2$ .

Zusammenfassend sprechen vorliegende Ergebnisse weder für eine Rolle der  $K_{ir}$  am Ruhedurchmesser noch an der Dilatation der MCA auf Azidose.

## 5.7. Rolle des $K_V$ am Ruhedurchmesser und an der Vasodilatation auf Azidose

Untersuchungen am Kaninchen haben eine Beteiligung der  $K_V$  am Ruhedurchmesser und am Membranpotenzial der MCA gezeigt (Knot und Nelson, 1995). An der Ratte wurde in vivo eine Vasokonstriktion der A. basilaris unter Blockade der  $K_V$  beobachtet (Sobey und Faraci, 1999). Die  $K_V$  scheinen weiterhin an der Regulation des Ruhedurchmessers von Arteriolen der MCA und der A. basilaris der Ratte beteiligt zu sein (Horiuchi *et al.*, 2001).

Die Rolle der  $K_V$  an der Vasodilatation der MCA auf Azidose ist nicht eindeutig. Elektrophysiologische Messungen an Gefäßmuskelzellen zerebraler Arterien der Katze haben eine Aktivitätszunahme der  $K_V$  unter Azidose festgestellt (Bonnet *et al.*, 1991). Untersuchungen an der A. basilaris des Hundes (Kinoshita und Katusic, 1997) und an Arteriolen der MCA der Ratte (Horiuchi *et al.*, 2002) haben allerdings keine Beteiligung der  $K_V$  an der Vasodilatation auf Azidose gefunden. Ebenso wurde in den vorliegenden Untersuchungen keine signifikante

Beteiligung der  $K_V$  am Ruhedurchmesser und an der Vasodilatation der MCA auf Azidose beobachtet.

Unter 1 mM 4 AP wurde jedoch eine deutliche Vasomotion mit einer Amplitude von 8 - 15  $\mu\text{m}$  und einer Frequenz von bis zu 9 Zyklen/Minute beobachtet. Das Phänomen der Vasomotion mit einer Frequenz von ca. 0,1 Hz ist seit langem bekannt. Die Mechanismen, die zu dieser Vasomotion führen, sind bisher jedoch unklar (Dirnagl *et al.*, 1993; Lindauer *et al.*, 1999). Untersuchungen *in vitro* haben gezeigt, dass die zerebralen Arterien spontan hypertensiver Ratten eine deutliche Vasomotion unter Ruhebedingungen aufweisen (Osol und Halpern, 1988). In der Reihe 14 wurde unter Hemmung der  $K_V$  und der  $K_{ATP}$  keine Vasomotion mehr beobachtet. Eine Vasomotion wurde jedoch bei allen anderen Untersuchungen beobachtet, die mit einer Blockade der  $K_V$  einhergingen. Dieser Befund deutet auf eine Beteiligung der  $K_{ATP}$  an der beobachteten Vasomotion. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre eine erhöhte Aktivität der  $K_{ATP}$  unter  $K_V$ -Blockade mit nachfolgender Membranpotenzialveränderung als Auslöser der Vasomotion. Eine Aktivierung der  $K_{ATP}$  infolge eines vermehrten ATP-Verbrauchs durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase wurde von Nguyen *et al.* (2000) als Mechanismus für die neurovaskuläre Kopplung vorgeschlagen. Der Befund einer möglichen Stabilisierung des Membranpotenzials durch die  $K_V$  und einer darauf folgenden Veränderung der Vasomotionsamplitude unter Blockade der  $K_V$  erscheint interessant. Diese Fragestellung wurde jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiterverfolgt.

## 5.8. Rolle der $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase unter pH 7,4 und unter Azidose

Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ist entscheidend am Aufbau und an der Aufrechterhaltung des Membranpotenzials beteiligt, wird durch das NO/cGMP-System moduliert (Kapitel 1.4.) und ist somit ein möglicher Kandidat für die Vermittlung vasoaktiver Stimuli wie beispielsweise der Azidose. Die Untersuchungen von Toda *et al.* (1989) weisen auf eine Beteiligung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase an der Azidosereaktivität zerebraler Arterien. Weiterhin scheint die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in der neurovaskulären Kopplung (Nguyen *et al.*, 2000) involviert zu sein.

Der Gradient des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers, einer der wichtigsten Mechanismen zur Regulation des intrazellulären pH-Wertes, wird über die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aufrechterhalten (Austin und Wray, 2000). Dieser Mechanismus hat möglicherweise pathophysiologische Konsequenzen: Während ein intrazellulärer pH-Abfall den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher stimuliert, wird die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aktiviert und führt zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch der Zelle, der einen hypoxischen Schaden auslösen oder verstärken kann. Dieser Mechanismus wurde an Kardiomyozyten beschrieben (Avkiran und Snabaitis, 1999) und bietet möglicherweise neue Ansätze bei der Therapie des Herzinfarktes (Avkiran und Marber, 2002). Daten zu Gefäßmuskelzellen zerebraler Arterien liegen bislang allerdings nicht vor.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente ergaben jedoch weder Hinweise für eine Beteiligung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase an der Regulation des Ruhedurchmessers noch an der Vasodilatation zerebraler Arterien auf Azidose.

## 5.9. Vasodilatation auf Azidose unter Hemmung von jeweils 2 Kaliumkanalfamilien aus den Reihen 7-14

Die Untersuchungen der Reihe 3 weisen auf eine signifikante Beteiligung der  $K_{Ca}$  an der Vasodilatation auf Azidose hin. Für eine Beteiligung der  $K_{ATP}$ , der  $K_{ir}$  und der  $K_V$  an der Vasodilatation auf Azidose wurden dagegen keine Hinweise gefunden. In der Literatur werden vor allem  $K_{ATP}$  als Vermittler dieser Reaktion beschrieben. Die Befunde dazu sind allerdings nicht einheitlich (Kapitel 1.4.3 und 5.5). Eine Modulation durch das NO/cGMP-System wurde sowohl für  $K_{Ca}$  als auch für  $K_{ATP}$  beschrieben. Frühere Befunde unserer Arbeitsgruppe sowie die Ergebnisse aus der Reihe 2 zeigen eine ausgeprägte Abhängigkeit der Azidosereaktion vom NO/cGMP-System, das an dieser Reaktion als Modulator agiert (Lindauer *et al.*, 2001).

Die Arbeiten von Kinoshita und Katusic (1997) und von Horiuchi *et al.* (2002) weisen lediglich eine verminderte Vasodilatation auf Azidose unter Blockade der  $K_{ATP}$  auf. Eine vollständige Aufklärung der Vasodilatation zerebraler Arterien auf Azidose wurde bisher nicht erzielt. Der Ausgangspunkt meiner Untersuchungen aus den Reihen 8 - 14 war deshalb die Vermutung, dass weitere Faktoren an der azidotischen Vasodilatation zerebraler Arterien beteiligt sind. Aus diesem Grund habe ich die Wirkung einer gleichzeitigen Hemmung zweier Kaliumkanaltypen untersucht. Um ein mögliches Zusammenspiel der Kaliumkanalfamilien aufzudecken, wurde zunächst die Wirkung der gleichzeitigen Hemmung der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$  untersucht, da hierfür die stärkste Evidenz aus der Literatur abzuleiten war. Unter gleichzeitiger Blockade dieser beiden Kaliumkanalfamilien bestand zwischen dem Durchmesser bei pH 7,4 und pH 7,0 kein signifikanter Unterschied mehr, d.h., die Azidosereaktivität war vollständig aufgehoben.

Um die an der Reaktion beteiligte Untergruppe der  $K_{Ca}$  zu identifizieren, wurden diese Experimente unter Verwendung von 100 nM Charybdotoxin (CHTX) und 10  $\mu$ M Glibenclamid (Glib) wiederholt. CHTX ist ein spezifischer Blocker der schnellleitenden  $K_{Ca}$  ( $BK_{Ca}$ ) und weist vor allem an Gefäßmuskelzellen eine hohe Selektivität auf (Nelson und Quayle, 1995). Bei einer intakten Vasodilatation unter Kontrollbedingungen konnte unter CHTX und Glib ebenfalls keine Vasodilatation auf Azidose mehr beobachtet werden.

Die wahrscheinlichste Erklärung für die Aufhebung der Vasodilatation auf Azidose unter Hemmung der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$  ist eine Vermittlung der Azidosereaktivität sowohl durch  $K_{Ca}$  als auch durch  $K_{ATP}$ . Dabei scheinen  $K_{Ca}$  die Wirkung der  $K_{ATP}$  vollständig substituieren zu können. Ein solcher Mechanismus ist bisher für die Vasodilatation zerebraler Arterien auf Azidose weder untersucht noch beschrieben worden.

Die Hypothese einer gemeinsamen Vermittlung der Azidosereaktivität durch  $K_{Ca}$  und  $K_{ATP}$  wird durch Beobachtungen von Wang *et al.* (1998) unterstützt. An der Ratte konnte die unter NOS-Blockade aufgehobene und durch 8 Br-cGMP rekonstituierte Vasodilatation auf Azidose durch die jeweiligen Hemmer der  $K_{Ca}$  oder der  $K_{ATP}$  unter alleiniger Gabe blockiert werden. Unter physiologischen Bedingungen war jedoch keiner der jeweiligen Blocker wirksam. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass beide Kanäle an der Vasodilatation auf Azidose beteiligt sind. Weitere Kombinationsblockaden der Reihen 10 (Blockade der  $K_{ATP}$  und der  $K_{ir}$ ), 13 (Blockade der  $K_{ir}$  und der  $K_V$ ) und 14 (Blockade der  $K_{ATP}$  und der  $K_V$ ) wiesen weder bezüglich des Ruhedurchmessers noch der Azidosereaktivität eine signifikante Veränderung gegenüber den Kontrollen auf. Sie bestätigten damit die Ergebnisse aus den Reihen 3-6, die unter Blockade der einzelnen Kaliumkanaltypen durchgeführt wurden.

Unter gleichzeitiger Hemmung der  $K_{Ca}$  und der  $K_V$  (Reihe 12) wiesen die Arterien eine unveränderte Azidosereaktivität auf. Eine Abnahme der Azidosereaktivität wäre jedoch aufgrund der Ergebnisse aus der Reihe 3 (Blockade der  $K_{Ca}$ ) möglich gewesen. Die Ursache dafür, dass eine Abnahme der Azidosereaktivität unter Blockade der  $K_{Ca}$  und der  $K_V$  nicht beobachtet wurde, könnte daran liegen, dass Pulsationsphänomene, die unter Hemmung der  $K_V$  beobachtet wurden, die verminderte Vasodilatation auf Azidose überlagert haben.

Unter gleichzeitiger Hemmung der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ir}$  (Reihe 11) waren sowohl der Ruhedurchmesser als auch die Vasodilatation auf Azidose signifikant vermindert. Es stellte sich deshalb die Frage, ob die Ergebnisse aus der Reihe 11 lediglich auf einer Blockade der  $K_{Ca}$  zurückzuführen sind oder darüber hinausgehen. Dabei wären sowohl eine Mitbeteiligung der  $K_{ir}$  am Ruhedurchmesser als auch eine unspezifische Hemmung der  $K_{ATP}$  durch die verwendete  $BaCl_2$ -Konzentration von 100  $\mu M$  denkbar gewesen.

Aus diesem Grund wurde die Gefäßkonstriktion, die in den Reihen 3 (Blockade der  $K_{Ca}$ ), 8 (Blockade der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$ ), 9 (Blockade der  $BK_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$ ) und 11 (Blockade der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ir}$ ) beobachtet wurde, mittels einer Varianzanalyse für unabhängige Stichproben verglichen. Bei der statistischen Analyse wurden allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen Gruppen gesehen. Es ist somit anzunehmen, dass die beobachtete Abnahme der Ruhedurchmesser lediglich auf eine Blockade der  $K_{Ca}$  bzw. der  $BK_{Ca}$  zurückzuführen ist. Für eine Beteiligung der  $K_{ATP}$  und der  $K_{ir}$  am Ruhedurchmesser gibt es somit keine Hinweise.

Um zu überprüfen, ob die Vasodilatation auf Azidose unter Blockade der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ir}$  (Reihe 11) sowie unter Blockade der  $K_{Ca}$  (Reihe 3) unterschiedlich ausfällt, wurde die Abnahme der Azidosereaktivität in Prozent berechnet (Kapitel 3.6). Die Azidosereaktivität in der Reihe 11 (vermindert auf 59 % der Kontrolle) war allerdings gegenüber der alleinigen Blockade der  $K_{Ca}$  in

der Reihe 3 (vermindert auf 71 % der Kontrolle) nicht signifikant verringert. Dagegen bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der reduzierten Azidosensitivität unter Blockade der  $K_{ir}$  in der Reihe 11 und der Azidosensitivität unter gemeinsamer Blockade der  $K_{Ca}$  bzw.  $BK_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$  aus den Reihen 8 und 9. Diese Daten sprechen gegen eine Beteiligung der  $K_{ir}$  an der Vasodilatation auf Azidose. Die Ergebnisse liefern weiterhin keinen Hinweis auf eine unspezifische Hemmung der  $K_{ATP}$  durch 100  $\mu$ M  $BaCl_2$  (Bonev und Nelson, 1993).

Bei der Einordnung der Befunde vorliegender Arbeit stellt sich die Frage, ob das beobachtete Zusammenspiel der  $K_{Ca}$  und  $K_{ATP}$  lediglich bei der Vermittlung der Dilatation zerebraler Gefäße auf pH-Veränderungen eine Rolle spielt, oder ob es sich um einen allgemeinen Mechanismus der Vasodilatation auf einen NO-abhängigen Stimulus handelt. Erst kürzlich wurden Hinweise für eine Vermittlung der Wirkung endogener Vasodilatoren über die  $K_{Ca}$  und die  $K_{ATP}$  publiziert. So soll die durch NO hervorgerufene Vasodilatation an der A. basilaris der Ratte über eine Aktivierung der Kaliumkanäle erfolgen. Die daran beteiligten Kanäle ( $K_{ATP}$ ,  $K_{Ca}$  und  $K_{ir}$ ) scheinen sich gegenseitig zu substituieren und die Funktion des jeweils gehemmten Kanals zu kompensieren (Hempelmann *et al.*, 2001). Weiterhin wurde eine Beteiligung der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$  an der Vasodilatation zerebraler Gefäße neugeborener Schweine auf Opioide wie Nociceptin/Orphanin nachgewiesen (Armstead, 1999).  $K_{Ca}$  und  $K_{ATP}$  scheinen somit nicht nur die Azidosensitivität zerebraler Arterien zu vermitteln, sondern auch an der Vasodilatation auf andere Stimuli beteiligt zu sein.

Abgesehen von der Beteiligung der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$  an der Vasodilatation zerebraler Gefäße auf physiologische Stimuli, sprechen experimentelle Daten für eine wichtige Rolle dieser Kanäle unter pathophysiologischen Bedingungen: so kann die nach Hypoxie/Ischämie verminderte Azidosensitivität zerebraler Gefäße auf eine Inhibition der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$  durch Nociceptin/Orphanin zurückgeführt werden (Jagolino und Armstead, 2001). Der genaue Mechanismus dieser Reaktion ist noch nicht vollständig bekannt. Er weist jedoch auf eine gemeinsame Vermittlung der Vasodilatation auf Azidose durch  $K_{Ca}$  und  $K_{ATP}$ , als auch auf eine mögliche Rolle dieser Kanäle an einer gestörten Vasoreaktivität unter pathologischen Bedingungen hin. Untersuchungen nach traumatischen ZNS-Verletzungen geben weitere Hinweise auf eine veränderte Aktivität der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$  unter pathophysiologischen Bedingungen. So wurde nach experimentellen ZNS-Verletzungen eine verminderte Dilatation zerebraler Arterien auf Azidose beobachtet. Diese beruht möglicherweise auf einer verminderten NO-Konzentration und ist auf die Entstehung freier Radikale zurückzuführen (Golding *et al.*,

2000). Weiterhin wird eine verminderte zerebrale Gefäßdilataion nach experimentellen ZNS-Verletzungen an neugeborenen Schweinen auf eine Inhibition der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$  zurückgeführt (Salvucci und Armstead, 2000). Als Ursache wird eine durch Vasopressin und Endothelin induzierte Produktion von Sauerstoffradikalen vermutet (Armstead, 2001a, b).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass eine verminderte basale NO-Produktion bzw. eine Verminderung des basalen NO-Spiegels infolge von Reaktionen mit freien Sauerstoffradikalen nach traumatischen ZNS-Verletzungen zu einer Funktionsstörung der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$  und somit zu einer Störung der Vasodilatation auf Azidose beiträgt.

Abschließend stellt sich die Frage, inwieweit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Aufklärung der dargestellten, kontroversen Datenlage über die Rolle der Kaliumkanäle an der Vasodilatation zerebraler Gefäße auf Azidose beitragen können. Wie schon erläutert, sprechen Literaturhinweise dafür, dass die funktionelle Rolle der  $K_{ATP}$  und der  $K_{Ca}$  an unterschiedlichen zerebralen Gefäßabschnitten verschieden stark ausgeprägt ist. Dieses ist möglicherweise auf eine unterschiedliche quantitative und qualitative Expression der  $K_{ATP}$  und der  $K_{Ca}$  zurückzuführen. Somit ist es möglich, dass die Fähigkeit der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$  einander zu substituieren, in den unterschiedlichen zerebralen Gefäßabschnitten variiert. Darauf weisen auch Untersuchungen hin, die eine unterschiedliche Beteiligung der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$  am Ruhedurchmesser unterschiedlicher zerebraler Gefäße und ein unterschiedliches Ansprechen dieser Gefäße auf Kaliumkanalöffner festgestellt haben (Kapitel 1.4., 5.4, 5.5).

An Arteriolen der MCA deutet eine fehlende Beteiligung der  $K_{Ca}$  am Ruhedurchmesser auf eine verminderte funktionelle Aktivität der  $K_{Ca}$  in diesen Gefäßen hin. Im Gegensatz dazu sind  $K_{Ca}$  am Ruhedurchmesser des MCA-Gefäßhauptstammes beteiligt. Somit ist es denkbar, dass eine fehlende Beteiligung der  $K_{Ca}$  an der Vasodilatation zerebraler Arteriolen auf Azidose (Horiuchi *et al.*, 2002) auf einer vollständigen Substitution der  $K_{Ca}$  durch  $K_{ATP}$  beruht. Auf einer möglichen Mitbeteiligung der  $K_{Ca}$  an der Vasodilatation der untersuchten Gefäße und auf ein Zusammenspiel der  $K_{ATP}$  und der  $K_{Ca}$  weist auch die Tatsache hin, dass weder in der Arbeit von Kinoshita und Katusic (1997) noch in der Arbeit von Horiuchi *et al.* (2002) die Azidosereaktion vollständig blockiert wurde. Eine gemeinsame Vermittlung der Vasodilatation auf Azidose mit unterschiedlich stark ausgeprägter gegenseitiger Substitutionsfähigkeit der  $K_{ATP}$  und der  $K_{Ca}$  in den untersuchten Gefäßgebieten ist somit wahrscheinlich. Ein solcher Mechanismus wäre eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse über die Rolle der Kaliumkanäle an der Vasodilatation zerebraler Gefäße auf Azidose. Weiterführende Untersuchungen zur Darstellung von Expressionsmustern der beteiligten Kaliumkanäle dürften zur Klärung wesentlich beitragen.

Die vorliegenden Daten bieten weiterhin eine Erklärung für die Einwände, die von Wang *et al.* (1998) am Modell der permissiven Wirkung von NO/cGMP an der Vasodilatation auf Azidose erbracht wurden. Inhalt dieser Kritik war die Beobachtung, dass nach NOS-Blockade und Restitution eines basalen cGMP-Spiegels die Vasodilatation auf Azidose wahlweise durch Hemmung der  $K_{Ca}$  oder der  $K_{ATP}$  blockiert werden konnte. Dieses wurde unter physiologischen Bedingungen nicht beobachtet. Wang *et al.* (1998) schlossen daraus, dass die Restitution eines basalen cGMP-Spiegels unter NOS-Blockade keine physiologischen Verhältnisse wieder herstellen würde. Das Modell der Permissivität des NO/cGMP-Systems an der Vasodilatation auf Azidose wurde deshalb von Wang *et al.* (1998) in Frage gestellt. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass die Vasodilatation auf Azidose sowohl durch  $K_{ATP}$  als auch durch  $K_{Ca}$  vermittelt wird und von einem basalen cGMP-Spiegel abhängig ist. Somit ist es denkbar, dass in den Untersuchungen von Wang *et al.* (1998) die verwendete cGMP-Konzentration nicht ausreichend war, um den physiologisch vorkommenden, basalen cGMP-Spiegel und dadurch die Leitfähigkeit der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$  vollständig wiederherzustellen. Die Tatsache, dass in der Arbeit von Wang *et al.* (1998) nach Rekonstitution des basalen cGMP-Spiegels der Ruhedurchmesser nicht wiedererreicht wurde, lässt eine solche Erklärung möglich erscheinen. Zusammengefasst weisen die Ergebnisse unter Blockade von jeweils zwei Kaliumkanaltypen darauf hin, dass die Vasodilatation der A. cerebri media auf Azidose sowohl über  $K_{Ca}$  als auch über  $K_{ATP}$  vermittelt wird. Bei der Vermittlung der Vasodilatation auf Azidose wiesen die  $K_{Ca}$  und die  $K_{ATP}$  eine ausgeprägte Redundanz auf. Dabei konnten die  $K_{Ca}$  die Wirkung der  $K_{ATP}$  vollständig substituieren.

## 5.10. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die Funktion des NO/cGMP-Systems auf Ebene des cGMP und die Rolle der wichtigsten Kaliumkanalfamilien an der Vasodilatation der isolierten A. cerebri media der Ratte auf Azidose untersucht. Die Dilatation auf Azidose wurde als Modell-Stimulus für eine NO-modulierte Vasodilatation verwendet. Die Untersuchungen dienten der Beschreibung eines möglicherweise generellen Mechanismus der Dilatation zerebraler Gefäße auf NO-abhängige Stimuli.

Die Experimente belegen, dass die Azidosereaktivität der A. cerebri media (MCA) vom basalen, vaskulären cGMP-Spiegel abhängt. Das cGMP hat dabei eine permissive Funktion. Zusammen mit Vorversuchen aus unserer Arbeitsgruppe wurde erstmalig an einem einheitlichen Modell, an der gleichen Spezies (Ratte) und dem gleichen Gefäßbett (MCA) die Rolle des NO/cGMP-Systems an der Vasodilatation auf Azidose untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl NO als auch cGMP an dieser Gefäßreaktion als Modulatoren agieren.

Bei der Untersuchung der Rolle der Kaliumkanalfamilien an der Vasodilatation auf Azidose konnte unter Blockade der Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ ,  $K_{ATP}$ ,  $K_{ir}$  und  $K_V$ ) eine Beteiligung der  $K_{Ca}$  am Ruhedurchmesser und an der Azidosereaktivität der MCA beobachtet werden. Es wurden keine Hinweise für eine alleinige Beteiligung der  $K_{ATP}$ , der  $K_{ir}$  oder der  $K_V$  am Ruhedurchmesser oder an der Vasodilatation der MCA auf Azidose gefunden. Um die Möglichkeit eines Zusammenspiels der Kaliumkanalfamilien bei der Vermittlung der Vasodilatation auf Azidose zu erfassen, wurden Untersuchungen unter gleichzeitiger Gabe von zwei Kaliumkanalblockern durchgeführt. Nach gleichzeitiger Hemmung der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$  blieb die Vasodilatation auf Azidose vollständig aus. Unter Verwendung von Charybdotoxin, eines spezifischen Blockers der schnellleitenden  $K_{Ca}$  ( $BK_{Ca}$ ), und unter gleichzeitiger Blockade der  $K_{ATP}$  kam es ebenfalls zur Aufhebung der Vasodilatation auf Azidose. Die weiteren möglichen Kombinationen von jeweils zwei Kaliumkanaltypen ( $K_{ATP} + K_{ir}$ ;  $K_{ATP} + K_V$ ;  $K_{Ca} + K_V$ ;  $K_{Ca} + K_{ir}$ ;  $K_{ir} + K_V$ ) erbrachten keine zusätzlichen Ergebnisse.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, ergibt sich daraus, dass die Vasodilatation der MCA auf Azidose durch  $K_{ATP}$  und  $BK_{Ca}$  gemeinsam vermittelt wird. Dabei wurde eine ausgeprägte Redundanz dieser Kanäle beobachtet, d.h. die Funktion der  $K_{ATP}$  konnte durch die  $K_{Ca}$  bzw. der  $BK_{Ca}$  vollständig substituiert werden. Dieser Mechanismus bietet eine mögliche Erklärung für die heterogenen Ergebnisse, die bisher über die Rolle der Kaliumkanäle an der Vasodilatation zerebraler Arterien auf Azidose publiziert wurden.

Die Vermittlung der Vasodilatation auf Azidose durch  $K_{ATP}$  und  $K_{Ca}$  scheint nicht nur für die

Vermittlung der Vasodilatation zerebraler Arterien auf Azidose spezifisch zu sein, sondern auch der Vasodilatation auf NO zugrunde zu liegen (Hempelmann *et al.*, 2002).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bieten einen wichtigen Ausgangspunkt zur Überprüfung der zentralen Rolle der  $K_{ATP}$  und der  $K_{Ca}$  auf weitere, durch das NO/cGMP System modulierte dilatatorische Stimuli wie z.B. der funktionellen Aktivierung. Sie sind weiterhin Ausgangspunkt für derzeit laufende Untersuchungen einer funktionellen Modulation der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$  durch das NO/cGMP-System.

Neben der Untersuchung der Gefäßreaktion auf physiologische Stimuli bilden die vorliegenden Daten eine wesentliche Grundlage für die Erforschung der gestörten Vasodilatation zerebraler Arterien auf Azidose unter pathophysiologischen Bedingungen. So ist z.B. bekannt, dass die hyperkapnische Vasodilatation nach Ischämie (Bari *et al.*, 1997) beeinträchtigt ist und möglicherweise auf eine Inhibition der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$  zurückzuführen ist (Jagolino und Armstead, 2001). Weiterhin bieten neuere Arbeiten Hinweise dafür, dass die verminderte Vasodilatation zerebraler Gefäße auf Azidose nach Subarachnoidalblutung (Hoffmann *et al.*, 2000) bzw. nach Schädel-Hirn Trauma (Golding *et al.*, 1999) möglicherweise auf einer gestörten Aktivität der Kaliumkanäle beruht. Experimentelle Daten deuten dabei vor allem auf einer gestörten Aktivität der  $K_{Ca}$  und der  $K_{ATP}$  nach Schädel-Hirn Trauma hin (Salvucci und Armstead, 2000).

Die vorliegenden Untersuchungen eröffnen weiterhin die Möglichkeit, die Vasodilatation auf Azidose als ein interessantes Modell zur Erforschung des Zusammenspiels der Kaliumkanäle unter pathophysiologischen Bedingungen, die mit einer veränderten Aktivität dieser Kanäle einhergehen, zu verwenden und daraus möglicherweise neue therapeutische Konzepte zu entwickeln. Zu einer veränderten Aktivität der Kaliumkanäle kommt es z.B. im Rahmen der arteriellen Hypertonie (Liu *et al.*, 1997) sowie des Diabetes mellitus (Zimmermann *et al.*, 1997). Diese Erkrankungen weisen in den westlichen Industrienationen eine hohe Prävalenz auf und zählen zu den wichtigsten Risikofaktoren für das Erleiden eines Schlaganfalls.

## Literaturverzeichnis

- Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz P, Weir EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K-channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 7583-7587
- Armstead WM. Nociceptin/orphanin FQ dilates pial arteries by KATP and KCa channel activation. *Brain Res*. 1999; 835: 315-323
- Armstead WM. Vasopressin induced cyclooxygenase dependent superoxide generation contributes to K<sup>+</sup> channel function impairment after brain injury. *Brain Res*. 2001a; 910: 19-28
- Armstead WM. Endothelin-induced cyclooxygenase dependent superoxide generation contributes to K<sup>+</sup> channel functional impairment after brain injury. *J Neurotrauma*. 2001b; 18: 1039-1048
- Austin C, Wray S. The effects of extracellular pH and calcium change on force and intracellular calcium in rat vascular smooth muscle. *J Physiol*. 1995; 488: 281-291
- Austin C, Wray S. Interactions between Ca<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup> and functional consequences in vascular smooth muscle. *Circ Res*. 2000; 86: 355-363
- Avkiran M, Snabaitis AK. Regulation of cardiac sarcolemmal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activity: potential pathophysiological significance of endogenous mediators and oxidant stress. *J Thromb Thrombolysis*. 1999; 8: 25-32
- Avkiran M, Marber MS. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39: 747-753
- Ayata C, Ma J, Meng W, Huang P, Moskowitz MA. L-NA sensitive rCBF augmentation during vibrissal stimulation in type III nitric oxide synthase mutant mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996; 16: 539-541
- Barbier AJ, Lefebvre RA. Effect of LY 83583 on relaxation induced by non-adrenergic non-cholinergic nerve stimulation and exogenous nitric oxide in the rat gastric fundus. *Eur J Pharmacol*. 1992; 219: 331-334
- Bari F, Louis TM, Busija DW. Effects of ischemia on cerebral arteriolar dilation to arterial hypoxia in piglets. *Stroke*. 1998; 29: 222-228
- Bayerle-Eder M, Woltz M, Polska E, Langenberger H, Pleiner J, Teherani D, Rainer G, Polak K, Eichler HG, Schmetterer L. Hypercapnia-induced cerebral and ocular vasodilation is not altered by glibenclamide in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000; 278: R1667-R1673
- Bayliss WM. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol*. 1902; 28: 220-231
- Berger K. *Epidemiologie zerebrovaskulärer Erkrankungen*. in Hartmann A, Heiss WD. Der Schlaganfall – Pathogenese, Klinik, Diagnostik und Therapie akuter zerebrovaskulärer Erkrankungen. 2001, Steinkopff-Verlag, pp: 123-149

- Berger MG, Vandier C, Bonnet P, Jackson WF, Rush NJ. Intracellular acidosis differentially modulates KV channels in coronary and pulmonary vascular muscle. *Am J Physiol.* 1998; 275: H1351–H1359
- Blaustein MP. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and cell responsiveness. *Am J Physiol.* 1993; 264: C1367-C1387
- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* 1994; 368: 850-853
- Bonev AD, Nelson MT. ATP-sensitive potassium channels in smooth muscle cells from guinea pig urinary bladder. *Am J Physiol.* 1993; 264: C1190-C1200
- Bonev AD, Jaggar JH, Rubart M, Nelson MT. Activators of protein kinase C decrease Ca<sup>2+</sup> spark frequency in smooth muscle cells from cerebral arteries. *Am J Physiol.* 1997; 273: C2090-C2095
- Bonnet P, Rush NJ, Harder DR. Characterisation of an outward K<sup>+</sup> current in freshly dispersed cerebral arterial muscle cells. *Pflügers Arch.* 1991; 418: 292-296
- Brayden JE, Nelson MT. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science.* 1992; 256: 532-535
- Brenner R, Perez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT, Aldrich RW. Vasoregulation by the  $\beta_1$  subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature.* 2000; 407: 870-876
- Bryan RM Jr, Eichler MY, Swafford MW, Johnson TD, Suresh MS, Childres WF. Stimulation of  $\alpha_2$  adrenoreceptors dilates the rat middle cerebral artery. *Anesthesiology.* 1996; 85: 82-90
- Bryan RM Jr, Marrelli SP, Steenberg ML, Schildmeyer LA, Johnson TD. Effects of luminal shear stress on cerebral arteries and arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001a; 280: H2011-2022
- Bryan RM Jr, Steenberg ML, Marrelli SP. Role of endothelium in shear stress-induced constrictions in rat middle cerebral artery. *Stroke.* 2001b; 32: 1394-1400
- Busija DW. Role of prostaglandins in the response of the cerebral circulation to carbon dioxide in conscious rabbits. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1983; 3: 376-380
- Busija DW, Heistad DD. Effects of indomethacin on cerebral blood flow during hypercapnia in cats. *Am J Physiol.* 1983; 244: H519-H524
- Caesar K, Akgören N, Mathiesen C, Lauritzen M. Modification of activity-dependent increases in cerebellar blood flow by extracellular potassium in anaesthetized rats. *J Physiol.* 1999; 520: 281-292
- Chrissobolis S, Ziogas J, Chu Y, Faraci FM, Sobey CG. Role of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in K<sup>+</sup>-induced cerebral vasodilatation in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279: H2704-H2712
- Clark VP, Lai S, Deckel AW. Altered functional MRI responses in Huntington's disease. *NeuroReport.* 2002; 13: 703-706

- Dacey RG, Duling BR. A study of rat intracerebral arterioles: methods, morphology and reactivity. *Am J Physiol.* 1982; 243: H598-H606
- Davis MJ, Hill MA. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev.* 1999; 79: 387-423
- Denninger JW, Marletta MA. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signalling pathway. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1411: 334-350
- Dietrich HH, Dacey RG Jr. Effects of extravascular acidification and extravascular alkalinization on constriction and depolarization in rat cerebral arterioles in vitro. *J Neurosurg.* 1994; 81: 437-442
- Dietrich HH, Kimura M, Dacey RG Jr. N-Omega-L-arginine constricts cerebral arterioles without increasing intracellular calcium levels. *Am J Physiol.* 1994; 266: H767-H776
- Dirnagl U, Lindauer U, Villringer A. Nitric oxide synthase blockade enhances vasomotion in the cerebral microcirculation of anesthetized rats. *Microvasc Res.* 1993; 45: 318-323
- Donders FC. De bewegingen der hersenen en de veranderingen der vaatvulling van de pia mater, ook bij gesloten onzuigtetbaren schedel regtstreeks onderzocht. *Neederlandsch Lancet* 1849-1845; 521-553
- Dreier JP, Korner K, Gorner A, Lindauer U, Weih M, Villringer A, Dirnagl U. Nitric oxide modulates the CBF response to increased extracellular potassium. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996; 16: 1100-1107
- Duling RM, Rivers RJ. Isolation, cannulation and perfusion of microvessels. in Baker CH, Nastuk WL (eds). *Microcirculatory Technology.* 1986 Academic Press, Orlando, Florida
- Edwards FR, Hirst GD, Silverberg GD. Inward rectification in rat cerebral arterioles; involvement of potassium ions in autoregulation. *J Physiol.* 1988; 404: 455-466
- Falloon BJ, Stephens N, Tulip JR, Heagerty AM. Comparison of small artery sensitivity and morphology in pressurized and wire-mounted preparations. *Am J Physiol.* 1995; 268: H670-678
- Faraci F, Breese KR, Heistad DD. Cerebral vasodilation during hypercapnia - Role of glibenclamide-sensitive potassium channels and nitric oxide. *Stroke.* 1994; 25: 1679-1683
- Faraci FM, Heistad DD. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev.* 1998; 78: 53-97
- Feelisch M, Kotsonis P, Siebe J, Clement B, Schmidt HH. The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxodiazolo-[4,3,-a]quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. *Mol Pharmacol.* 1999; 56: 243-253
- Fukao M, Mason HS, Britton FC, Kenyon JL, Horowitz B, Keef KD. Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J Biol Chem.* 1999; 274: 10927-10935
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288: 373-376

- Ganitkevich V, Isenberg G. Isolated guinea pig coronary smooth muscle cells. Acetylcholine induces hyperpolarisation due to sarcoplasmic reticulum calcium release activating potassium channels. *Circ Res.* 1990; 67: 525-528
- Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol.* 1995; 48: 184-188
- Gaskell WH. On the toxicity of the hearth and blood vessels. *J Physiol.* 1880; 3: 48-75
- Gidari AS, Furchgott RF, Jothianandan D. Inhibition by LY83583 of endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. *FASEB J.* 1989; 3; A1178: 5528
- Golding EM, Robertson CS, Bryan RM Jr. Comparison of the myogenic response in rat cerebral arteries of different calibers. *Brain Res.* 1998;785: 293-298
- Golding EM, Robertson CS, Bryan RM Jr. The consequences of traumatic brain injury on cerebral blood flow and autoregulation: an review. *Clin Exp Hypertens.* 1999; 21: 299-332
- Golding EM, Robertson CS, Bryan RM Jr. L-Arginine partially restores the diminished CO<sub>2</sub> reactivity after mild controlled cortical impact injury in the adult rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000a; 20: 820-828
- Golding EM, Sternberg ML, Johnson TD, Bryan RM Jr. The effects of potassium on the rat middle cerebral artery. *Brain Res.* 2000b; 880: 159 -166
- Gupta S, McArthur C, Grady C, Ruderman NB. Stimulation of vascular Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. *Am J Physiol.* 1994; 266: H2146-H2151
- Harder DR. Effect of H<sup>+</sup> and elevated CO<sub>2</sub> on membrane electrical proprieties of rat cerebral arteries. *Pflüglers Arch.* 1982; 394: 182-185
- Harder DR, Alkayed NJ, Lange AR, Gebremedhin D, Roman RJ. Functional hyperemia in the brain: hypothesis for astrocyte-derived vasodilator metabolites. *Stroke.* 1998; 28: 229-234
- Harper SL, Bohlen HG, Rubin MJ. Arterial and microvascular contributions to the cerebral cortical autoregulation in rats. *Am J Physiol.* 1984; 246:H17-24
- Hayabuchi Y, Nakaya Y, Matsuoka S, Kuroda Y. Effect of acidosis on Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>-channels in cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. *Pflüglers Arch.* 1998; 436: 509 -514
- Hempelmann RG, Seebeck J, Kruse ML, Ziegler A, Mehdorn HM. Role of potassium channels in the relaxation induced by the nitric oxide (NO) donor DEA/NO in the isolated rat basilar artery. *Neurosci Lett.* 2001; 313: 21-24
- Hobbs AJ. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci* 1997; 18: 484-491
- Hoffman WE, Wheeler P, Edelman G, Charbel FT, Torres NJ, Ausman JI. Hypoxic brain tissue following subarachnoidal hemorrhage. *Anesthesiology* 2000; 92: 442-446
- Horiuchi T, Dietrich HH, Tsugane S, Dacey RG Jr. Role of potassium channels in the regulation of brain arteriolar tone: comparison of cerebrum versus brain stem. *Stroke.* 2001; 32: 218-224

- Horiuchi T, Dietrich HH, Hongo K, Goto T, Dacey RG Jr. Role of endothelial nitric oxide and smooth muscle potassium channels in cerebral arteriolar dilation in response to acidosis. *Stroke*. 2002; 33: 844-849
- Iadecola C. Does nitric oxide mediate the increase in cerebral blood flow elicited by hypercapnia? *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89: 3913-3916
- Iadecola C. Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link? *Trends Neurosci*. 1993; 16: 206-214
- Iadecola C, Xu X. Nitro-L-arginine attenuates hypercapnic cerebrovasodilation without affecting cerebral metabolism. *Am J Physiol*. 1994; 266: R518-R525
- Iadecola C, Zhang F, Xu X. SIN-1 reverses attenuation of hypercapnic cerebrovasodilation by nitric oxide synthase inhibitors. *Am J Physiol*. 1994; 267: R228-R235
- Iadecola C, Zhang F. Permissive and obligatory roles of NO in cerebrovascular responses to hypercapnia and acetylcholine. *Am J Physiol*. 1996; 271: R990-1001
- Iadecola C. Cerebral circulatory dysregulation in ischemia. In: *Cerebrovascular disease: pathophysiology, diagnosis, and management*. Ginsberg MD, Bogousslavsky J (eds), 1998 Massachusetts, Blackwell Science., pp 319-332
- Ignacio CS, Curling PE, Childres WF, Bryan RM Jr. Nitric-oxide-synthesizing perivascular nerves in the rat middle cerebral artery. *Am J Physiol*. 1997; 273: R661-R668
- Irikura K, Maynard KI, Lee WS, Moskowitz MA. L-NNA decreases cortical hyperemia and brain cGMP levels following CO<sub>2</sub> inhalation in Spargue-Dawley rats. *Am J Physiol*. 1994; 267: H837-843
- Ishizaka H and Kuo L. Acidosis-induced coronary arteriolar dilation is mediated by ATP-sensitive potassium channels in vascular smooth muscle. *Circ Res*. 1996; 78: 50-57
- Jaggard JH, Wellman GC, Heppner TJ, Porter VA, Perez GJ, Gollasch M, Kleppisch T, Rubart M, Stevenson AS, Lederer WJ, Knot HJ, Bonev AD, Nelson MT. Ca<sup>2+</sup>-channels, ryanodine receptors and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>-channels: a functional unit for regulating arterial tone. *Acta Physiol Scand*. 1998; 164: 577-587
- Jaggard JH, Porter VA, Lederer WJ, Nelson MT. Calcium sparks in smooth muscle. *Am J Physiol*. 2000; 278: C235-C256
- Jagolino A, Armstead WM. Nociceptin/orphanin FQ contributes to hypoxic/ischemic impairment of hypercapnic cerebrovasodilation. *Brain Res Bull*. 2001; 55: 465-468
- Janigro D, Nguyen TS, Meno J, West GA, Winn HR. Endothelium-dependent regulation of cerebrovascular tone by extracellular and intracellular ATP. *Am J Physiol*. 1997; 273: H878-885
- Johnson TD, Marrelli SP, Steenberg ML, Childres WF, Bryan RM Jr. Inward rectifier potassium channels in the rat middle cerebral artery *Am J Physiol*. 1998; 274: R 541-547
- Kety SS, Schmidt CF. The determination of cerebral blood flow by the use of nitrous oxide in low concentrations. *Am J Physiol*. 1945; 143: 53-66
- Kinoshita H, Katusic ZS. Role of potassium channels in relaxations of isolated canine basilar arteries to acidosis. *Stroke*. 1997; 28: 433-438

- Kinoshita H, Iranami H, Kimoto Y, Dojo M, Hatano Y. Mild alkalinization and acidification differentially modify the effects of lidocaine or mexiletine on vasorelaxation mediated by ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channels. *Anesthesiology* 2001; 95: 200-206
- Kleppisch T, Nelson MT. ATP-sensitive K-currents in cerebral arterial smooth muscle: pharmacological and hormonal regulation. *Am J Physiol.* 1995; 269: H1634-H1640
- Knot HJ, Nelson MT. Regulation of membrane potential and diameter by voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in rabbit myogenic cerebral arteries. *Am J Physiol.* 1995; 269: H348-355
- Knot HJ, Zimmermann PA, Nelson MT. Extracellular K<sup>+</sup>-induced hyperpolarisations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *J Physiol.* 1996; 492: 419-430
- Knot HJ, Nelson MT. Regulation of arterial diameter and wall [Ca<sup>2+</sup>] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. *J Physiol.* 1998; 508: 199-209
- Knot HJ, Standen NB, Nelson MT. Ryanodine receptors regulate arterial diameter and wall [Ca<sup>2+</sup>] in cerebral arteries of the rat via Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels. *J Physiol.* 1998; 508: 211-221
- Ko KR, Ngai AC, Winn HR. Role of adenosine in regulation of cerebral blood flow in sensory cortex. *Am J Physiol.* 1990; 259: H1703-1708
- Kolominsky-Rabas PL, Sarti C, Heuschmann PU, Graf C, Siemonsen S, Neundorfer B, Katalinic A, Lang E, Gassmann KG, von Stockert TR. A prospective community-based study of stroke. in Germany – The Erlangen Stroke Project (ESPro). *Stroke.* 1998; 29: 2501-2506
- Kontos HA, Raper AJ, Patterson JL. Analysis of vasoactivity of local pH, PCO<sub>2</sub> and bicarbonate on pial vessels. *Stroke.* 1977; 8: 358-360
- Kontos HA, Wei EP. Hydroxyl radical-dependent inactivation of guanylate cyclase in cerebral arterioles by methylene blue and by LY 83538. *Stroke.* 1993; 24: 427-434
- Kontos H, Wei EP. Arginine analogues inhibit responses mediated by ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol.* 1996; 271: H1498-1506
- Kubo M, Nakaya Y, Matsuoka S, Saito K, Kuroda Y. Atrial natriuretic factor and isosorbide dinitrate modulate the gating of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994; 74: 471-476
- Kuschinsky W, Wahl M, Bosse O, Thurau K. Perivascular potassium and pH as determinants of local pial arterial diameter in cats. A microapplication study. *Circ Res.* 1972; 31: 240-247
- Kuschinsky W. Neuronal-vascular coupling. A unifying hypothesis. *Adv Exp Med Biol.* 1997; 413: 167-176
- Kuschinsky W. Physiologie der Hirndurchblutung. in Hartmann A, Heiss WD. *Der Schlaganfall – Pathogenese, Klinik, Diagnostik und Therapie akuter zerebrovaskulärer Erkrankungen.* 2001, Steinkopff-Verlag, pp: 23-34
- Lang RJ, Harvey JR, McPhee GJ, Klemm MF. Nitric oxide and thiol reagent modulation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BKCa) channels in myocytes of guinea-pig taenia caeci. *J Physiol.* 2000; 525: 363-376
- Lauritzen M. Relationship of spikes, synaptic activity and local changes of cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001; 21: 1367-1383

- Lindauer U, Megow D, Schultze J, Weber J, Dirnagl U. Nitric oxide synthase does not affect somatosensory evoked potentials in the rat. *Neurosci Lett.* 1996; 216: 207-210
- Lindauer U, Megow D, Matsuda H, Dirnagl U. Nitric oxide: a modulator, but not a mediator of neurovascular coupling in rat somatosensory cortex. *Am J Physiol.* 1999; 277: H799-H811
- Lindauer U, Kunz A, Schuh-Hofer S, Vogt J, Dreier JP, Dirnagl U. Nitric oxide from perivascular nerves modulates cerebral arteriolar pH reactivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 281: H1353-1363
- Lindauer U, Vogt J, Schuh-Hofer S, Dreier JP, Dirnagl U. Cerebrovascular dilatation to extraluminal acidosis occurs via combined activation of ATP-sensitive and Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003, *in press*
- Liu Y, Hudetz AG, Knaus HG, Rusch NJ. Increased expression of Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup>-channels in the cerebral microcirculation of genetically hypertensive rats: evidence for their protection against cerebral vasospasm. *Circ Res.* 1998; 82: 729-737
- Ma J, Meng W, Ayata C, Huang PL, Fishman MC, Moskowitz MA. L-NNA-sensitive regional cerebral blood flow augmentation during hypercapnia in type III NOS mutant mice. *Am J Physiol.* 1996; 271: H1717-1719
- Mabe H, Blomquist P, Siesjo BK. Intracellular pH in the brain following transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1983; 3: 109-114
- Marczin N, Ryan US, Catravas JD. Methylene blue inhibits nitrovasodilator- and endothelium-derived relaxing factor-induced cyclic GMP accumulation in cultured pulmonary arterial smooth muscle cells via generation of superoxide anion. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992; 263: 170-179
- Marrelli SP, Johnson TD, Khorovets AK, Childres WF, Bryan RM Jr. Altered function of inward rectifier potassium channels in cerebrovascular smooth muscle after ischemia/reperfusion. *Stroke.* 1998; 29: 1469-1474
- Mayer B, Brunner F, Schmidt K. Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochem Pharmacol.* 1993; 45: 367-374
- McCarron JG, Halpern W. Potassium dilates rat cerebral arteries by two independent mechanisms. *Am J Physiol.* 1990; 259: H902-H908
- McPherson GA, Stork AP. The resistance of some rat cerebral arteries to the vasorelaxant effect of cromakalim and other K<sup>+</sup> channel openers. *Br J Pharmacol.* 1992; 105: 51-58
- Meininger GA, Davis MJ. Cellular mechanisms involved in the vascular myogenic response. *Am J Physiol.* 1992; 263: H647-H659
- Mistry DK, Garland CJ. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup>-channels (BKCa) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol.* 1998; 124: 1131-1140
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43: 109-142

- Moro MA, Russell RJ, Cellek S, Lizasoain I, Su Y, Darley-USmar VM, Radomski MW, Moncada S. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 1480-1485
- Mulsch A, Busse R, Liebau S, Forstermann U. LY 83583 interferes with the release of endothelium derived relaxing factor and inhibits soluble guanylate cyclase. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988; 247: 283-288
- Murphy ME, Brayden JE. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *J Physiol*. 1995; 486: 47-58
- Nagao T, Ibayashi S, Sadoshima S, Fujii K, Ohya Y, Fujishima M. Distribution and physiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the vertebrobasilar system of the rabbit. *Circ Res*. 1996; 78: 238-243
- Najarian T, Marrache AM, Dumont I, Hardy P, Beauchamp MH, Hou X, Peri K, Gobeil F Jr, Varma DR, Chemtob S. Prolonged hypercapnia-evoked cerebral hyperemia via K<sup>+</sup>-channel- and prostaglandin E<sub>2</sub>-dependent endothelial nitric oxide synthase induction. *Circ Res*. 2000; 87: 1149-1156
- Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol*. 1990; 259: C3-18
- Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*. 1995; 268: C799-C822
- Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ, Lederer W. Relaxation of arterial muscle by calcium sparks. *Science*. 1995; 270: 633-637
- Neumann-Haefelin T, Moseley ME, Albers GW. New magnetic imaging methods for cerebrovascular disease: emerging clinical applications. *Ann Neurol*. 2000; 47: 559-570
- Niwa K, Lindauer U, Villringer A, Dirnagl U. Blockade of nitric oxide synthase in rats strongly attenuates the CBF response to extracellular acidosis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1993; 13: 535-539
- Nguyen TS, Winn HR, Janigro D. ATP-sensitive potassium channels may participate in the coupling of neuronal activity and cerebrovascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: H878-885
- Okamoto H, Hudetz AG, Roman RJ, Bosnjak ZJ, Kampine JP. Neuronal NOS-derived NO plays a permissive role in cerebral blood flow response to hypercapnia. *Am J Physiol*. 1997; 272: H559-566
- Onoue H, Katusic ZS. Role of potassium channels in relaxations of canine middle cerebral arteries induced by nitric oxide donors. *Stroke*. 1997; 28: 1264-1271
- Osol G, Halpern W. Spontaneous vasomotion in pressurized cerebral arteries from genetically hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1988; 254: H28-33
- Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L. Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1990; 2: 161-190
- Paulson OB, Newman EA. Does the release from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science*. 1987; 237: 896-898

- Peng HL, Jensen PE, Nilsson H, Aalkjaer C. Effect of acidosis on tension and  $[Ca^{2+}]_i$  in rat cerebral arteries: is there a role for membrane potential? *Am J Physiol.* 1998; 274: H655-662
- Petersson J, Zygmunt PM, Hogestatt ED. Characterization of the potassium channels involved in EDHF-mediated relaxation in cerebral arteries. *Br J Pharmacol* 1997;120:1344-50
- Pirchard J, Rothman D, Nowotny E, Petroff O, Kuwabara T, Avinson M, Howseman A, Hanstock C, Shulman R. Lactate rise detected by  $[^1H]NMR$  in human visual cortex during physiological stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88: 5829-5831
- Plane F, Wiley KE, Jeremy JY, Cohen RA, Garland CJ. Evidence that different mechanisms underlie smooth muscle relaxation to nitric oxide and nitric oxide donors in the rabbit isolated carotid artery. *Br J Pharmacol.* 1998; 123: 1351-1358
- Porter VA, Bonev AD, Knot HJ, Heppner TJ, Stevenson AS, Kleppisch T, Lederer WJ, Nelson MT. Frequency modulation of  $Ca^{2+}$ -sparks is involved in regulation of arterial diameter by cyclic nucleotides. *Am J Physiol.* 1998; 274: C 1346-1355
- Quayle JM, McCarron JG, Brayden JE, Nelson MT. Inward rectifier  $K^+$  currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries. *Am J Physiol.* 1993; 265: C1363-1370
- Quayle JM, Bonev AD, Brayden JE, Nelson MT. Pharmacology of ATP-sensitive currents in smooth muscle cells from rabbit mesenteric artery. *Am J Physiol.* 1995; 269: C1112-1118
- Quayle JM, Nelson MT, Standen NB. ATP-Sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev.* 1997; 77: 1165-1232
- Rapoport RM, Schwartz K, Murad F. Effects of sodium-potassium pump inhibitors and membrane depolarizing agents on sodium nitroprusside-induced relaxation and cyclic guanosine monophosphate accumulation in rat aorta. *Circ Res.* 1985; 57: 164-170
- Reid JM, Paterson DJ, Ashcroft FM, Bergel DH. The effect of tolbutamide on cerebral blood flow during hypoxia and hypercapnia in anesthetised rat. *Pflügers Arch.* 1993;425: 362-364
- Robertson BE, Schubert R, Hescheler J, Nelson MT. cGMP-dependent protein kinase activates  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1993; 265: C299-303
- Robertson BE, Nelson MT. Aminopyridine inhibition and voltage dependence of  $K^+$  currents in smooth muscle cells from cerebral arteries. *Am J Physiol.* 1994; 267: C1589-1597
- Rosenblum WI, Kontos HA, Wei AP. Evidence for a  $K(ATP)$  ion channel link in the inhibition of hypercapnic dilation of pial arterioles by 7-nitroindazole and tetrodotoxin. *Eur J Pharmacol.* 2001; 417: 203-215
- Roy CS, Sherrington CS. On the regulation of the blood-supply of the brain. *J Physiol.* 1890;11:85-108
- Salvucci A, Armstead WM. Vasopressin impairs  $KATP$  and  $KCa$  channel function after brain injury. *Brain Res.* 2000; 887: 406-412
- Sampson LJ, Plane F, Garland CJ. Involvement of cyclic GMP and potassium channels in relaxation evoked by the nitric oxide donor, diethylamine NONOate, in the rat small isolated mesenteric artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2001; 364: 220-225

- Sándor P. Nervous control of the cerebrovascular system: doubts and facts. *Neurochem Int.* 1999; 35: 237-259
- Scheltens P, Korff ESC. Contribution of neuroimaging in the diagnosis of Alzheimer's disease and other dementias. *Curr Opin Neurol.* 2000; 13: 391-396
- Schubert R, Wesselman JP, Nilsson H, Mulvany MJ. Noradrenaline-induced depolarisation is smaller in isobaric compared to isometric preparations of rat mesenteric small arteries. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 1996; 431: 794-796
- Schuh-Hofer S, Lobsien E, Brodowsky R, Vogt J, Dreier JP, Klee R, Dirnagl U, Lindauer U. The cerebrovascular response to elevated potassium – role of nitric oxide in the in vitro model of isolated rat middle cerebral arteries. *Neurosci Lett.* 2001; 306: 61-64
- Smith GL, Austin C, Crichton C, Wray S. A review of the actions and control of intracellular pH in vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res.* 1998; 38: 316-331
- Smith ML, Auer RN, Siesjö BK. The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol.* 1984; 64: 319-332
- Sobey CG, Faraci FM. Effect of a novel inhibitor of guanylate cyclase on dilatator responses of mouse cerebral arterioles. *Stroke.* 1997a; 28: 837-843
- Sobey CG, Faraci FM. Effect of nitric oxide and potassium channel agonists and inhibitors on basilar artery diameter. *Am J Physiol.* 1997b; 272: H256-262
- Sobey CG, Faraci FM. Inhibitory effect of 4-aminopyridine on responses of the basilar artery to nitric oxide. *Br J Pharmacology.* 1999; 126: 1437-1443
- Sokoloff L. Local cerebral circulation at rest and during altered cerebral activity induced by anaesthesia or visual stimulation. in Kety SS, Elkes J (eds): *Regional Neurochemistry.* Oxford, Pergamon Press, 1961, pp 107-111
- Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature.* 1994; 372: 231-236
- Sun CW, Falck JR, Okamoto H, Harder DR, Roman RJ. Role of cGMP versus 20-HETE in the vasodilator response to nitric oxide in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279: H339-350
- Suzuki M, Takigawa T, Kimura K, Koseki C, Imai M. Immunohistochemical localization of pH-sensitive K<sup>+</sup>-channel, RACK1. *Am J Physiol.* 1995; 269: C496-503
- Tian R, Vogel P, Lassen NA, Mulvany MJ, Andreassen F, Aalkjaer C. Role of extracellular and intracellular acidosis for hypercapnia-induced inhibition of isolated rat cerebral arteries. *Circ Res.* 1995; 76:269-275
- Toda N, Hatano Y, Mori K. Mechanisms underlying response to hypercapnia and bicarbonate of isolated dog cerebral arteries. *Am J Physiol.* 1989; 257: H141-146
- Toyoda K, Fujii K, Ibayashi S, Kitazono T, Nagao T, Fujishima M. Role of ATP-sensitive potassium channels in brain stem circulation during hypotension. *Am J Physiol.* 1997; 273: H1342-H1346
- Urbanics R, Leniger-Follert E, Lubbers DW. Time course of changes of extracellular H<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> activities during and after electrical stimulation of the brain cortex. *Pflügers Arch.* 1978; 378: 47-53

- Villringer A, Dirnagl U. Coupling of brain activity and cerebral blood flow: basis for functional neuroimaging. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1995; 7: 240-276
- Vogel J, Sperandio M, Pries AR, Linderkamp O, Gaehtges P, Kuschinsky W. Influence of the endothelial glycocalyx on cerebral blood flow in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000; 20: 1571-1578
- Wahl M, Parsons AA, Schilling L. Dilating effect of perivascularly applied potassium channel openers cromakalim and pinacidil in rat and cat pial arteries in situ. *Cardiovas Res.* 1994; 28: 1803-1807
- Wang Q, Pelligrino DA, Baughmann VL, Koenig HM, Albrecht RF. The role of endothelium and nitric oxide synthase in rat pial arteriolar dilatatory responses to CO<sub>2</sub> in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994; 14: 944-951
- Wang Q, Pelligrino DA, Baughmann VL, Koenig HM, Albrecht RF. The role of neuronal nitric oxide synthase in regulation of cerebral blood flow in normocapnia and hypercapnia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1995;15:774-778
- Wang Q, Bryan RM Jr, Pelligrino DA. Calcium-dependent and ATP-sensitive potassium channels and the „permissive“ function of cyclic GMP in hypercapnia-induced pial arteriolar relaxation. *Brain Res.* 1998; 793: 187-196
- Wang Q, Bryowski J, Minshall RD, Pelligrino DA. Possible obligatory functions of cyclic nucleotides in hypercapnia induced cerebral vasodilation in adult rats. *Am J Physiol.* 1999; 276: H480-487
- Wellman GC, Nathan DJ, Saundry CM, Perez GJ, Bonev AD, Penar PL, Tranmer BI, Nelson MT. Ca<sup>2+</sup> sparks and their function in human cerebral arteries. *Stroke.* 2002; 33: 808-802
- Wolin MS, Cherry PD, Rodenburg JM, Messina EJ, Kaley G. Methylene blue inhibits vasodilation of skeletal muscle arterioles to acetylcholine and nitric oxide via the extracellular generation of superoxide anion. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990; 254: 872-876
- Xu H, Cui N, Yang Z, Wu J, Giwa LR, Abdulakir L, Sharma P, Jiang C. Direct activation of cloned KATP channels by intracellular acidosis. *J Biol Chem.* 2001; 276: 12898-12902
- You JP, Wang Q, Zhang W, Jansen-Olesen I, Paulson OB, Lassen NA, Edvinsson L. Hypercapnic vasodilatation in isolated rat basilar arteries is exerted via low pH and does not involve nitric oxide synthase stimulation or cyclic GMP production. *Acta Physiol Scand.* 1994; 152: 391-397
- Yu M, Sun CW, Maier KG, Harder DR, Roman RJ. Mechanism of cGMP contribution to the vasodilator response to NO in the rat middle cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282: H1724-H1731
- Zaritsky JJ, Eckman DM, Wellman GC, Nelson MT, Schwarz TL. Targeted disruption of Kir 2.1 and Kir 2.2 genes reveals the essential role of the inwardly rectifying K<sup>+</sup> current in K<sup>+</sup>-mediated vasodilation. *Circ Res.* 2000; 87: 160-166
- Zhang HL, Bolton TB. Two types of ATP-sensitive potassium channels in rat portal vein smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 1996; 118: 105-114
- Zimmermann PA, Knot HJ, Stevenson AS, Nelson MT. Increased myogenic tone and diminished responsiveness to ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channel openers in cerebral arteries from diabetic rats. *Circ Res.* 1997;81:996-100

## Abkürzungsverzeichnis

4 AP	4 Aminopyridin
ATP	Adenosintriphosphat
BaCl <sub>2</sub>	Bariumchlorid
BK <sub>Ca</sub>	kalziumabhängiger Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit, maxi-KCa
8 Br cGMP	8-Bromoguanosin 3',5'-zyklisches Monophosphat
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumionen
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Kalziumkonzentration
cAMP	zyklisches Adenosin Monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin Monophosphat
CHTX	Charybdotoxin
Glib	Glibenclamid
H <sup>+</sup>	Wasserstoffionen
K <sup>+</sup>	Kaliumionen
[K <sup>+</sup> ] <sub>e</sub>	extrazelluläre Kaliumkonzentration
K <sub>ATP</sub>	ATP-sensitive Kaliumkanäle
K <sub>Ca</sub>	Ca <sup>2+</sup> -abhängige Kaliumkanäle
K <sub>ir</sub>	einwärts gleichrichtende (rektifizierende) Kaliumkanäle (inward rectifier)
K <sub>v</sub>	spannungsabhängige Kaliumkanäle
MCA	A. cerebri media, middle cerebral artery
MLCK	Myosinleichtkettenkinase
7-NI	7 Nitroindazol
NO	Stickstoffmonoxid (Nitric Oxide)
NOS	NO-Synthase
nNOS	neuronale NO-Synthase
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ODQ	1H- [1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a]quinoxalin-1-eins
pCO <sub>2</sub>	Kohlendioxidpartialdruck
sGC	lösliche Guanylatzyklase
TEA	Tetraethylammonium
VOC	spannungsabhängige Kalziumkanäle

## **Danksagung**

Ich möchte mich hiermit bei Frau PD Dr. Ute Lindauer für die Überlassung des Themas und der intensiven wissenschaftlichen Betreuung bedanken. Ihre Unterstützung und die anregenden Diskussionen waren mir eine große Hilfe bei der Beantwortung der Fragestellung der vorliegenden Doktorarbeit.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Ulrich Dirnagl danken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Abteilung in einem wissenschaftlich hoch stimulierenden Umfeld zu arbeiten und die technische Ausrüstung zur Durchführung der Doktorarbeit zu nutzen. Ebenso möchte ich meinen Dank an Herrn Prof. Dr. Karl M. Einhäupl richten, der mir während der klinischen Ausbildung wichtige Impulse gegeben hat.

Meinen Kollegen aus der Abteilung für Experimentelle Neurologie, insbesondere Frau Dr. Sigrid Schuh-Hofer und den Herren cand. med. Elmar Lobsien, Dr. Dirk Megow, Dr. Jens P. Dreier und Marco Foddis möchte ich für die Zusammenarbeit und die fruchtbaren Diskussionen danken. Frau Dr. Brigitte Wegener vom Institut für Medizinische Biometrie der Charité möchte ich für die statistische Beratung danken.

Herrn cand. med. Robert Glumm aus dem Institut für Anatomie der Charité danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und den zahlreichen und gewissenhaften Korrekturen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir zur Seite gestanden haben sowie meiner Lebenspartnerin Nathalie für die Geduld und Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

## Lebenslauf

Name	Johannes Andreas Vogt	
Geburtsdatum	02.01.1970	
Geburtsort	Bukarest	
Familienstand	ledig	
Staatsangehörigkeit	deutsch	
Schulausbildung	1976 – 1980	Grundschule, Deutsche Schule Bukarest
	1980 – 1984	Deutsches Gymnasium Bukarest
	1984 – 1985	Gymnasium zum Altenforst, Troisdorf
	1985 – 1989	Kardinal Frings Gymnasium Bonn
	1989	Abitur
Hochschulausbildung	1990	Humanmedizin an der J.W. Goethe Universität in Frankfurt am Main
	1992	Physikum
	1993	I Staatsexamen
	1997	II Staatsexamen
	04/1997-03/1998	PJ mit Wahlfach Neurologie
	1998	III Staatsexamen
	10/1998	Step 1 des USMLE (201 Punkte)
	03/1999	Step 2 des USMLE (217 Punkte)
	02/2000 – 07/2001	AiP in der Neurologischen Klinik der an der Charité, HU Berlin
	seit 10/2001	wiss. Mitarbeiter in der AG Zell- und Neurobiologie am Institut für Anatomie der HU Berlin
seit 08/2003	Marie-Curie Stipendiat an der Universität Maastricht/NL	

## Publikationsliste

Lindauer U, Kunz A, Schuh-Hofer S, **Vogt J**, Dreier JP, and Dirnagl U. Nitric Oxide from perivascular nerves modulates cerebral arteriolar pH reactivity. *Am J Physiol* 2001; 281: H1353-H1363

Schuh-Hofer S, Lobsien E, Brodowsky R, **Vogt J**, Dreier JP, Klee R, Dirnagl U, Lindauer U. The cerebrovascular response to elevated potassium – role of nitric oxide in the in vitro model of isolated rat middle cerebral arteries. *Neurosci Lett*. 2001; 306: 61-64

Heimrich B, **Vogt J**, Simbürger E, Skutella T, Glumm R. Axon guidance and the formation of specific connections in the hippocampus. *Neuroembryology*. 2002; 4: 154-160

Lindauer U\*, **Vogt J\***, Schuh-Hofer S, Dreier JP, Dirnagl U. Cerebrovascular dilatation to extraluminal acidosis occurs via combined activation of ATP-sensitive and Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003, in press

Brinks H\*, Sierra A\*, **Vogt J\***, Deitinghofer L, Schönburg J, Monnier P, Müller B, Heimrich B and Skutella T. Role of RGM in the formation of the entorhino-hippocampal formation. submitted

*\*contributed equally as first author*

### **Eidstattliche Erklärung**

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation „Rolle der Kaliumkanäle und des cGMP bei der Dilatation der perfundierten A. cerebri media der Ratte auf Azidose" selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe, die vorliegende Dissertation auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmitteln sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 20. Januar 2003

.....

Johannes A. Vogt