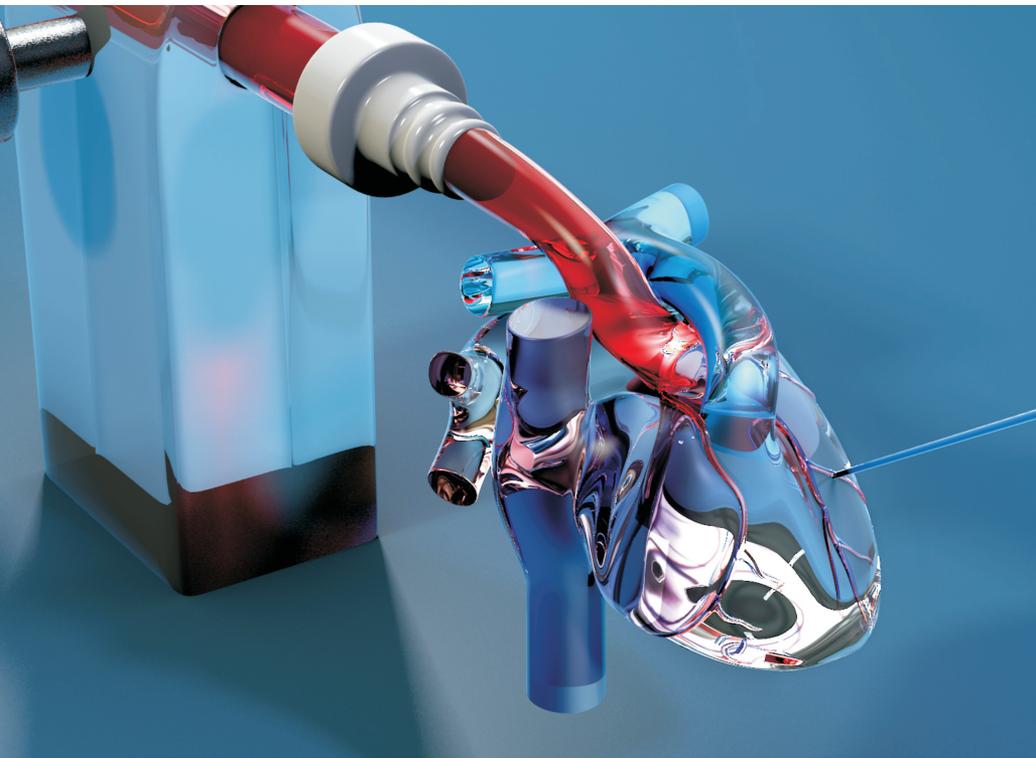


# Elektrophysiologische Regulationsmechanismen von koronaren Endothelzellen des Meerschweinchenherzens in der Dünnschnittpräparation

**Christoph Yves Malik**



**INAUGURALDISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Elektrophysiologische Regulationsmechanismen  
von koronaren Endothelzellen des  
Meerschweinchenherzens in der  
Dünnschnittpräparation**

**INAUGURALDISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Dr. med. Christoph Yves Malik**

aus Hanau

Gießen 2010

Aus der Medizinischen Betriebseinheit

Physiologisches Institut

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: PD Dr. A.Scholz

Gutachter: Prof. Dr. H. Tillmanns

Tag der Disputation: 15.12.2010

**Für meine Mutter**



1.	Einleitung.....	6
1.1.	Gefäßsystem des Menschen.....	6
1.2.	Koronare Gefäßregulation.....	7
1.3.	Gefäßregulationsmechanismen.....	8
1.4.	EDHF – endothelium-derived hyperpolarizing factor.....	9
1.5.	Hypoxische und metabolische Gefäßregulation.....	11
1.6.	Myoendotheliales-Synzytium.....	13
1.7.	Das Modell der Dünnschnittpräparation.....	14
1.8.	Aufgabenstellung.....	15
2.	Material und Methoden.....	16
2.1.	Präparation der Koronargefäße.....	16
2.2.	Lösungen.....	20
2.2.1.	Pipettenlösungen.....	20
2.2.2.	externe Lösungen.....	21
2.3.	Toxine und Versuchssubstanzen.....	23
2.3.1.	Glibenclamid.....	23
2.3.2.	Diazoxid.....	23
2.3.3.	18-β-Glycyrrhetinsäure.....	24
2.3.4.	1-Heptanol.....	24
2.3.5.	Acetylcholin.....	25
2.3.6.	Lucifer Yellow.....	26
2.3.7.	Carboxyfluorescein.....	26
2.4.	Die patch-clamp Technik.....	27
2.5.	Versuchsstand.....	30
2.5.1.	Experimentierkammer.....	31
2.5.2.	Pipetten.....	31
2.5.3.	Aufbau des Messstandes.....	32
3.	Ergebnisse.....	36
3.1.	Differenzierung von Endothelzellen im koronaren Stromgebiet von kleinen Arteriolen.....	36
3.1.1.	Elektrophysiologische Differenzierung von Endothelzellen.....	36
3.1.2.	Pharmakologische Differenzierung von Endothelzellen.....	39
3.2.	Kopplung von Endothelzellen über gap-junctions.....	41
3.2.1.	Darstellungsversuch der Zellkopplung mit Farbstoffen.....	41
3.2.2.	Vergleich von <i>gap-junction</i> Entkopplern 18-GA und 1-Heptanol.....	42
3.2.3.	Auswärtsstromblockade durch 1-Heptanol.....	44
3.2.4.	Reduktion der Hyperpolarisation nach ACh Applikation durch 18-GA.....	46
3.3.	Hypoxie.....	47
3.3.1.	Effekte von Hypoxie auf das Ruhepotential.....	47
3.3.1.	Effekte von Hypoxie auf den Auswärtsstrom.....	49

4.	Diskussion.....	52
4.1.	Besonderheiten mit dem Dünnschnittmodell.....	52
4.2.	Endothelzelltypen.....	52
4.3.	Endothelium derived hyperpolarizing factor (EDHF).....	53
4.4.	Beeinflussung der $K_{ATP}$ -Kanäle durch Glibenclamid und Diazoxid.....	54
4.5.	Funktionelle Zellkopplung zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen.....	55
4.6.	1-Heptanol und 18- $\beta$ -Glycyrrhetinsäure.....	56
4.7.	$O_2$ -Sensing in koronaren Arteriolen.....	57
5.	Zusammenfassung.....	60
6.	Summary.....	61
7.	Literaturverzeichnis.....	62
8.	Abbildungsverzeichnis.....	73
9.	Lebenslauf.....	74
10.	Danksagung.....	76

# 1. Einleitung

## *1.1. Gefäßsystem des Menschen*

In Deutschland stellen die Folgen der Koronare Herzkrankheit (KHK) trotz großer Anstrengung bezüglich Prävention und Therapie immer noch die häufigste Todesursache vor den Krebserkrankungen dar (Statistisches Bundesamt, 2007). Das Verständnis von den hierbei ablaufenden Pathomechanismen, aber auch den physiologischen Vorgängen, ist daher von erheblichem Interesse für eine verbesserte Therapie und primärer, sekundärer wie auch tertiärer Prävention. Betrachtet man das Gefäßsystem des Menschen, welches sich in Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venolen und Venen gliedert, so sind es die Koronararterien, welche den bisherigen interventionellen Therapieformen wie dem arteriokoronaren Bypass (ACB) oder der perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie (PTCA) mit oder ohne Stentimplantation zugänglich sind. Die eigentliche Regulation des koronaren Blutflusses mit der Adjustierung des Gefäßwiderstandes findet jedoch in den kleineren Arteriolen statt, weshalb sie Widerstandsgefäße genannt werden. Der Austausch von Nährstoffen, Sauerstoff- und Metaboliten erfolgt in den Kapillaren. Somit erscheint es gerade in Bezug auf Perfusionsstörungen wie der relativen oder absoluten myokardialen Ischämie interessant, die Mechanismen der koronaren Gefäßregulation insbesondere unter hypoxischen Bedingungen zu untersuchen.

Prinzipiell unterscheidet man zwischen systemischen und lokalen Regulationsmechanismen des Kreislaufs. Die zentralen Mechanismen beruhen auf dem vegetativen Nervensystem (Sympathikus und Parasympathikus) und auf hormonellen Regulationen (Adrenalin, Noradrenalin, Vasopressin, Renin, Angiotensin, Aldosteron, u.v.m.)

Die lokale Regulation beruht auf mehreren Mechanismen. Gefäße besitzen durch die Autonomie der glatten Muskelschicht der Tunica media einen Grundtonus. Dieser beruht unter anderem darauf, dass durch einen erhöhten Blutfluss die Aktivierung von mechanosensitiven Kationenkanälen zu einem Kationeneinstrom führt und hierdurch eine Depolarisation der glatten Muskelzelle hervorgerufen wird (Hoyer *et al.*, 1997; Yao *et al.*, 2003). Hierdurch öffnen sich spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, so dass es zu einem intrazellulären Kalziumeinstrom kommt, der zu einer Kontraktion der glatten Muskelzelle führt (Davis *et al.*, 1992).

Die Regulation vom Blutzufuss einzelner Organsysteme beruht zum Großteil auf vasoaktiven Stoffwechselprodukten. Mediatoren können hier  $\text{CO}_2$ , Laktat,  $\text{K}^+$ -Ionenkonzentration,

Adenosin, Sauerstoffpartialdruck des Gewebes und Plasmaosmolalität sein (von Beckerath *et al.*, 1991; Frobert *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2000).

Eine weitere sehr wichtige Rolle in der Regulation des Blutflusses spielt das Endothel. Dieses kann auf verschiedenste Stimuli mit der Freisetzung von gefäßaktiven Substanzen (Autakoide) reagieren. Stimuli hierfür sind Schubspannung, O<sub>2</sub>-Partialdruck und verschiedenste vasoaktive Substanzen wie z.B. Acetylcholin, Histamin, ADP (Adenosindiphosphat), Substanz P (Pohl & Busse, 1989; Pohl *et al.*, 1991).

### ***1.2. Koronare Gefäßregulation***

Das Herz-Kreislauf-System des Menschen gliedert sich in einen sogenannten großen und kleinen Kreislauf. Im kleinen Kreislauf wird durch die Lunge eingeatmeter Sauerstoff in das Blut aufgenommen und CO<sub>2</sub> als Stoffwechselendprodukt über die Lunge abgegeben. Im großen Kreislauf fließt Sauerstoff- und nährstoffreiches Blut in die Gewebepерipherie zur Verstoffwechslung und anschließend zurück zum Herzen, nachdem es Stoffwechselendprodukte wie z.B. CO<sub>2</sub> in der Peripherie aufgenommen hat. In beiden Teilen des Kreislaufs gliedert sich der Gefäßbaum in Arterien verschiedenen Durchmessers, welche das Blut vom Herzen wegtransportieren, in Kapillaren, in denen der Austausch der Nährstoffe, der Blutgase (Sauerstoff, CO<sub>2</sub>) und Stoffwechselprodukte stattfindet und in Venen verschiedenen Durchmessers, welche das Blut zum Herzen zurückführen und eine gewisse Reservoir- und *pooling*-Funktion übernehmen. Die Regulation des Gefäßwiderstandes findet über sehr vielfältige Mechanismen statt: durch Innervation mit autonomen Nervenfasern, ekkrin, endokrin und parakrin ausgeschüttete vasodilatative oder –konstriktorische Hormone und Mediatoren, Ischämie, Hypoxie, und weitere.

Im Gegensatz zur Blutversorgung in den übrigen terminalen Gefäßstromgebieten des Körpers findet die Durchblutung des Myokards vor allem in der Diastole statt, da die subendokardialen Gefäße in der Systole als Folge der systolischen Kontraktionen des Myokards komprimiert werden. Die Durchblutung des Myokards stellt deshalb ein besonders sensibles Gleichgewicht aus Relaxationszeit des Herzens und Blutfluss dar. Durch Beeinträchtigung des koronaren Blutflusses aufgrund einer koronaren Gefäßstenose oder vermehrtem Sauerstoffbedarf des Myokards durch vermehrte Herzarbeit (hohe Herzfrequenz

oder Steigerung der Vor- bzw. Nachlast), kann eine relative oder absolute Sauerstoffschuld des Myokards entstehen. Dies führt innerhalb weniger Sekunden zu einer Verschlechterung der myokardialen Kontraktion (Dietrich *et al.*, 2000), so dass es zu einer Myokardischämie und bei Persistenz zu einem Herzinfarkt mit Untergang von Herzmuskelgewebe führt. Die Symptome der Ischämie sind als Angina pectoris bekannt. Um dem Gewebeuntergang entgegenzuwirken, laufen diverse pathophysiologische Mechanismen ab, die zu einer Vasodilatation führen. Dennoch reichen diese Gegenmaßnahmen des Körpers häufig nicht aus, so dass es zum manifesten Herzinfarkt kommt.

### ***1.3. Gefäßregulationsmechanismen***

Durch Relaxation der glatten Muskelzellen der *Tunica media* in arteriellen und venösen Gefäßen kommt es zur Dilatation des Gefäßdurchmessers und zum Absinken des Gefäßwiderstandes. Somit stellt die Vasodilatation durch Fehlen einer aktiven Vasokonstriktion einen passiven Zustand des Gefäßes dar.

Auf molekularer Ebene kommt eine Kontraktion glatter Muskelzellen durch den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum oder aus dem Extrazellulärraum zustande. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden an das Protein Kalmodulin. Der Komplex aus beiden aktiviert das Enzym Myosin-Light-Chain-Kinase. Durch die Myosinkinase findet unter Verbrauch von einem Molekül ATP die Phosphorylierung des Myosins statt, wodurch es mit dem Aktin der Muskelzelle interagieren kann.

Eine Antagonisierung dieses Mechanismus kann also durch die Dephosphorylierung des Myosins (Myosin-Light-Chain-Phosphatase) oder durch Senkung des intrazellulären Kalziumspiegels  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Kalziumsymporter oder -antiporter) erfolgen, wobei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das sarkoplasmatische Retikulum oder nach extrazellulär transportiert werden.

Im Wesentlichen gibt es drei Regelmechanismen, die zu einer Vasodilatation durch Relaxation glatter Muskelzellen führen:

1. Durch eine Hyperpolarisation der Zellmembran kommt es zu einer Inaktivierung von spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, wodurch keine Kalziumionen in das Zytoplasma eindringen können, die zu einer Kontraktion führen.

2. Eine Stimulation von membranständigen Rezeptoren führt über die Bildung eines stimulierenden G-Proteins zu einer Aktivierung der membranständigen Adenylatcyclase, wodurch eine Bildung von cAMP aus ATP resultiert. Hierdurch wird die Aktivität der Protein Kinase A (PKA) erhöht, die die Myosin-Light-Chain-Kinase (MLCK) phosphoryliert und sich deren Aktivität vermindert. Dies führt zu einer Dephosphorylierung des Myosins, was wiederum zu einer Relaxation der glatten Muskelzelle führt.
3. Die Ausschüttung von *Endothelium derived relaxing factor* (EDRF), in manchen Gefäßstromgebieten mit NO gleichgesetzt, führt zu einer Stimulation der Protein Kinase G (PKG), welche vermehrt cGMP produziert. Hierdurch kommt es zur Phosphorylierung der Myosin-Light-Chain-Kinase (MLCK), wodurch sich die Aktivität der MLCK vermindert. Dies wiederum führt zu einer Dephosphorylierung der myosin Leichtketten (Myosin-Light-Chain; MLC). Außerdem kommt es zu einer Aktivierung der sarkoplasmatischen/endoplasmatischen Reticulums  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA), die vermehrt Kalziumionen zurück in das sarkoplasmatische Retikulum pumpt. Beide Mechanismen führen zu einer Relaxation der glatten Muskelzelle.

In den physiologischen und pathophysiologischen Regelkreisen gibt es viele endogene Substanzen, die sich der o.g. den Nummern zugehörigen Mechanismen bedienen: EDHF<sup>1</sup>, Depolarisation<sup>1</sup>, interstitielles  $\text{K}^{+1}$ ,  $\text{NO}^2$ ,  $\beta_2$ -adrenerge Agonisten<sup>2</sup>, Histamin<sup>3</sup>, Prostacyclin<sup>2</sup>, Prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>)<sup>2</sup>, Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)<sup>2</sup>, VIP<sup>2,3</sup>, L-Arginin<sup>3</sup>, extrazelluläres Adenosin<sup>1</sup>, ATP<sup>3</sup> und ADP<sup>3</sup>, Bradykinin<sup>3</sup>, Substanz P<sup>3</sup>, CO<sub>2</sub>, Hypoxie<sup>1</sup>.

Auf exogene Substanzen kann aufgrund deren großen Anzahl hier nur begrenzt eingegangen werden.

### ***1.4.EDHF – endothelium-derived hyperpolarizing factor***

In Versuchen, in denen die NO-, bzw. Prostazyklinproduktion, die zu einer Gefäßdilatation führen, blockiert wurden, konnte weiterhin eine Gefäßdilatation beispielsweise durch Carbachol, Acetylcholin (ACh) oder Bradykinin hervorgerufen werden (Bolton *et al.*, 1984; Beny & Brunet, 1988; Feletou & Vanhoutte, 1988; Sainsbury *et al.*, 2007). Dies deutete auf

das Vorhandensein eines weiteren, von den oben genannten Regelkreisen unabhängigen Regulationsmechanismus des Gefäßflusses hin, der aufgrund seines Ursprunges im Endothel *endothelium derived hyperpolarizing factor* (EDHF) genannt wird. Der vermutete Mechanismus ist, dass eine Hyperpolarisation der Endothelzelle durch ACh-Applikation über *gap-junctions* die glatten Muskelzellen, die an die Endothelzelle gekoppelt sind, hyperpolarisiert (Busse *et al.*, 1988; Hill *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 2000). In diesen schließen sich daraufhin spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, wonach sich die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration der glatten Muskelzelle verringert und damit die Kontraktion beendet wird.

In Kremasterarterien der Maus existiert der Hinweis, dass ACh in Endothelzellen zu einer Hyperpolarisierung durch Aktivierung von  $\text{SK}_{\text{Ca}}$ -Kanälen (small conductance calcium-activated potassium channel) führt, in glatten Muskelzellen jedoch zu einer Aktivierung von  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ -Kanälen und damit zu einer Hyperpolarisierung der glatten Muskelzellen, wobei die Ausbreitung eines diffusiblen Faktors (EDHF) und nicht die Kopplung von *gap junctions* eine besondere Rolle zu spielen scheint (Siegl *et al.*, 2005). Hiernach hinge die endothelabhängige Hyperpolarisation der glatten Muskelzelle nicht direkt von Hyperpolarisation der Endothelzelle ab.

Der Wirkmechanismus von EDHF ist trotz ausgiebigen Untersuchungen der letzten Jahre nicht abschließend geklärt. Möglicherweise erfolgt die Regulation je nach Versuchstiermodell durch unterschiedliche Faktoren. Letztlich stellt die Regulation über EDHF einen Mechanismus der Gefäßregulation des Endothels der Gefäßintima durch parakrine Sekretion eines Faktors dar, der zu einer NO- und Prostacyclinunabhängigen Relaxation der Gefäßmuskulatur führt.

Einige Arbeitsgruppen nehmen an, dass es sich bei EDHF um  $\text{K}^{+}$ -Ionen handelt (Edwards *et al.*, 1998). Die hierbei hervorgerufene Dilatation kann durch die Blockade von Charybdotoxin- und Apamin-sensitiven Kaliumkanälen in Endothelzellen, die eine Hyperpolarisation der Endothelzellen und damit eine Vasodilatation hervorrufen, verhindert werden. Andere Arbeitsgruppen meinen, eine Aktivierung des Cannabinoid Rezeptors Typ 1 (CB 1) durch das Endocannabinoid Anandamid als Ursache für die endothelabhängige Vasodilatation identifiziert zu haben (Randall *et al.*, 1996). Darüber hinaus berichten einige Arbeitsgruppen, dass durch Cytochrom P450-Epoxygenasen hergestellte Derivate der Arachidonsäure, Epoxyeicosanoide (EET) eine EDHF-Reaktion induzieren können (Fleming *et al.*, 2001). Ein weiterer Faktor, der eine endothelabhängige Hyperpolarisation hervorrufen kann und als EDHF diskutiert wird ist  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Shimokawa & Morikawa, 2005).

Ebenso werden *gap-junctions* zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen mit EDHF-Aktivitäten in Verbindung gebracht, wobei diese hierbei am ehesten zu einer Übertragung der Zellhyperpolarisierung führen und nicht selbst den Faktor darstellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei EDHF am ehesten nicht um einen einzelnen Faktor, sondern eher um einen weiteren endothelabhängigen Mechanismus handelt, der bei Versagen des EDRF zu einer Vasodilatation führen kann. Besonders in kleinen Arterien des Widerstandsstromgebietes und der Organversorgung scheint EDHF eine bedeutende Rolle zu spielen (Luksha *et al.*, 2009).

### ***1.5. Hypoxische und metabolische Gefäßregulation***

Da der energetische Metabolismus des menschlichen Körpers an Sauerstoff gebunden ist, bedarf es einer raschen Reaktionsfähigkeit des Organismus auf eine Minderung des Sauerstoffpartialdruckes im Gefäßsystem und den zu versorgenden Geweben, um rasch reagieren zu können und damit das Überleben der Zellen zu sichern. Um eine generalisierte Hypoxie des Organismus zu verhindern und die Homöostase aufrecht zu erhalten, existieren spezialisierte Sensorzellen in chemosensitiven Organen (Carotissinus, pulmonale neuroepitheliale Körperchen, glatte Muskelzellen von Pulmonalarterien), die innerhalb von Sekunden bis Minuten auf eine Hypoxie reagieren können. In der Literatur finden sich viele Hinweise, dass die Eigenschaft eines Gewebes Hypoxie wahrnehmen und auf diese mit spezifischen Mechanismen reagieren zu können, eine sehr wichtige und weitverbreitete Eigenschaft darstellt. Es wurden verschiedene durch Hypoxie regulierte Ionenkanäle beschrieben. In der Gruppe der spannungsabhängigen Kaliumkanäle finden sich viele Vertreter der Familien Kv 1.x, 2.x, 3.x, 4.1 mit unterschiedlichsten Verteilungsmustern und Regulationsmechanismen im Körper (Kline *et al.*, 2005; Szigligeti *et al.*, 2006; Archer *et al.*, 2004; Perez-Garcia *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2002). Weitere hypoxiesensitive Kanäle stellen einzelne Vertreter der Tandem-P-Domain Kaliumkanäle (Lewis *et al.*, 2001; Buckler *et al.*, 2000) und der große kalziumabhängige Kanal BK<sub>Ca</sub> (Peers, 1990) für den die Inhibition durch Hypoxie als einen der ersten Kanäle beschrieben wurde.

Prinzipiell finden sich im Körper zwei verschiedene Reaktionen auf eine Hypoxie. Im pulmonalen Kreislauf reagieren die Gefäße auf eine Hypoxie mit einer Vasokonstriktion. Dieser Mechanismus ist auch als Euler-Liljestrand-Mechanismus bekannt und dient der

ökonomischen Umverteilung des pulmonalen Blutflusses auf gut ventilierte Alveolen. Die zugrundeliegenden physiologischen Mechanismen laufen in mehreren Phasen ab und stellen sich äußerst komplex dar (Aaronson *et al.*, 2006; McMurtry *et al.*, 1976). Derzeit wird angenommen, dass die Blockade hypoxiesensitiver spannungsabhängiger  $K^+$ -Kanäle glatter Gefäßmuskelzellen zu einer Depolarisierung des Membranpotentials führen (Osipenko *et al.*, 2000), wodurch es zu einer Aktivierung spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanälen vom L-Typ und damit zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  und zur Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzelle kommt. Zusätzlich scheint es bei Andauer des Effektes zu einer Sensitivierung der Kalziumkanäle durch Aktivierung einer RhoA/Rho-kinase (Aaronson *et al.*, 2006) zu kommen.

In Arterien des koronaren Gefäßsystems kommt es unter Hypoxie jedoch zu einer Vasodilatation. Auf molekularer Ebene scheinen an diesem Phänomen verschiedene Mechanismen beteiligt zu sein. Unter hypoxischen Bedingungen kommt es zu einer Freisetzung von Adenosin aus dem hypoxischen Gewebe (Berne, 1963), was zu einer Gefäßdilatation führt. Dieser Effekt kann durch eine Blockade der NO-Synthase (NOS) (Bryan & Marshall, 1999) oder durch Entfernung der Endothelzellschicht mit dem darauf befindlichen Adenosin-Rezeptor in einem Rattenmodell unterbunden werden (Ray *et al.*, 2002).

Zusätzlich scheint eine Freisetzung von NO, endothelialen Prostaglandinen, ATP und die Aktivität von Kaliumkanälen glatter Muskelzellen (Busse *et al.*, 1984; Messina *et al.*, 1992; Kalsner, 1977) einen Beitrag zur hypoxischen Vasodilatation unter moderater Hypoxie mit einem Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) von 20 – 40 mmHg zu leisten. Unter schwerer Hypoxie bei einem  $pO_2$  von 20 mmHg kommt es hingegen zu einer Reduktion sauerstoffabhängigen Prostaglandinproduktion und hierdurch zu einer Vasokonstriktion (Liu, 1999; Vedernikov *et al.*, 1990).

Durch die Ausschüttung von Adenosin kommt es zu einer Stimulierung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen ( $K_{ATP}$ ) (Akatsuka *et al.*, 1994). Ein möglicher Sensor für eine Deprivation an Energieäquivalenten, der bei Absinken des ATP-Spiegels in der Zelle zu einer Vasodilatation führt, ist der ATP-abhängige Kaliumkanal ( $K_{ATP}$ ). Zytoplasmatisches ATP bindet an den  $K_{ATP}$  von glatten Muskelzellen und verringert damit seine Offenwahrscheinlichkeit. Sinkt jedoch der plasmatische ATP-Spiegel, erhöht sich die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals. Durch den  $K^+$ -Ionen Ausstrom aus der Zelle kommt es zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran, wodurch spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle deaktiviert werden und es zu einer Vasodilatation kommt. (Standen *et al.*, 1989).

In der neueren Literatur wird darüber hinaus die Ausschüttung von ATP aus Erythrozyten durch eine Stimulierung eines erythrozytenständigen Hypoxiesensors diskutiert (Ellsworth, 2004; Farias, III *et al.*, 2005).

Die ebenfalls an der Gefäßregulation beteiligten P2Y- (G-Protein gekoppelt) bzw. P2X-Rezeptoren (Ionenkanal gekoppelt), die durch ATP zu einer Gefäßdilataion führen, scheinen unter Hypoxie keine modulatorische Rolle zu spielen (Malmsjö *et al.*, 2000; Knight *et al.*, 2003; Harrington *et al.*, 2007).

### **1.6. Myoendotheliales-Synzytium**

Wie in vorangegangenen Abschnitten beschrieben, sind weder die Gruppe der Endothelzellen, noch die glatten Muskelzellen als isolierte Zellen zu betrachten. Sie bilden vielmehr vielfältige Zellkontakte untereinander über *gap-junctions*. *Gap-junctions* werden durch sechs transmembranäre Proteine (Connexine) zusammengesetzt, die sich zu einer Membranpore (Connexon) zusammenlagern. Connexone verschiedener Zellen, die sich gegenüberliegen, stellen eine direkte Verbindung der Zytoplasmen der beteiligten Zellen her und bilden somit eine *gap-junction*. Es bestehen Verbindungen zwischen den einzelnen Endothelzellen untereinander, zwischen den einzelnen glatten Muskelzellen und zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen (Christ *et al.*, 1996; Chaytor *et al.*, 2005). Über diese Zellkontakte kann es sowohl zum Austausch von Molekülen bis zu einer Größe von 1,5 nm und einer molekularen Masse von 1 kDa (Simpson *et al.*, 1977), wie auch elektrischen Signalen kommen (elektrotonische Kopplung), wodurch die Endothel-Muskelschicht von Gefäßen als myoendotheliales Synzytium funktioniert und Signale sehr rasch entlang, aber auch entgegengesetzt der Blutflussrichtung fortgeleitet werden können (Segal *et al.*, 1989; Beny, 1990).

Prinzipiell können die Connexone durch identische (homotypische *gap-junctions*) oder verschiedenartige (heterotypische *gap-junctions*) Connexine (Cx) zusammengesetzt werden. Im Menschen sind Codierungen für 21 Connexine bekannt (Sohl & Willecke, 2004). Es kommen jedoch nach derzeitigem Wissen nur die Connexine Cx37, Cx40, Cx43 und Cx45 in Zellen des Kardiovaskulären Systems vor (Cai *et al.*, 2001; Li & Simard, 2001).

*Gap-junctions* sind jedoch nicht einfach als passive Poren zwischen zwei Zellen zu sehen. Sie unterliegen eigenen Regulationsmechanismen. Ein intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg (Calmodulin)

(Berthoud *et al.*, 1992), wie auch Anstieg von  $H^+$  führt zu einem Verschluss der *gap-junctions* (Swietach *et al.*, 2007). Moleküle wie cAMP wirken als Modulatoren auf die Durchgängigkeit (De Mello, 1983). Depolarisationen der Zellmembran können *gap-junctions* ebenfalls verschließen (Harris, 2001).

### ***1.7. Das Modell der Dünnschnittpräparation***

Vaskuläre Regulationsmechanismen in verschiedenen Stromgebiete können sich sehr stark unterscheiden (Umeda *et al.*, 1997). Häufig finden Untersuchungen zur Gefäßregulation entweder in leicht zugänglichen Stromgebieten wie der Aorta (Beny & Brunet, 1988) oder nach Isolation der Gefäße statt (Schnitzler *et al.*, 2000). Hierbei gewonnene Erkenntnisse können verfälscht werden oder für andere Stromgebiete unzutreffend sein, wie beispielsweise an der hypoxischen Vasokonstriktion im Lungenstromgebiet und der hypoxischen Vasodilatation des Herzens zu sehen ist.

Das hier neu genutzte Modell der Dünnschnittpräparation bietet die besondere Möglichkeit, physiologische Vorgänge an den in situ befindlichen Widerstandsgefäßen des koronaren Stromgebietes mit Hilfe der *patch-clamp*-Technik zu untersuchen

In einer vorangegangenen Dissertation (Ettorre, 2006), die das hier verwendete Modell am Meerschweinchenherzen zur Untersuchung von Koronargefäßen verwendet hat, konnte gezeigt werden, dass im arteriellen Gefäßstromgebiet prinzipiell zwei unterschiedliche Endothelzelltypen gefunden werden können:

1. Zellen mit einem im *whole-cell*-Konfiguration sehr hohen Eingangswiderstand, die eine geringe Variabilität des Ruhepotentials zeigten
2. Zellen mit einem geringen Eingangswiderstand, die nach Applikation von 10  $\mu$ M Acetylcholin eine ausgeprägte Hyperpolarisation zeigten.

In der ersten Zellkategorie war ein Auswärtsstrom, welcher als ein spannungsabhängiger Kaliumstrom des  $K^+$ -Kanals  $K_v$  1.3 identifiziert werden konnte, nachweisbar. Dieser Kaliumstrom leistete einen hohen Beitrag zum Ruhepotential der untersuchten Endothelzellen. Eine Blockade des spannungsabhängigen Kaliumstromes führte zu einer Depolarisation des Ruhepotentials der untersuchten Zellen.

### ***1.8. Aufgabenstellung***

Die Bedeutung des spannungsabhängigen Kaliumkanals  $K_v$  1.3 für die Generierung des Ruhemembranpotentials der Endothelzellen im koronaren Widerstandsstromgebiet konnte durch Ettore (2006) gezeigt werden. Auf dieser Arbeit aufbauend sollten am vorliegenden Modell der Dünnschnittpräparation weitere Regulationsmechanismen insbesondere der Zellkopplung und Mechanismen der hypoxischen Vasodilatation untersucht werden.

Eine wichtige Eigenschaft des koronaren Stromgebietes ist die Hypoxiesensitivität und dessen Reaktion einer hypoxischen Vasodilatation. Für viele spannungsabhängige Kaliumkanäle, wie auch für den im untersuchten Stromgebiet vorkommenden  $K_v$  1.3, ist die Eigenschaft der Hypoxiesensitivität in einem T-Zell Modell beschrieben (Szigligeti *et al.*, 2006). Hiervon ausgehend sollte der Einfluss von Hypoxie auf das Membranpotential von Endothelzellen untersucht werden.

Darüber kommt der interzellulären Kommunikation von Endothel- und glatten Muskelzellen durch Kopplung über *gap-junctions* eine große Bedeutung zu. Die Kopplung von Endothelzellen und glatten Muskelzellen sollte mit intravitaler Fluoreszenzmikroskopie und unter Anwendung von *gap-junction* entkoppelnden Substanzen untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### *2.1. Präparation der Koronargefäße*

Für die Dünnschnitt Präparation des Meerschweinchenherzens wurden Rosettenmeerschweinchen (*Cavia porcellus*) aus eigener Zucht (Physiologisches Institut, Justus-Liebig-Universität Giessen) mit einem Gewicht zwischen 280 und 380 g verwendet. Dies entspricht einem Alter von 14 bis 21 Tagen. Es wurden Tiere beiderlei Geschlechts präpariert.

Konform mit dem Tierschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland (Fassung von 1990) erfolgte eine Dekapitation an dem nicht anästhesierten Tier mit einer Guillotine (Feinmechanische Werkstatt, Physiologisches Institut, Gießen). Der Thorax wurde durch zwei parasternale Schnitte eröffnet (Abbildung 1). Nach scharfer Präparation und Öffnung des Perikardbeutels wurde das Herz von der Lunge und den großen Gefäßen separiert und in eine Präparationsschale mit halb zu feinen Kristallen gefrorener und halb flüssiger physiologischer Salzlösung (PSL) gelegt. Bis zu diesem Zeitpunkt schlug das Herz noch immer spontan. Die Kontraktionen wurden erst durch die Kühlung dieser Eislösung beendet.



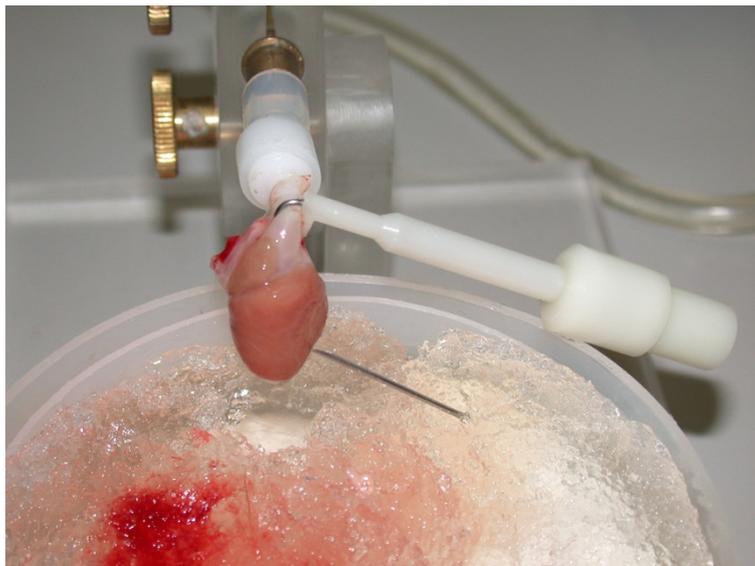
**Abbildung 1: Präparation des Meerschweinchenherzens**

**Der Thorax des Meerschweinchens wird durch 2 longitudinale Schnitte seitlich des Sternums eröffnet, um das Herz nicht zu verletzen. Der sternale Deckel wird mit einer Pinzette angehoben. Das noch spontan schlagende Herz wird aus dem Perikardbeutel freipräpariert und von den großen Gefäßen abgetrennt.**

## 2.1 Präparation der Koronargefäße

---

Anschließend wurde die Aorta über einen konischen Ansatz einer Rollerpumpe (Console Drive, Masterflex, Vernon Hill USA) gestülpt, mit chirurgischem Nahtmaterial wasserdicht angeknötet. Um eine Überdehnung der linken Ventrikel durch Spülflüssigkeit zu verhindern, wurde er durch Punktion mit einer Kanüle entlastet (Abbildung 2). Durch diesen Aufbau war es möglich, das linke Herz und die Koronargefäße mit 8 ml/min (Physiologische Salzlösung; 80 IE/ml Heparin; 4 °C) für die Dauer von 5-8 Minuten zu perfundieren. Der Herzschlag kam nach ca. 30 Sekunden Perfusionszeit zum Erliegen. Dieses Vorgehen erwies sich als notwendig, um die Koronargefäße von Blut zu befreien, Fibrinablagerungen an den Gefäßintima zu verhindern und das Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. Sowohl diese PSL als auch alle weiteren Lösungen wurden während der gesamten Versuchszeit mit Carbogengas (95 % O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) über Begasungssteine begast, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung wie auch eine ausreichende Pufferung des pH (NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/CO<sub>2</sub> Puffer) der Lösungen sicherzustellen.



**Abbildung 2: Perfusion des isolierten Herzens mit PSL**

**Das präparierte Herz ist mit dem Aortenstumpf über den Ansatzkonus des Perfusionssystems gestülpt und mit einer Klemme befestigt. Um den Abfluss überschüssiger Perfusionslösung zu ermöglichen und damit den Ventrikel zu entlasten, wurde die linke Herzkammer punktiert.**

Die gesamte weitere Präparation fand in gekühlten Lösungen mit feinkristallinem Eis statt, um den Metabolismus des Herzgewebes und damit den Sauerstoffverbrauch und -bedarf abzusenken. Der Zeitraum zwischen Dekapitation und Perfusion des Herzens mit PSL dauerte zwischen 1½ und 2½ Minuten. Wenige Sekunden nach Beginn der Perfusion begann das präparierte Herz erneut spontan zu schlagen, was als Zeichen für ein intaktes Präparat

## 2.1 Präparation der Koronargefäße

---

angesehen wurde. In den ersten 2 Minuten wurde das Herz am Konus frei hängend perfundiert, in der restlichen Perfusionszeit wurde das Herz zusätzlich in das feinkristalline Eis aus PSL eingepackt, was bewirkte, dass das Herzgewebe etwas rigider wurde und damit bessere Ergebnisse bei den Schnitten mit dem Mikrotom ermöglichte.

Nach der Perfusion wurden die beiden Ventrikel knapp unterhalb der Ventilebene des Herzens von den Vorhöfen mit einer Rasierklinge abgetrennt und der linke Ventrikel mit einer Schere freipräpariert, aus dem drei ca. 5 x 5 mm große Gewebelöcke herausgeschnitten wurden. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Gewebelöcke Teile der makroskopisch sichtbaren Koronarien enthielten. Die Gewebelöcke wurden mit flusenfreien Papiertüchern getrocknet und mit der perikardialen Seite nebeneinander auf eine Platte aus inertem V2A-Edelstahl (Feinmechanische Werkstatt des Physiologischen Institut, Gießen, BRD) geklebt. Als Kleber diente Acrylcyanat („Sekunden Alleskleber“, UHU GmbH, BRD). Die Edelstahlplatte mit den Gewebelöcken wurde in die Präparatschale eines Mikrotoms (Vibracut 3, Vibracut Feinwerktechnik, Bensheim, BRD) eingespannt, mit Gemisch aus gefrorener und ca. 4 °C PSL übergossen und während der Zeit des Schneidens mit Carbogen-Gasgemisch begast (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Herstellung der Gewebedünnschnitte**

Die Herzgewebestücke des linken Ventrikels sind auf eine Edelstahlplatte geklebt (siehe Pfeil) und in die Präparatschale des Mikrotoms eingespannt. Von ihnen werden jeweils Schnitte mit einer Schichtdicke von 100 µm angefertigt. Die Mikrotomschale wird kontinuierlich mit Carbogen-Gasgemisch über einen Begasungsstein begast.

## 2.1 Präparation der Koronargefäße

---

An jedem Präparationstag wurde eine neue Edelstahlklinge (Martox-Inox Nr. 189, Ulrich Meier, Bensheim, BRD) verwendet, die vor der Benutzung mit einem Gemisch aus 50 % Aceton und 50 % Methanol von Fetten, Ölen und Schmutz befreit wurde. Der Inklinationwinkel der Klinge wurde auf 15° zur Horizontalen eingestellt. Der Vortrieb des Messers betrug ca. 3-5 mm/min.

Die Gewebelöcke wurden mit einem der ersten Probeschnitte des Mikrotoms zunächst auf eine Höhe von ca. 1 mm gekürzt, da bedingt durch die Anatomie des Koronarbaumes und der Ventrikelwand die zu untersuchenden Arteriolen (Durchmesser 30-100 µm) hauptsächlich in den subepikardialen Schichten des Herzens zu finden sind. Von dem verbleibenden Herzgewebe wurden Schnitte mit einer Schichtdicke von je 100 µm angefertigt. Die Schnitte wurden mit einer Glaspipette in ein Becherglas mit Carbogen begaster PSL transferiert und in einem Aufbewahrungssieb mit 13 einzelnen Kammern (Feinmechanische Werkstatt, Physiologisches Institut, Gießen) aufbewahrt, damit auch nachträglich noch anhand der Kammernummer die Schicht identifiziert werden konnte, aus der der Schnitt stammte. Die Schnitte wurden in einem Wasserbad für 30 Minuten (Calora Kryo-Thermostat WK 5, Calora Messtechnik GmbH, Lorch, BRD) bei 35 °C inkubiert und anschließend bei weiter bestehender Carbogenbegasung bei Zimmertemperatur (19 – 22 °C) bis zu 13 Stunden für Experimente aufbewahrt.

## 2.2. Lösungen

### 2.2.1. Pipettenlösungen

Alle Pipettenlösungen sind mit 10 mmol/l HEPES gepuffert. Der pH-Wert der Lösungen wurde mit KOH auf einen Wert von 7,3 titriert (pH-Meter, Ingold Elektrode, Merck, BRD).

Es wurden drei verschiedene Innenlösungen verwendet. Die Konzentrationen der Inhaltsstoffe sind in Tabelle 1 angegeben:

**1. hochkaliumhaltige Innenlösung (High-K<sup>+</sup> 3 EGTA).**

**2. hochkaliumhaltige Innenlösung mit niedriger Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (High-K<sup>+</sup> pCa7).**

Die Bezeichnung pCa 7 steht für den negativ dekadischen Logarithmus der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (10<sup>-7</sup> mol/l). Dies wurde durch balancierte Zugabe des Chelators EGTA erreicht. Die nötige Menge wurde rechnerisch mit einem Programm errechnet, dass nach Konstanten aus den Publikationen von (Martell & Smith, 1975; Barrett *et al.*, 1982) programmiert war.

**3. hochkaliumhaltige Innenlösung mit K<sup>+</sup>-Aspartat und ATP.** Die Innenlösung mit Aspartat, ATP und GTP wurde in den Endkonzentrationen hergestellt, anschließend tiefgefroren und jeweils für einen Versuchstag aufgetaut, um sicherzustellen, dass die beinhalteten Konzentrationen möglichst genau dem Nennwert entsprachen. Die Lösungen wurden nach dem Einfrieren maximal 2 Monate verwendet.

In einzelnen Experimenten wurden den Innenlösungen die Farbstoffe Carboxyfluorescein (CF) und Lucifer Yellow (LY) zugemischt. Die Konzentration der Farbstoffe Carboxyfluorescein (25 und 50 µmol/l) und Lucifer Yellow (0,5 %) wurde aus der Literatur (Little *et al.*, 1995) übernommen.

Soweit nicht anders angegeben ist, wurden alle Chemikalien von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen, BRD) bezogen.

**Tabelle 1** Verwendete Innenlösungen. Alle Konzentrationen in mmol/l

Lösungsname	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	ATP	Chelator	Puffer	weitere Substanzen
High-K, 3 EGTA	5	155	1	8	-	3 EGTA	10 HEPES	-
High-K, pCa 7	5	155	1	-	-	0.08 EGTA	10 HEPES	-
High-K, K <sup>+</sup> -Aspartat, ATP	4.3	155	-	3	2	10 EGTA	10 HEPES	100 K <sup>+</sup> -Aspartat 0.1 Na <sup>+</sup> <sub>3</sub> -GPT 2 Na <sup>+</sup> <sub>2</sub> -ATP

EGTA = Ethylenglycol-bis( $\beta$ -Aminoethyl Ether) N, N, N', N'-Tetraessigsäure

HEPES = N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'(2-Ethanosulfonsäure)

ATP = Adenosin 5'-triphosphat

GTP = Guanosin 5'-triphosphat

### 2.2.2. externe Lösungen

#### 2.2.2.1. Kontrolllösungen

Die physiologische Salzlösung (PSL) wurde mit Carbogen-Begasung (95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>; Messer Griessheim, BRD) auf einen pH-Wert zwischen 7,25 und 7,3 eingestellt. Sie diente als Kontrolllösung in allen Versuchen, bei denen keine andere Kontrolllösung angegeben ist. Der hohe Anteil des Sauerstoffs, der theoretisch einem pO<sub>2</sub> von 720 mmHg entspricht, führt zur maximalen Sauerstoffsättigung der Gewebe und wirkt einem möglichen hypoxischen Schaden des Präparates entgegen.

Die PSL in Hypoxieversuchen wurde mit einem Gasgemisch aus Raumluft mit einem erhöhten CO<sub>2</sub>-Anteil von 5% als Teil des Bicarbonatpuffers als Kontrolllösung eingesetzt. Sie wurde zunächst wie die normale PSL mit Carbogengas auf einen pH-Wert zwischen 7,25 und 7,3 gebracht. In Versuchen, in denen die Auswirkung von Hypoxie auf Gefäße untersucht werden sollte, wurde die Lösung 1 h vor Beginn der Experimente mit einem Gasgemisch mit 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 74% N<sub>2</sub> (Messer Griebheim, BRD) verwendet, das komprimierter Raumluft entsprach. Dies hatte zum einen methodische Gründe, da ein Wechsel der Lösung von 720 mmHg auf 10 mmHg pO<sub>2</sub> im Versuchsaufbau lange dauert und zum anderen aus Versuchen an Neuronen in unserem Labor bekannt war, dass empfindliche Zellen einen Einwasch von hypoxischer Lösung leichter tolerieren, wenn sie bei atmosphärischer Sauerstoffkonzentration (21 %) aufbewahrt werden. Der CO<sub>2</sub>-Anteil der Lösung dient, wie bereits im Abschnitt über die Präparation beschrieben, zum physiologischen Puffern des pH-Wertes.

In einigen Experimenten der Hypoxie-Versuchsreihe wurde zu den bereits in der PSL vorhandenen 5,6 mmol/l K<sup>+</sup> noch 35 mmol/l KCl zugefügt und anschließend mit Raumluft begast. Die erhöhte Kaliumkonzentration von 40,6 mmol/ml sollte eine komplette Vasokonstriktion durch Depolarisation hervorrufen, um im anschließenden Experiment auch

## 2.2 Lösungen

---

geringe Vasodilatationen und Hyperpolarisationen sichtbar zu machen. Um auszuschließen, dass eine dauerhafte Einwirkung der erhöhten Kaliumkonzentration auf das Präparat die Funktion der Zellen beeinträchtigen könnte, wurde das Schnittpräparat erst einige Minuten vor der Applikation der hypoxischen Lösung mit der hochgesättigten Kalium-Lösung perfundiert.

**Tabelle 2 Verwendete Außenlösungen. Alle Konzentrationen in mmol/l**

Lösungen	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Puffer
PSL	141	5.6	2	1	25 HCO <sub>3</sub>
PSL + Raumluft	141	5.6	2	1	25 HCO <sub>3</sub>
PSL + 35 mmol/l KCl + Raumluft	141	40.6	2	1	25 HCO <sub>3</sub>

### 2.2.2.2. Hypoxische Lösung

Als Basis der hypoxischen Versuchslösung wurde PSL verwendet, die 1 h vor Versuchsbeginn mit hypoxischen Gasgemischen begast wurde. Um unterschiedlich hohe Sauerstoffpartialdrücke zu erreichen, wurden 2 verschiedene Gasgemische eingesetzt (Tabelle 3). Die Lösungen wurden 1 h vor Versuchsbeginn mit den hypoxischen Gasgemischen forciert begast, damit sich die gewünschten Partialdrücke in den Lösungen einstellen. Um die Konstanz des pH zu gewähren, wurde er nach der Begasung erneut kontrolliert. Probemessungen des pO<sub>2</sub> mit dem unter 2.5.3 vorgestellten Messsystem sollten sicherstellen, dass der Sauerstoff mit dem gewünschten Restgehalt in der Lösung vorhanden war.

**Tabelle 3 Zusammensetzung der verwendeten Gasgemische**

Gasgemisch	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>
G1	5%	5%	90%
G2	0%	5%	95%

Die Gasgemische (Messer Griessheim, BRD) wurde über Begasungssteine der Porengröße 0 in die Lösungen geleitet, um durch Bildung kleiner Gasblasen eine schnelle Äquilibration zu erreichen.

Der theoretische Sauerstoffpartialdruck einer mit G1 begasten Lösung entspricht 38 mmHg (bei einem Luftdruck von 760 mmHg). Für eine mit G2 begaste Lösung wäre er 0 mmHg. Da der Gasaustausch nicht unter Eliminierung der natürlichen Atmosphäre realisiert werden konnte, wurde der theoretische Wert allerdings nie erreicht. Tatsächlich konnten bei einer Begasung mit G1 pO<sub>2</sub>-Werte von 35 ± 5 mm Hg, mit G2 von 6 ± 4 mmHg (n=32) erreicht werden.

### ***2.3. Toxine und Versuchssubstanzen***

#### **2.3.1. Glibenclamid**

Glibenclamid gehört zur 2. Generation der Sulfonylharnstoffe und ist bekannt aus der Pharmakotherapie des Diabetes mellitus Typ II (Mehnert & Karg, 1969). Es hat die stärkste blutzuckersenkende Wirkung seiner Gruppe. Sein Wirkmechanismus ist die Blockade von K<sub>(ATP)</sub>-Kanälen der β-Zellen des Pankreas. Dadurch bedingt, depolarisiert die Zelle. Spannungsabhängige Calcium-Kanäle werden aktiviert, das intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> steigt an. Der angestiegene Ca<sup>2+</sup>-Spiegel ist der Trigger für die Ausschüttung des Insulins.

Bereits seit einiger Zeit ist bekannt, dass auch auf Endothelzellen verschiedener Gefäße K<sub>(ATP)</sub>-Kanäle an der Gefäßregulation beteiligt sind (White & Hiley, 2000). Hieraus erklärt sich eine Nebenwirkung des Glibenclamid, das bei Anwendung zu einem Blutdruckabfall führen kann. Zur Untersuchung der Einflüsse von K<sub>(ATP)</sub>-Kanälen in den untersuchten Stromgebieten wurde Glibenclamid eingesetzt.

Da Glibenclamid schlecht löslich in polaren Lösungsmitteln ist, wurde zunächst eine Stammlösung mit einer Konzentration von 10 mmol/l in reinem Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt, die tiefgefroren werden konnte. Die Versuchskonzentration von 10 µmol/l wurde vor den Versuchen jeweils frisch hergestellt durch Verdünnung der Stammlösung mit PSL.

#### **2.3.2. Diazoxid**

Diazoxid ist ein Strukturabkömmling des Thiaziddiuretikums Chlorothiazid und ebenfalls aus der Pharmakotherapie bekannt (Rubin *et al.*, 1962) und spielt im klinischen Einsatz als

Therapeutikum der Hypertonen Krise und hypoglykämischer Zustände eher eine untergeordnete Rolle. Der Wirkmechanismus ist die Öffnung von  $K_{(ATP)}$ -Kanälen glatter Gefäßmuskelzellen bzw. der  $\beta$ -Zellen des Pankreas.

Da Diazoxid lipophil ist, wurde mit DMSO eine Stammlösung mit einer Konzentration von 100 mmol/l hergestellt, die tiefgefroren werden konnte und an jedem Versuchstag frisch zur Versuchskonzentration von 100  $\mu$ mol/l verdünnt wurde.

### 2.3.3. 18- $\beta$ -Glycyrrhetinsäure

18- $\beta$ -Glycyrrhetinsäure (18-GA) ist ebenso wie das Stereoisomer die 18- $\alpha$ -Glycyrrhetinsäure als ein Entkoppler von *gap-junctions* (White & Hiley, 2000; Yamamoto *et al.*, 1998) in verschiedenen Zellen beschrieben worden.

18- $\beta$ -Glycyrrhetinsäure wurde wie durch White und Hiley (2000) beschrieben in einer Konzentration von 30  $\mu$ M verwendet. Für das Stereoisomer 18- $\alpha$ -GA wurde dort eine etwa 3 fach höheren Konzentration verwendet. Beide Substanzen sind in den genannten Konzentrationen geeignet, um in gekoppelten arteriellen Endothelzellen den Eingangswiderstand auf das 17-20 fache anzuheben. Die Entkopplung wirkt sich unspezifisch auf alle *gap-junctions* des Organismus aus, d.h. ist nicht selektiv für interendotheliale oder myo-endotheliale Kopplungen.

Von 18- $\beta$ -Glycyrrhetinsäure wurde zunächst eine Stammlösung mit reinem DMSO in einer Konzentration von 50 mM hergestellt, die eingefroren werden konnte und an einem Versuchstag frisch auf eine Endkonzentration von 50  $\mu$ M verdünnt wurde.

### 2.3.4. 1-Heptanol

1-Heptanol ist ebenso wie Octanol, Halothan und 18- $\beta$ -Glycyrrhetinsäure ein in der Literatur beschriebener unspezifischer Entkoppler von *gap-junctions* in verschiedenen Zellen (Murai *et al.*, 1999). Die Wirkung auf *gap-junctions* in glatten Muskelzellen ist nicht abschließend geklärt. Verwendet wurde 1-Heptanol meist in einer Konzentration von 1-3 mM.

1-Heptanol wurde in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Die Lösungen wurden vor jedem Versuchstag hergestellt, indem das hydrophobe 1-Heptanol in einem Glaskolben, der mit einem Stopfen aus inertem Kunststoff verschlossen wurde, und durch Schütteln in Lösung gebracht. Als maximale Konzentration konnte 6 mM gewählt werden, da die maximale Löslichkeit bei Zimmertemperatur bei ca. 8 mM liegt.

### 2.3.5. Acetylcholin

Acetylcholin (ACh) ist ein weit verbreiteter Neurotransmitter, der vor allem als Transmitter des ersten vegetativen und des zweiten parasympathischen Neurons vorkommt. Sein topischer Wirkort sind die muskarinischen (vegetatives Nervensystem) und nikotinischen (motorische Endplatte) Rezeptoren, durch die ein intrazellulärer Anstieg von  $\text{Ca}^{2+}$  vermittelt wird.

Darüber hinaus führt ACh Applikation auf ein Gefäßpräparat zu einer Hyperpolarisierung der auskleidenden Endothelzellen. Diese Hyperpolarisierung wird von Strömen durch endotheliale Ionenkanäle hervorgerufen, die durch Charybdotoxin und Apamin blockierbar sind (Edwards *et al.*, 1998). Der physiologische Stimulus dieser Hyperpolarisierung wird Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF) genannt und ist bis heute nicht eindeutig identifiziert worden.

Da angenommen wird, dass für die Hyperpolarisation und damit Dilatation eines Gefäßes auf ACh das Endothel verantwortlich ist, lässt sich über eine Applikation von ACh die Funktionalität des Gefäßendothels überprüfen (Yamakawa *et al.*, 1997; Vedernikov & Hellstrand, 1989). Allerdings scheint die Wirkung auf Endothelzellen nicht homogen zu sein. Endothelzellen kleiner Arteriolen des Meerschweinchenherzens mit geringem Eingangswiderstand zeigten in *patch-clamp* Experimenten die bereits beschriebene Hyperpolarisation auf Acetylcholin, wohingegen Endothelzellen mit hohem Eingangswiderstand keine Reaktion auf Acetylcholin zeigten (Ettorre, 2006).

Von ACh wurde eine 10 mM Stammlösung mit PSL angefertigt, die tiefgefroren werden konnte und am Versuchstag zur endgültigen Versuchskonzentration (10  $\mu\text{M}$ ) frisch verdünnt wurde.

### 2.3.6. Lucifer Yellow

Lucifer Yellow (LY) hat ein Molekulargewicht von 443 Da und ist zweifach negativ geladen. Biomembranen können daher von LY aufgrund seiner Größe und Polarität nicht durchdrungen werden, weshalb es mit Hilfe von Pipetten in Zellen eingebracht werden muss, um diese anzufärben. Wegen seiner Eigenschaft wurde es oft verwendet, um Neurone und Axone darzustellen (Stewart, 1978; Stewart, 1981) ist aber auch dazu geeignet interzelluläre Kopplung über *gap-junctions* nachzuweisen (Little *et al.*, 1995). Interendotheliale Verbindungen werden hierbei besser dargestellt als myoendotheliale Kopplungen. Es kann mit *gap-junctions* glatter Muskelzellen wechselwirken und dadurch den Kopplungsmechanismus blockieren, wodurch der Transport weiterer Farbstoffe (z.B. Biocytin) unterbunden werden kann (Little *et al.*, 1995).

Lucifer Yellow wurde in einer Konzentration von 0,5% den Pipetteninnenlösungen als Lithiumsalz zugefügt, um die Ionenkonzentrationen von Kalium nicht zu verschieben. Obwohl für Lithium eine Blockade von Auswärtsströmen beschrieben ist (Junge, 1991), scheint eine Beeinflussung von *gap-junctions* nicht vorzuliegen (Suarez & Ballmer-Hofer, 2001).

Um die Lucifer Yellow gefärbten Zellen darzustellen, wurden sie mit einer Quecksilberdampfampe beleuchtet. Das Licht durch einen optischen Filter mit einer Wellenlänge von 420-490 nm für die Anregung geleitet und mit einem Sperrfilter von 515–565 nm betrachtet. LY gefärbte Zellen fluoreszieren im Wellenlängenbereich von 520-540 nm.

### 2.3.7. Carboxyfluorescein

Carboxyfluorescein (CF) ist ein Molekül mit einem Molekulargewicht von 376 Da, ist zweifach negativ geladen und enthält vier Ringsysteme. Es kann ebenfalls nicht durch Biomembranen dringen und muss deshalb mit Pipetten intrazellulär appliziert werden. Anders als für LY sind für CF keine Wechselwirkungen mit Connexinen bekannt. Es ist deshalb sehr gut geeignet, um *gap-junction* Kopplungen nachzuweisen. Interendotheliale Kopplungen werden hierbei besser dargestellt als myoendotheliale (Little *et al.*, 1995).

CF wurde als Lithiumsalz den Pipetteninnenlösungen in einer Konzentration von 25 und 50  $\mu\text{M}$  zugemischt, um die Ionenkonzentrationen von Kalium nicht zu verschieben.

Das gefärbte Präparat wurde wie in Abschnitt 2.3.6 durch einen optischen Filter betrachtet. Die Absorptionswellenlänge von CF beträgt 490 nm, die Emissionswellenlänge 525 nm. Das gefärbte Präparat war allerdings so lichtschwach, dass es zwar mit dem Auge betrachtet werden konnte, jedoch leider keine zufriedenstellenden Fotoaufnahmen gemacht werden konnten. Abbildungen die, in dieser Arbeit gezeigt werden sind deshalb mit digitaler Bildbearbeitung Adobe Photoshop 6 (Adobe Systems. Inc, San Jose, USA) kontrastverstärkt worden. Eine höhere Farbstoffsättigung als 50  $\mu\text{M}$  zur besseren Lichtausbeute, wie in der Literatur beschrieben (Little *et al.*, 1995), war leider nicht möglich, da die Zellen membranäre Blasen bildeten und schließlich abstarben, was durch einen Zellhydrops sichtbar wurde.

### 2.4. Die patch-clamp Technik

Sämtliche Experimente dieser hier vorliegenden Arbeit beruhen auf der *patch-clamp* Technik (Hamill *et al.*, 1981), die von Neher und Sakmann erstmals beschrieben wurde (Neher & Sakmann, 1976). Sie beruht auf dem schon seit langer Zeit üblichen Verfahren der Spannungsklemme (Hodgkin & Huxley, 1952d; Hodgkin & Huxley, 1952c; Hodgkin & Huxley, 1952b; Hodgkin & Huxley, 1952a; Hodgkin *et al.*, 1952), bei der die Zellmembran mit ihren Ionenkanälen als ein vereinfachtes RC-Element eines elektrischen Schaltkreises schematisiert werden kann. Die Zellmembran stellt dabei den Kondensator, die Ionenkanäle den elektrischen Widerstand und das Membranpotential die Spannungsquelle dar (Abbildung 4).

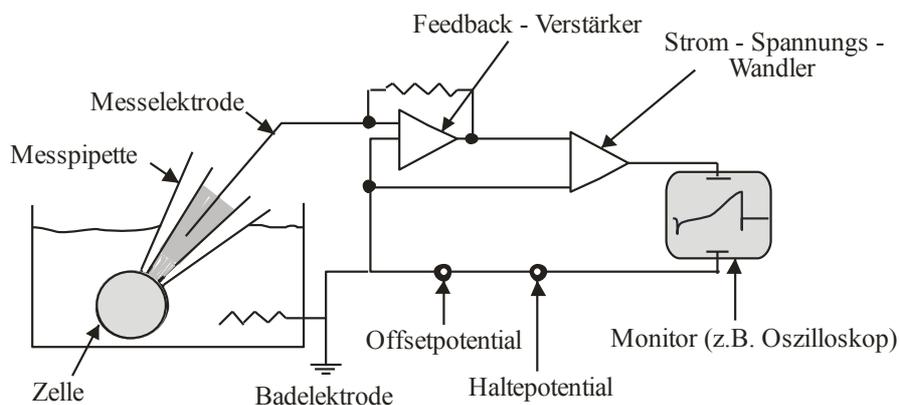


Abbildung 4: Schaltkreis eines *voltage-clamp*-Aufbaus (Gruss, 1998)

## 2.4 Die patch-clamp Technik

---

Eine mit Elektrolytlösung gefüllte Pipette wird durch die Zellmembran in das Zytosol einer Zelle eingestochen. Durch Konstanthalten des Membranruhepotentials bei fortwährender Spannungsapplikation mittels eines Feedbackverstärkers kann mit einem weiteren Verstärker der Kompensationsstrom gemessen werden, der aufgebracht werden muss, um den über die Messpipette fließenden Strom auszugleichen. Vom Betrag her entspricht der Kompensationsstrom dem Membrangesamtstrom der untersuchten Zelle. Eine Einschränkung dieser Methode besteht nur bei sehr schnellen Strom- bzw. Spannungskinetiken, da der Feedbackverstärker eine, wenn auch geringe, Latenz besitzt, bis er den kompensierenden Strom komplett aufbringen kann. Der Gesamtmembranstrom muss als Summenstrom aus Ionenkanalströmen, Strömen über Membranporen und dem unspezifischen Leckstrom, der durch das Verletzen der Zellmembran zustande kommt, verstanden werden. Das Potential, das in der Zelle hervorgerufen wird, ist in Grenzen frei wählbar. Von diesem Haltepotential aus können hyper- oder depolarisierende Spannungssprünge oder –verläufe in die Zelle injiziert werden, wobei sich die elektrischen Eigenschaften der Zellmembran durch Aktivierung bzw. In- oder Deaktivierung von Ionenkanälen ändern. Während des Versuchs kann man die Membranströme, die bei dem veränderten Membranpotential über Ionenkanäle der Zelle als Ausgleichsströme fließen, messen.

Wird der Schaltkreis der Spannungsklemme modifiziert und anstatt des Membranpotentials die Membranströme mit Hilfe des Feedbackverstärkers konstant gehalten, kann man das aktuelle Membranpotential der Zelle bestimmen.

Die Neuerung der *patch-clamp* Technik gegenüber der Spannungsklemme ist das Erlangen eines sehr hohen Abdichtwiderstands zur Membran, der vor allem durch die Feuerpolierung der Pipette und Anlegen eines Unterdrucks beim Aufsetzen des polierten Randes auf die Zelloberfläche erreicht wird. Dadurch kann sich zwischen Zellmembran und Pipettenspitze ein sogenanntes „Gigaseal“ ausbilden. D.h., der elektrische Widerstand zwischen dem Pipetteninneren und der Außenlösung wird mehrere  $G\Omega$  groß. Dadurch minimiert sich der unspezifische Leckstrom. Somit können auch sehr kleine Ströme einzelner Ionenkanäle und Poren der Zellmembran mit Amplituden im pA-Bereich erfasst werden.

In der *patch-clamp* Methode existieren verschiedene Konfigurationen:

Befindet sich die Patch-Pipette „*cell-attached*“, dann ist sie mit der Spitze auf die Zelloberfläche aufgesetzt und ein „Gigaseal“ hat sich zwischen der Zellmembran und der Pipette ausgebildet, nachdem sich ein Membranfleck durch Anlegen eines Unterdruckes an das Pipetteninnere ein wenig in die Pipette eingezogen hat. Mit ihr kann ein kleiner Teil der physiologisch erhaltenen Zellmembran auf einzeln enthaltene Ionenkanäle untersucht werden.

Durch Zerstörung, des unter der Pipette liegenden Membranflecks mit Unterdruck oder Stromimpulsen kann ein Übergang der *cell-attached* in die *whole-cell* Konfiguration erreicht werden. Die Pipetteninnenlösung und das Zytoplasma stehen miteinander in Verbindung und können sich austauschen. Durch die Wahl der Innenlösung kann intrazellulär ein klar definiertes Milieu geschaffen werden, da das Volumen des Zytoplasmas gegenüber dem Pipettenvolumen gering ist und somit das Zellinnere nach einer gewissen Zeit der Pipetteninnenlösung entspricht. Diese Konfiguration ist dazu geeignet, das Ruhepotential einer Zelle zu bestimmen (Stromklemme) oder den Gesamtmembranstrom (Spannungsklemme) abzuleiten. Sie entspricht der Spannungsklemme nach Hodgkin & Huxley, allerdings mit deutlich geringeren Leckströmen.

Um die Zelle bei physiologischer Zusammensetzung des Zytosols zu untersuchen, bedient man sich der Methode des „*perforated Patch*“. Hierbei befüllt man die Pipette von der Pipettenspitze her mit Amphotericin B oder Nystatin versetzter Innenlösung und von der hinteren Pipettenöffnung mit normaler Innenlösung. Man bringt die Pipette zunächst in die *cell-attached* Konfiguration und wartet 20-30 Minuten. Amphotericin B und Nystatin sind Antimykotika, die in Membranen Poren einbauen. Die eingebauten Poren sind groß genug, um einen elektrischen Zugang zur Zelle zu schaffen, allerdings nicht groß genug, um Zytosolbestandteile durchzulassen. Metaboliten, Enzyme und Second Messenger bleiben somit der Zelle überwiegend erhalten.

Um einzelne Ionenkanäle untersuchen zu können und das Gesamttrauschen zu minimieren, kann man aus einer Zelle Membranflecken ausreißen. Auch hier gibt es 2 verschiedene Konfigurationen. Um in die „*inside-out*“ Konfiguration zu kommen, bedient man sich der *cell-attached*-Konfiguration und zieht dann langsam die Pipette von der Zelloberfläche weg. Dabei bildet sich zunächst ein Membranfaden zwischen Zelle und Pipette, der sich in einiger Entfernung von der Zelle ablöst. An der Pipettenspitze verbleibt eine kleine Membrankugel, die sich zu einem Membranfleck öffnet, sobald man die Pipette aus der Badlösung zieht und sie erneut in die Lösung eintaucht. Dadurch entsteht ein Membranfleck, dessen Außenseite dem Pipetteninneren und dessen Innenseite der Außenlösung zugewandt ist. Diese Konfiguration ist geeignet, um zu untersuchen, welchen Effekt Substanzen auf Einzelkanäle besitzen, wenn sie auf das innere Blatt der Zellmembran einwirken. Außerdem unterliegen die Ionenkanäle weitgehend keiner Regulation durch lösliche intrazelluläre second Messenger, da der Membranfleck von der Zelle mit ihren Botenstoffen isoliert wurde.

Die „*outside-out*“ Konfiguration wird erreicht, indem man eine Zelle in der *whole-cell* Konfiguration patcht und die Pipette von der Zelle entfernt. Auch hier reißt der entstehende

Membranfaden ab und bildet einen Membranfleck, der die Membraninnenseite zum Pipetteninneren, die Membranaußenseite zur Außenlösung wendet. Geeignet ist diese Konfiguration für Versuche mit extrazellulärer Toxinapplikation.

### 2.5. Versuchsstand

Der Aufbau des Versuchsstandes ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt und besteht aus der eigentlichen Experimentierkammer und dem schwerkraftgetriebenen Perfusionssystem mit Unterdruckabsauganlage. Die analog gemessenen Signale werden über die im Vorverstärker (*headstage*) gehaltene, mit einem Mikromanipulator bewegliche Glaspipette an den Analog-Digitalwandler weitergegeben und digital dem *patch-clamp* Verstärker mit angeschlossenem Messcomputer zugeführt. Im Absaugsystem der Experimentierkammer befindet sich die Messsonde eines Messmonitors zur Bestimmung des Sauerstoffpartialdruckes.

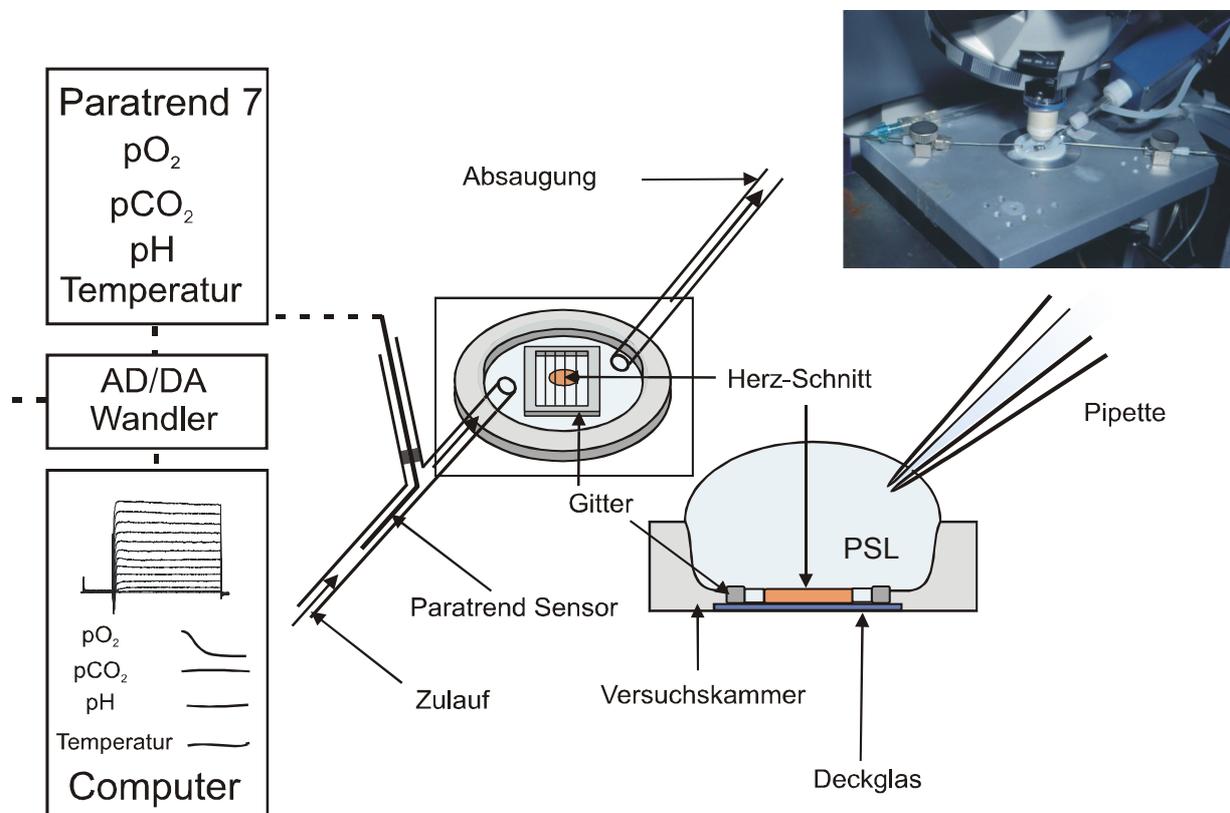


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Versuchsstandes (Gruss, 1998)

### **2.5.1. Experimentierkammer**

Die Experimentierkammer besteht aus einer 4 mm starken Delrinscheibe (Krüger, Hamburg, BRD) mit einem Durchmesser von 42 mm, die ein zentrales Loch besitzt, gegen die von der Unterseite der Scheibe ein rundes Deckglas mit Silikon geklebt ist. Dadurch entsteht eine Kammer mit einem Volumen von 0,6 ml.

Die Perfusion der Experimentierkammer wird mit einem schwerkraftgetriebenen Perfusionssystem erreicht. Es besteht aus Reservoirbehältern für die Lösungen und bis zu 5 Behältern für Versuchssubstanzen mit 50 ml Volumen. Die Reservoirs sind über Teflonschläuche mit einem Drehschalter verbunden, der nur die jeweils eingestellte Lösung durchfließen lässt. Der Ausgang ist über einen Teflonschlauch mit einer gebogenen Kanüle (feinmechanische Werkstatt, Physiologisches Institut, Gießen, BRD) verbunden, die die Lösungen in die Versuchskammer leitet. Das Schlauchsystem hat vom Drehschalter bis zur Kammer ein Volumen von 0,15 ml und ist mit ca. 4,6 ml/min durchflossen. Entleert wird die Kammer durch eine Pumpe (Wisa, Wuppertal, BRD), die über eine Kanüle den Kammerinhalt in einen Auffangbehälter absaugt.

Die Ablaufmenge ist etwas schneller eingestellt als die Perfusion, damit im Entleerungsschlauch keine kontinuierliche Wassersäule fließt, die wegen ihres Elektrolytgehaltes als Antenne fungieren und damit die Messungen stören kann und somit ein Überlaufen der Versuchskammer verhindert wird.

Die Präparate wurden in der perfundierten Versuchskammer mit einem Gitter (feinmechanische Werkstatt, Physiologisches Institut, Gießen, BRD) fixiert. Das Gitter besteht aus einem aus Platin gefertigten Rahmen (7x5 mm), der mit 3 Fäden bestehend aus Einzelfasern einer Zahnseide, bespannt ist.

### **2.5.2. Pipetten**

Zur Herstellung der Pipetten wurden dickwandige Kapillaren aus Borosilikatglas (GC150F-7,5 mit Filament, Clark Medical Instruments, Pangbourne, England) gewählt, was wegen seiner geringen Leitfähigkeit und günstigen kapazitiven Eigenschaften das Hintergrundrauschen der Messungen minimiert. Die Kapillaren sind 7,5 cm lang, haben einen äußeren Durchmesser von 1,5 mm und einen inneren von 0,86 mm. Das Filament der

Kapillare lässt den Flüssigkeitsspiegel der Innenlösung leicht bis in die Spitze der fertigen Pipette fließen.

Die Kapillaren wurden mit beiden Enden in die Halterungen der Ziehschlitten eines Horizontal-Ziehgerätes (P-97, Sutter Instrument Company, USA) eingespannt und mehrstufig zu Pipetten gezogen.

Um den Rand der Pipettenöffnung von kleinsten Unebenheiten und Verunreinigungen zu befreien, wurde die Pipette anschließend feuerpoliert. Bei diesem Verfahren wird die Pipette einem stromdurchflossenen, glühenden Platindraht soweit angenähert, bis die Pipettenspitze leicht angeschmolzen wird. Um Auflagerungen auf der Pipettenspitze durch Platin, das vom Polierdraht verdampft wurde, zu verhindern, befindet sich an der Stelle des Drahtes, mit der die Pipette poliert wird eine Perle aus Borosilikatglas. Um optimale Seals zu erhalten wurden die Pipetten jeweils direkt vor einem Versuch so poliert, dass sie einen Widerstand zwischen Pipetteninnenlösung und Badlösung von 0,7-17 M $\Omega$  aufwiesen.

Die Pipetten wurden über die hintere Öffnung durch eine Spritze mit aufgesetztem Filter (0,2  $\mu$ m, Renner, Dannstadt, BRD) befüllt. Als Elektrode diente ein Silberdraht (0,5 mm Johnson Matthey GmbH, Karlsruhe, BRD), der regelmäßig in 1-molarer KCl mit einer Batterie chloriert wurde. Als Badelektrode diente ebenfalls ein chlorierter Silberdraht (Johnson Matthey GmbH, Karlsruhe, BRD)

### **2.5.3. Aufbau des Messstandes**

Der Pipettenhalter besteht aus Kunststoffen mit hohen Dielektrizitätskonstanten, um das Hintergrundrauschen möglichst gering zu halten. Das hydrophobe Oberflächenmaterial (Delrin, Krüger, Hamburg, BRD) soll die einzelnen Anteile vor einem Wasserfilm schützen. Dieser Halter wurde in einem Winkel von 30-50° gegen die Horizontale auf einem 3-achsigen Mikromanipulator (ZSS 32-200-1.2, Märzhäuser, Wetzlar, BRD) befestigt. Gesteuert wurde der Manipulator über einen 3-Achsen-Joystick. Um Scherbewegungen zwischen dem Kreuztisch des Mikroskops, der die Experimentierkammern trägt, und dem Pipettenhalter so gering wie möglich zu halten, sind Mikroskop und Manipulator gemeinsam auf einem schwingungsgedämpften Tisch (T 250, Physik Instruments, Waldbrunn, BRD) gelagert. Dieser ist zusätzlich durch eine Marmorplatte und Metallgewichte beschwert, um die Eigenschaften des schwingungsgedämpften Tisches zu optimieren.

Das 40-fach Wasserimmersions-Objektiv des Mikroskopes (Axioskop FS, Zeiss, Oberkochen, BRD) ist vom Mikroskop elektrisch isoliert, um Störungen bei der Signalableitung vom Präparat zu vermeiden.

Mit dem 4-fach Objektiv, was bei dem benutzten 10x Okular eine Gesamtvergrößerung von 40x ergibt, konnte man sich einen Überblick über den Schnitt verschaffen. Annäherung an die Zelloberfläche und Ausbildung des Seals erfolgten unter 400-facher Vergrößerung (40x Objektiv). Das Bild wurde über eine Videokamera (WV-BP500, Panasonic, BRD) auf einen Bildschirm (WV-5410N, Panasonic, Japan) übertragen, so dass die Zelle während des Experiments weiter beobachtet werden konnte.

Als *patch-clamp* Verstärker diente ein Axopatch 200A (Axon Instruments, USA). Die Testimpulse wurden computergesteuert appliziert, wobei die Steuersignale vom Rechner (Intel Celeron, 433MHz) über den Digital-Analog Wandler (Digidat 1200, Axon Instruments) via Axopatch zur Headstage (CV201 AU) in die Pipette übermittelt wurden.

Die Signale wurden mit dem eingebauten Tiefpassfilter des Axopatch 200A (-3 dB, 4-Pol Bessel) gefiltert, um das Rauschen zu vermindern. Um Artefakte in den aufgenommenen Daten zu verhindern, wurde die Filterfrequenz gemäß des Nyquist-Kriteriums mindestens auf die Hälfte der Samplefrequenz festgesetzt.

Die analogen Rohdaten des *patch-clamp* Verstärkers wurden mit einem Analog-Digital Wandler (Digidat 1200 A, Axon Instruments, Foster City, USA) digitalisiert und mit der Aufzeichnungs- und Steuersoftware (Clampex 8, Axon Instruments, Foster City, USA) auf Festplatte gesampelt. Die Samplefrequenz wurde in Abhängigkeit des Versuchsprotokolls gewählt, um die zu verarbeitenden Datenmengen möglichst klein zu halten.

Ausgewertet wurden die Daten mit den Auswertungsprogrammen pClamp 6 und 8 (Clampfit 6 bzw. 8; Axon Instruments, Foster City, USA). Clampfit 6 diente zum automatisierten Vermessen von Stromamplituden mit Hilfe eines Makros, Clampfit 8 wurde zum manuellen Vermessen von Ruhepotentialen und Sauerstoffpartialdrücken in Hypoxieversuchen verwendet.

Die Registrierung von Daten zu Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ), Kohlendioxidpartialdruck ( $pCO_2$ ), Temperatur, Base Excess (BE) und pH-Wert wurde durch den normalerweise in der Intensivmedizin verwendeten Messmonitor Paratrend 7+ (Abbildung 6; Biomedical Sensors Ltd, Pfizer Hospital Products Group, High Wycombe, England) ermöglicht (Clutton-Brock *et al.*, 1994; Palmer *et al.*, 1995), dessen analoge Signale separat über einen Fünfkanal-AD-Wandler digitalisiert wurden und simultan zu den Strom-Spannungs-Registrierungen des

*patch-clamp* Verstärkers gesampelt wurden. Diese Anordnung ermöglichte eine lückenlose Darstellung der Veränderung der gemessenen Parameter.



**Abbildung 6: Der Paratrend 7+ Satellite-Monitor**

**Der Paratrend 7+ Satellite-Monitor ermöglicht die Messung des Sauerstoffpartialdruckes der applizierten Versuchslösungen.**

Das Messprinzip des Paratrend-Sensors (Abbildung 7) stellt eine Kombination von photometrischen und elektronischen Verfahren dar. Die Gaspartialdrücke wurden photometrisch mit monochromatischen Lichtimpulsen bestimmt. Die Temperaturmessung fand über ein elektronisches Thermoelement in der Paratrendsonde statt. Da die Messung aufgrund des photooptischen Verfahrens durch Licht beeinflusst werden kann, war es notwendig, die Sonde unter Lichtabschluss im Perfusionssystem zu platzieren. Um möglichst genau die in der Versuchskammer vorherrschenden Bedingungen wiederzugeben, wurde die Sonde in einer lichtundurchlässigen Kanüle des Versuchskammerzuflusses platziert. Sicherlich wäre eine Platzierung im Kammerabfluss im Hinblick auf die Vergleichbarkeit mit der Versuchskammer interessant gewesen, allerdings wäre es hierbei unweigerlich zu Fehlmessungen gekommen, da sich aus o.g. Gründen stets Luftblasen im Abflussschlauch befinden sollten und sich diese auch prinzipiell nie komplett vermeiden ließen.

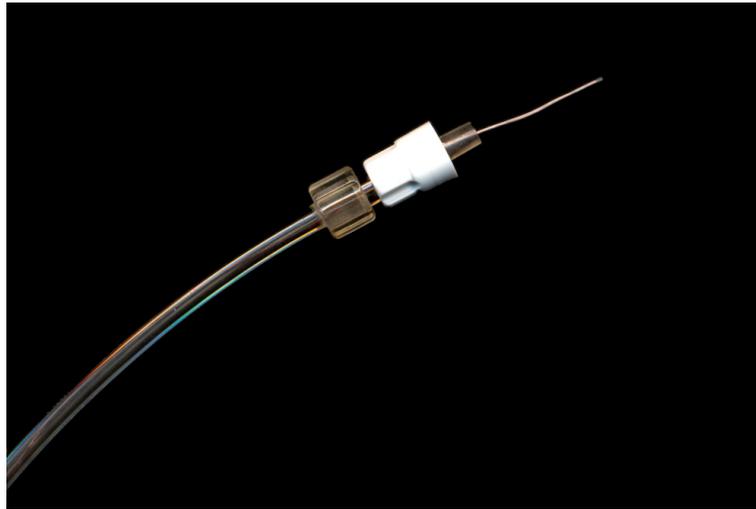


Abbildung 7: Die Messsonde des Paratrend 7+

Die Messsonde des Paratrend 7+ wurde in die Zuleitung des Perfusionssystems eingebracht. Die abgebildete Sensorspitze (Durchmesser 0,5 mm) erfasst mit photometrischer Messung die Sauerstoffpartialdrücke und mit Thermoelementen die Temperatur der Versuchslösungen.

In *voltage-clamp* Experimenten wurden zur Bestimmung des unspezifischen Leckstroms mehrfach hyperpolarisierende Spannungssprünge appliziert und dabei die Ströme gemessen. Da wegen der Hyperpolarisierung keine Ionenkanäle aktiviert werden ist der gemessene Strom auf kapazitive Membran- und Leckströme zurückzuführen. Der unspezifische Leckstrom und der kapazitive Strom wurden gemittelt, adäquat skaliert und von den Strömen in *voltage-clamp* Experimenten subtrahiert.

Die Subtraktion von Leckströmen, Bestimmung der Membran- und Sealwiderstände und die Bestimmungen  $I/I_0$  wurden mit Hilfe von Excel 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) durchgeführt.

Die Kurvenanpassungen der Dosis-Wirkungs-Kurve wurden mit Origin 6.0 (Microcal Software Inc., Northhampton, USA) vorgenommen. Schemazeichnungen wurden mit Corel Draw 10 (Corel, Ottawa, Kanada) erstellt.

Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (Standardfehler des Mittelwertes) oder  $\pm$  SD (Standardabweichung) angegeben. Der S.E.M. ist in den Zeichnungen als Fehlerbalken dargestellt. Ist der Betrag kleiner als das Symbol, wurden diese weggelassen. Die statistische Auswertung erfolgte in Origin 6.0 mit gepaartem Student's t-Test, bzw. Mann-Whitney-Test in GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) und ist an entsprechender Stelle jeweils angegeben. Falls das Signifikanzniveau ( $p$ ) von 0,05 abweicht, ist der entsprechende Wert angegeben.

### 3. Ergebnisse

#### *3.1. Differenzierung von Endothelzellen im koronaren Stromgebiet von kleinen Arteriolen*

##### **3.1.1. Elektrophysiologische Differenzierung von Endothelzellen**

Endothelzellen von Arteriolen mit einem Durchmesser von 30-100  $\mu\text{M}$  des koronaren Gefäßstromgebietes zeigten unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften. Prinzipiell lagen in den durchgeführten Untersuchungen bezüglich der elektrophysiologischen Eigenschaften zwei grundlegend unterschiedliche Zelltypen vor. In der ersten Gruppe von untersuchten Endothelzellen lag in der *whole-cell* Konfiguration ein eindeutiger spannungsabhängiger Auswärtsstrom vor (Abbildung 8 A). Zur Untersuchung der Ströme wurde als Reizpotential eine Rampe verwendet, die ausgehend von einem Haltepotential von  $-80\text{ mV}$  einen Sprung zu  $-140\text{ mV}$  macht und mit einer Anstiegsgeschwindigkeit von  $80\text{ mV/s}$  zu  $+100\text{ mV}$  ansteigt, um dann wieder zum Haltepotential zurückzukehren. Endothelzellen der ersten Gruppe (Typ I) zeigten bei Untersuchungen mit der Spannungsrampe ab einem Reizpotential von etwa  $E=0\text{ mV}$  einen deutlichen Auswärtsstrom. Die Amplitude blieb jedoch mit weniger als  $1000\text{ pA}$  eher gering.

Die Endothelzellen der zweiten Gruppe (Typ II) zeigten im Bereich eines Reizpotentials von  $-140\text{ mV}$  bis  $-65\text{ mV}$  und  $+20\text{ mV}$  einen geringen Einwärtsstrom. Zwischen  $-20\text{ mV}$  und  $0\text{ mV}$  zeigte sich eine Einziehung der Strom-Spannungs-Rampe, die durch eine Überlagerung eines inaktivierenden *inward-rectifier* Kanals mit einem aktivierenden spannungsabhängigen Auswärtsstrom hervorgerufen sein könnte. Die Amplitude des gesamten induzierten Stromes betrug meist mehr als  $2000\text{ pA}$ .

Der mittlere Eingangswiderstand von Zellen der ersten Gruppe lag bei  $6,9 \pm 1,8\text{ G}\Omega$  ( $n=35$ ) und war damit etwa 67 mal höher als in der zweiten Gruppe von Endothelzellen mit einem mittleren Eingangswiderstand von  $102,5 \pm 13,1\text{ M}\Omega$  ( $n=71$ ) (Abbildung 8 B).

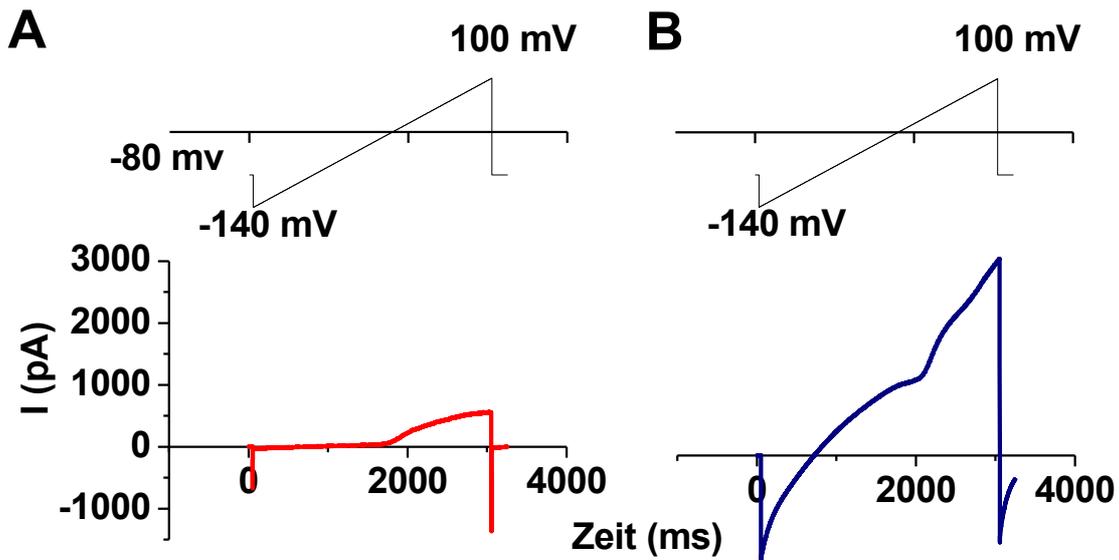


Abbildung 8: Strom-Spannungs-Rampen in zwei verschiedenen Endothelzelltypen

Die Abbildung zeigt Originalregistrierungen von Membranströmen der Endothelzellen im *whole-cell*-Modus als Antwort auf eine applizierte Spannungsrampe (Reizpotentialmuster jeweils oben abgebildet).  
**A:** Typ I-Endothelzelle mit Nachweis des auswärtsgerichteten spannungsabhängigen Stromes. Die Stromamplitude ist insgesamt gering.  
**B:** In der Typ II-Endothelzelle zeigte sich eine Einziehung bei einem Reizpotential von -20 - 0 mV. Deutlich zu erkennen ist die höhere Gesamtstromamplitude.

Der Vergleich der Ruhepotentiale der Endothelzellen ergab eine unterschiedliche Verteilung der Zelltypen (Abbildung 9). Zellen mit Auswärtsstrom (Typ I-Endothelzellen) zeigten eine Verteilung mit einem Median von -29,8 mV und einem mittleren Ruhepotential von  $-37,3 \pm 3,4$  mV ( $n=35$ ; Abbildung 9 A). Typ II-Endothelzellen wiesen eine Verteilung mit einem Median von -55,3 mV und einem mittleren Ruhepotential von  $-53,4 \pm 1,6$  mV ( $n=71$ ) auf (Abbildung 9 B). Im Mann-Whitney-Test zeigten sich die Ruhepotentiale verschieden ( $p < 0,0001$ ). Bei einer Korrelation von Ruhepotential zum Eingangswiderstand zeigte sich, dass eine unterschiedliche Verteilung mit unterschiedlichen  $Q_{.25}$ - $Q_{.75}$ -Interquartilbereichen vorlag (Abbildung 9 C)

Eine qualitative Betrachtung des Ruhepotentials der unterschiedlichen Zelltypen wies darauf hin, dass Endothelzellen ohne Auswärtsstrom im zeitlichen Verlauf eine geringere Variabilität des Ruhepotentials zeigte als Endothelzellen mit Auswärtsstrom.

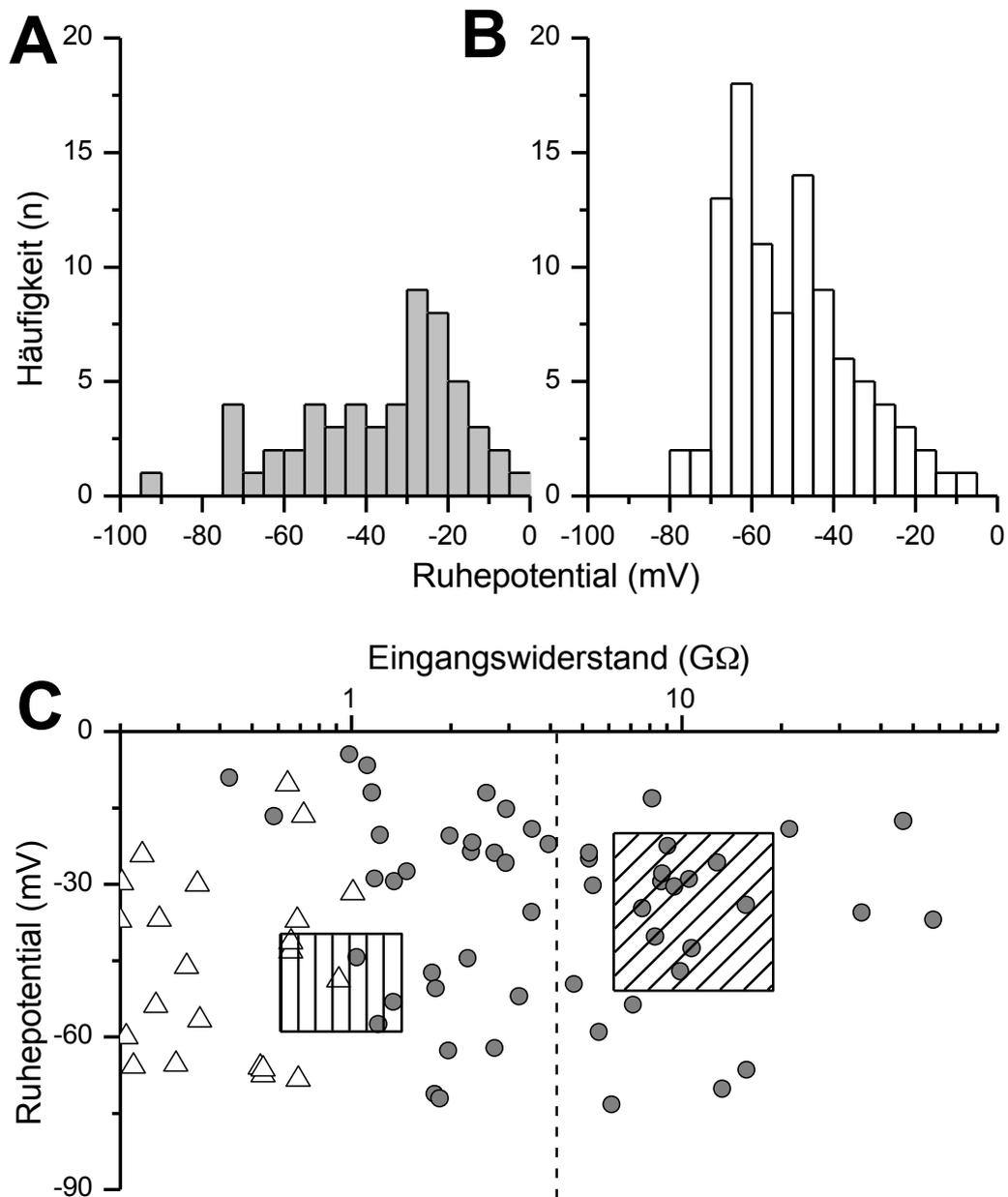


Abbildung 9: Verteilung der Ruhepotentiale der Zelltypen I und II

**A:** Verteilung der Ruhepotentiale von Endothelzellen mit Auswärtsstrom (Zelltyp I). **B:** Verteilung der Ruhepotentiale von Endothelzellen ohne Auswärtsstrom (Zelltyp II). **C:** Korrelation der Ruhepotentiale in Abhängigkeit des Eingangswiderstandes aufgeschlüsselt nach Vorkommen des spannungsabhängigen Auswärtsstromes (leere Dreiecke = fehlender Auswärtsstrom; graue Kreise = Auswärtsstrom vorhanden). Die vertikal schraffierte Fläche zeigt den  $Q_{.25}$ - $Q_{.75}$ -Interquartilbereichen der Typ II-Endothelzellen in Bezug auf RP und Eingangswiderstand, die schräg schraffierte Fläche den der Typ I-Endothelzellen.

### 3.1.2. Pharmakologische Differenzierung von Endothelzellen

#### 3.1.2.1. Wirkung von Acetylcholin

Nicht nur in den grundlegenden elektrophysiologischen Eigenschaften unterschieden sich die Zellen der unterschiedlichen Gruppen, sondern sie konnten ebenfalls in ihrer Reaktion auf verschiedene Pharmaka unterschieden werden.

In 20 von 21 der untersuchten Zellen mit geringem Eingangswiderstand kam es nach Applikation von 10  $\mu\text{M}$  Acetylcholin zu einer Hyperpolarisation des Ruhepotentials. Der Betrag der Potentialveränderung war vom vorbestehenden Ruhepotential der Zelle abhängig und betrug im Rahmen der Untersuchung im Mittel  $-18,0 \pm 2,7$  mV (gemessen für 5 s. nach Erreichen des RP-Plateaus nach ACh Applikation, gepaarter t-Test,  $p=2,1 \cdot 10^{-6}$ ). Charakteristisch für die ACh Applikation war die Kinetik der Hyperpolarisation (Abbildung 10). Es kam nach einer geringen Anflutungslatenz zu einer sehr raschen Hyperpolarisation der Endothelzelle, oft mit einer überschießenden Komponente und anschließendem Plateau. Die Auswaschphase war hingegen sehr langsam und zog sich teilweise über mehr als 10 Minuten hin.

In Endothelzellen mit hohem Eingangswiderstand konnte eine Hyperpolarisation nach Applikation von Acetylcholin nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

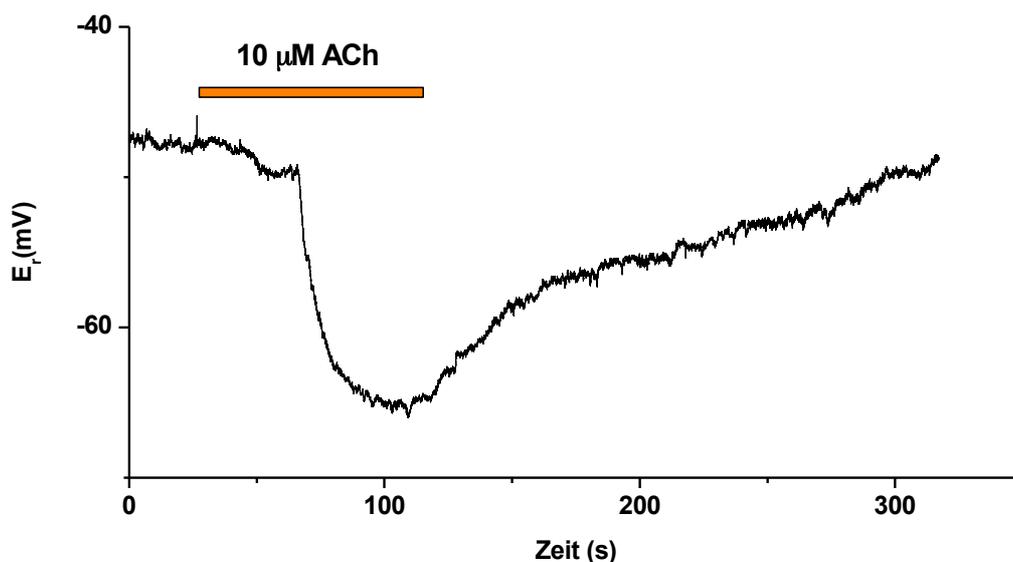


Abbildung 10 Hyperpolarisation einer Typ II-Endothelzelle durch 10  $\mu\text{M}$  ACh

#### 3.1.2.2. Wirkung von Diazoxid und Glibenclamid

Eine Untersuchung der Endothelzellen auf die Applikation von Glibenclamid (Abbildung 11) und Diazoxid (Abbildung 12) zeigte, dass beide Substanzen in der Lage waren, in Zellen mit geringem Eingangswiderstand das Ruhepotential zu beeinflussen. Nach der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  Glibenclamid wurde das Ruhepotential von im Mittel  $-58,0 \pm 3,9 \text{ mV}$  ( $n=3$ ) auf  $-44,2 \pm 4,1 \text{ mV}$  ( $n=3$ ) depolarisiert. Auffällig hierbei war, dass das Ruhepotential nach der Depolarisation durch Glibenclamid eine größere Fluktuation zeigte als in der Ruhelage (Abbildung 11).

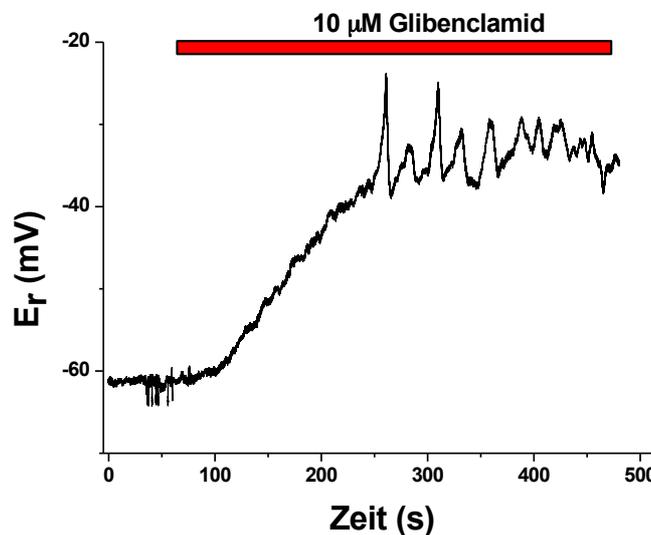


Abbildung 11: Depolarisation einer Typ II-Endothelzelle durch Glibenclamid

**Reduktion des Ruhepotentials nach Applikation von 10  $\mu\text{M}$  Glibenclamid durch Blockade des  $K_{\text{ATP}}$ -Kanals. Deutlich sieht man die zunehmende Variabilität des Ruhepotentials nach der Destabilisation des Ruhepotentials.**

Durch Applikation von 100  $\mu\text{M}$  Diazoxid konnte das Ruhepotential aus dem Ausgangszustand von  $-46,9 \pm 3,5 \text{ mV}$  auf  $-54,8 \pm 2,7 \text{ mV}$  (gepaarter t-Test,  $p=3,6 \cdot 10^{-4}$ ,  $n=16$ .) hyperpolarisiert werden (Abbildung 12). Eine darauf folgende kombinierte Applikation von 100  $\mu\text{M}$  Diazoxid und 10  $\mu\text{M}$  Glibenclamid führte zu einer Reduktion der Hyperpolarisation auf ein durchschnittliches RP von  $-42,3 \pm 6,5 \text{ mV}$  ( $n=4$ ,  $p=0,029$ ).

In Endothelzellen mit hohem Eingangswiderstand konnte keine Beeinflussung des Ruhepotentials durch Diazoxid oder Glibenclamid beobachtet werden ( $n=5$ ). Ein Einzelkanalnachweis des  $K_{\text{ATP}}$ -Kanals im outside-out patch gelang nicht ( $n=9$ ).

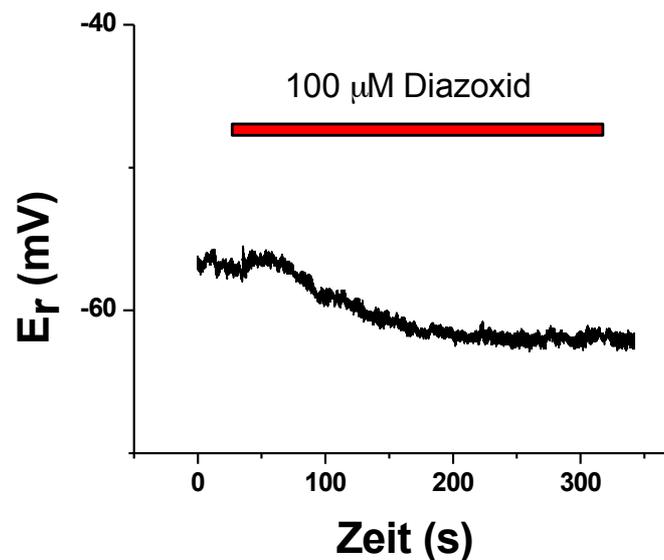


Abbildung 12: Hyperpolarisation einer Typ II-Endothelzelle durch Diazoxid

### *3.2. Kopplung von Endothelzellen über gap-junctions*

#### **3.2.1. Darstellungsversuch der Zellkopplung mit Farbstoffen**

Da im vorliegenden Versuchsmodell die Eingangswiderstände der Endothelzellen sehr stark differierten und eine Hyperpolarisation des Ruhepotentials der Endothelzellen durch ACh Applikation nur in einigen Zellen möglich war, bestand der Verdacht, dass dies auf die unterschiedliche Kopplung der Zellen untereinander über *gap-junctions* zurückzuführen war. Um die Kopplung der Endothelzellen untereinander und mit glatten Muskelzellen zu untersuchen, wurden die Endothelzellen mit einer mit Fluoreszenzfarbstoffen beladenen Pipette wie in Kapitel 2.3.6 und 2.3.7 beschrieben.

Sowohl mit 50  $\mu$ mol Carboxyfluorescein (Abbildung 13 A) als auch mit 0,5% Lucifer-Yellow (LY; Abbildung 13 B) gefärbte Endothelzellen konnten mit den Farbstoffen sicher dargestellt werden. In keinem der jeweils 15 Versuche an Endothelzellen mit einem niedrigen Eingangswiderstand konnte selbst nach einer Einwirkzeit von 20 Minuten eine Färbung von benachbarten glatten Muskelzellen oder Endothelzellen nachgewiesen werden.

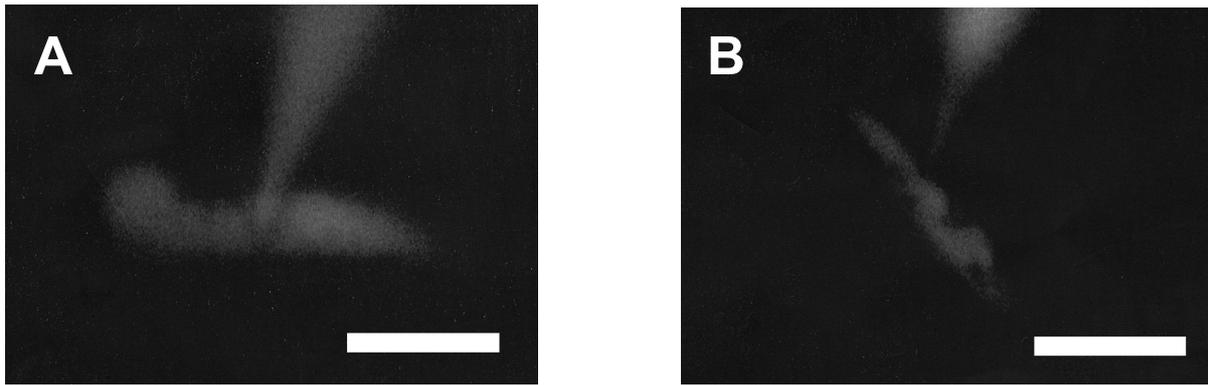


Abbildung 13: Darstellung von Endothelzellen mit Carboxyfluorescein und LY

**A** Eine mit 50  $\mu\text{mol}$  Carboxyfluorescein gefärbte Typ II-Endothelzelle mit Pipette in der *whole-cell*-Konfiguration nach einer Färbezeit von 20 Minuten. Es ist eine einzelne Zelle angefärbt. In keine weiteren Endothel- oder Muskelzellen wurde der Farbstoff über *gap-junctions* weitergeleitet. Messbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ . **B** Eine mit 0,5% Lucifer-Yellow gefärbte Typ II-Endothelzelle mit Pipette in *whole-cell*-Konfiguration nach einer Färbezeit von 20 Minuten. Es finden sich neben der gepatchten Zelle keine weiteren Zellen angefärbt. In einigen Zellen kam es nach der langen Beobachtungszeit zu submembranösen Bereichen, die keine Färbung aufwiesen. Messbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

#### 3.2.2. Vergleich von *gap-junction* Entkopplern 18-GA und 1-Heptanol

Obwohl die Kopplung der Endothelzellen an die glatten Muskelzellen mittels der Färbeversuche mit Carboxyfluorescein und Lucifer-Yellow nicht gelang, bestand weiterhin der Verdacht, dass die Endothelzellen mit geringem Eingangswiderstand untereinander und mit Muskelzellen gekoppelt sein könnten, was dann zu einem sehr großen unspezifischen Membranstrom führen würde. Da durch diese großen Membranströme über die *gap-junctions* die relativ kleinen spezifischen Ionenkanalströme in den Endothelzellen einer Untersuchung nicht zugänglich waren, bestand die Idee, dass diese geringen Ionenkanalströme nach Entkopplung der *gap-junctions* und damit Reduktion des Gesamtmembranstromes untersucht werden könnten. Um dies zu untersuchen, wurden Substanzen benutzt, von denen bekannt war, dass sie *gap-junctions* entkoppeln können – 1-Heptanol und Glycyrrhetinsäure.

Sowohl Glycyrrhetinsäure als auch 1-Heptanol waren geeignet, den Membranleitwert signifikant zu vermindern. 3 mM 1-Heptanol konnte den Leitwert von  $13,2 \pm 2,2$  mS auf durchschnittlich  $3,0 \pm 1,3$  mS absenken ( $n=4$ ,  $p=0,012$ ) 50  $\mu\text{M}$  Glycyrrhetinsäure von

### 3.2 Kopplung von Endothelzellen über gap-junctions

$6,9 \pm 2,1$  mS auf durchschnittlich  $2,2 \pm 0,7$  S (gepaarter t-Test,  $p=0,044$ ,  $n=10$ ) reduzieren (Abbildung 14).

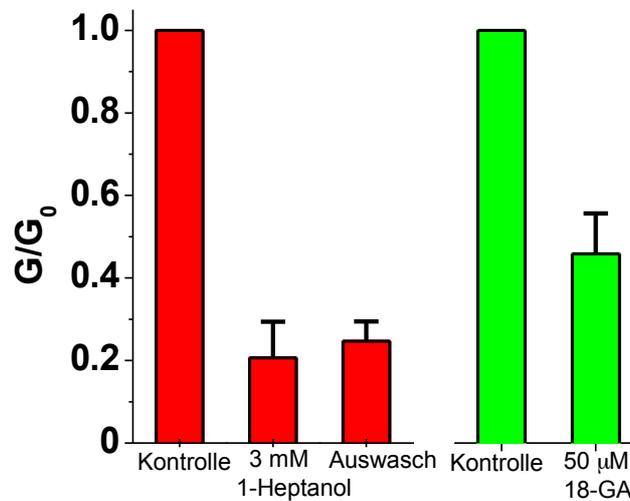


Abbildung 14: Zellentkopplung durch 1-Heptanol und 18-GA

Die Abbildung zeigt die Reduktion des Leitwertes der endothelialen Zellmembran nach Applikation von 3 mM 1-Heptanol bzw. 50  $\mu$ M 18-GA.

In 1-Heptanol war dieser Effekt auch nach langer Auswaschzeit von 20 Minuten mit einer sehr geringen Erholung des Leitwertes auf  $3,5 \pm 1,3$  mS nur zu einem geringen Teil reversibel (Abbildung 15). 18-GA wurde nicht auf Reversibilität untersucht.

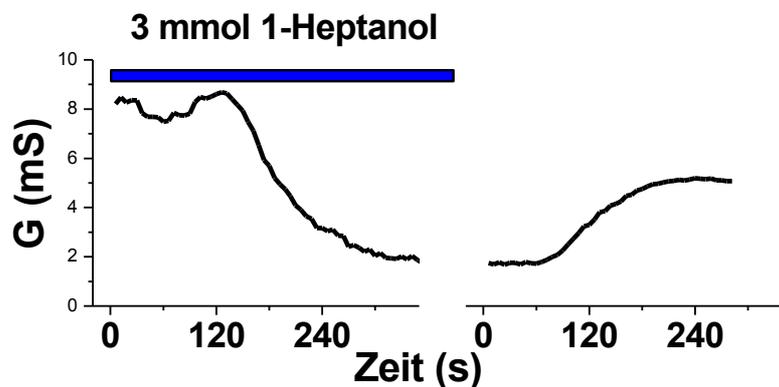


Abbildung 15: Entkopplung einer Endothelzelle durch Ein- und Auswasch von Heptanol

Die Abbildung zeigt die Kinetik des Ein- und Auswaschs in Bezug auf den Leitwert der Zellmembran von 3 mmol 1-Heptanol einer Endothelzelle mit geringem Eingangswiderstand. Nach dem Auswasch kam es nicht zu einer vollständigen Wiederherstellung der ursprünglichen Situation.

Da die Entkopplung der Endothelzellen mit 50  $\mu\text{M}$  18-GA zu gering ausgeprägt war, um die spezifischen Kanalströme in Zellen mit niedrigem Eingangswiderstand zu untersuchen, wurde für weitere Untersuchungen 1-Heptanol zur Entkopplung verwendet. Trotz der ausgeprägten Verminderung der Eingangswiderstände nach der Applikation von 1-Heptanol waren keine Auswärtsströme wie in den Zellen mit hohem Eingangswiderstand messbar. Eine mögliche Hypothese hierfür wäre, dass 1-Heptanol nicht nur *gap-junctions* entkoppelt, sondern ebenfalls den gesuchten Kaliumkanal blockiert. Aus diesem Grund wurde der Effekt von 1-Heptanol auf die Kaliumströme von Zellen mit hohem Eingangswiderstand untersucht.

#### 3.2.3. Auswärtsstromblockade durch 1-Heptanol

Wegen der oben genannten Vermutung, dass durch 1-Heptanol spannungsabhängige Auswärtsströme blockiert werden könnten, wurden Endothelzellen, bei denen der spannungsaktivierte Auswärtsstrom eindeutig nachweisbar war, mit 1-Heptanol superfundiert. Wieder wurden um jeweils 10 mV zunehmende Spannungssprünge, von einem Haltepotential von  $-80$  mV ausgehend, appliziert und die Stromamplitude der Zelle gemessen. Die gewonnenen Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit zum maximal gemessenen Wert normalisiert. Es zeigte sich, dass 1-Heptanol in der Lage war, dosisabhängig reversibel den spannungsabhängigen Auswärtsstrom zu blockieren (Abbildung 16).

Durch Verdünnungsreihen mit 1-Heptanol (0,3; 0,6; 1; 3 und 6 mmol/l) konnte eine Dosis-Wirkungs-Kurve nach der Hill-Gleichung erstellt werden (Abbildung 17). Hierzu wurden die Messungen bei einem Reizpotential von  $+40$  mV verwendet. Es errechnete sich eine mittlere inhibitorische Konzentration von ( $\text{IC}_{50}$ ) von  $2,4 \pm 0,27$  mmol/l. Der Hill-Koeffizient war  $0,31 \pm 0,07$ . Je nach Konzentration war  $n$  zwischen 2 (2 mmol/l) 5 (0,6 mmol/l) und 15 (3 mmol/l). Alle Versuche fanden bei Raumtemperatur  $22$  °C statt.

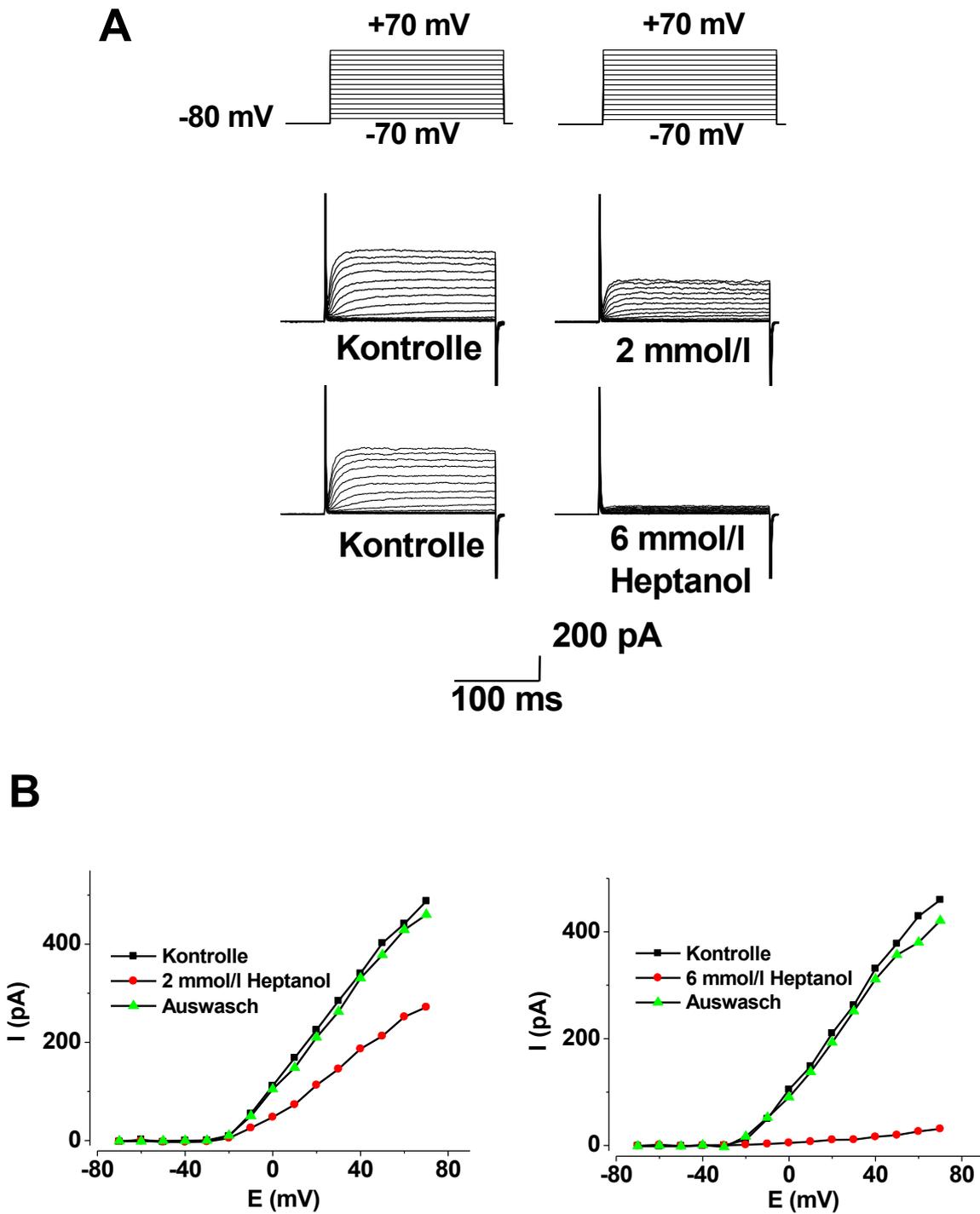


Abbildung 16: Blockade von Auswärtsströmen von Typ I-Endothelzellen durch 1-Heptanol

**A:** Originalregistrierungen von oberhalb gezeigten Spannungssprüngen vor und nach der Applikation von 2 bzw. 6 mmol/l 1-Heptanol. Deutlich sichtbar ist die dosisabhängige Reduktion des spannungsabhängigen Auswärtsstromes. **B:** in der Strom-Spannungskurve zeigt sich die Spannungsabhängigkeit des Auswärtsstromes, die Dosisabhängigkeit der Stromblockade und die Reversibilität der Stromblockade.

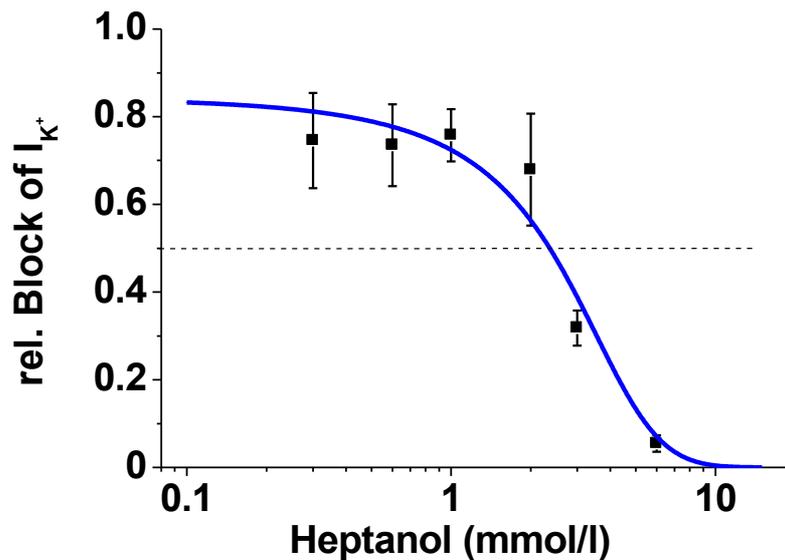
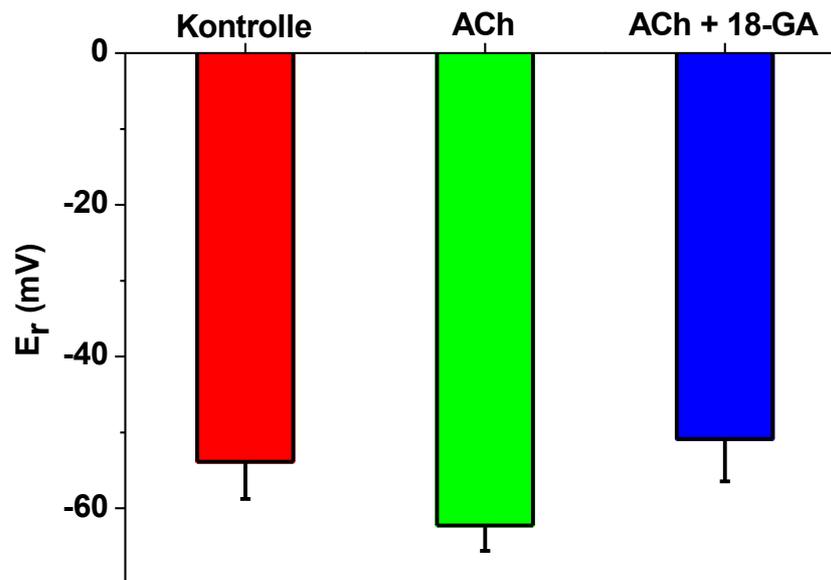


Abbildung 17: Dosis-Wirkungskurve von 1-Heptanol

Die aus der Verdünnungsreihe mit 1-Heptanol erstellte Dosis-Wirkungs-Reihe hat eine  $IC_{50}$  von  $2,4 \pm 0,27$  mmol/l und einen Hill-Koeffizient von  $K=0,31 \pm 0,07$ ,  $n=2$  (2 mmol/l 1-Heptanol) bis  $n=11$  (1 mmol/l 1-Heptanol).

#### 3.2.4. Reduktion der Hyperpolarisation nach ACh Applikation durch 18-GA

Um eine Reduktion einer EDHF abhängigen Hyperpolarisation durch Acetylcholin von Endothelzellen zu überprüfen, wurden Endothelzellen mit geringem Eingangswiderstand, ausgehend von einem RP von durchschnittlich  $-53,9 \pm 4,9$  mV mit  $10 \mu\text{M}$  ACh auf  $-62,2 \pm 3,4$  mV ( $n=7$ ), hyperpolarisiert. Anschließend werden bei fortbestehender Applikation von  $10 \mu\text{M}$  ACh die *gap-junctions* mit  $50 \mu\text{M}$  18-GA blockiert. Hierbei depolarisierten die Endothelzellen wieder auf ein durchschnittliches RP von  $-50,9 \pm 5,6$  mV (gepaarter t-Test,  $p=0,023$  ;  $n=7$  ; Abbildung 18).



**Abbildung 18: Hyperpolarisation durch ACh und Depolarisation durch Zellentkopplung**

Endothelzellen mit einem geringen Eingangswiderstand wurden durch die Applikation von 10  $\mu\text{mol/l}$  hyperpolarisiert. Die Zugabe von 50  $\mu\text{mol/l}$  18- $\beta$ -Glycyrrhetinsäure führte zu einer Rückkehr zum Ruhepotential in den ursprünglichen Bereich.

### *3.3. Hypoxie*

#### **3.3.1. Effekte von Hypoxie auf das Ruhepotential**

Die Gefäße der untersuchten Stromgebiete wurden einer Perfusion mit hypoxischer Lösung ausgesetzt. Hierbei wurden jeweils 2 Gruppen mit moderater (40 – 20 mmHg  $\text{O}_2$ ) und schwerer Hypoxie (20 – 0 mmHg  $\text{O}_2$ ) unterschieden. Während der Applikation der hypoxischen Lösung wurde das Ruhepotential von Endothelzellen mit geringem Eingangswiderstand (Typ II-Endothelzellen) aufgenommen.

Hierbei zeigte sich, dass Hypoxie, weder in leichter noch in schwerer Ausprägung, dazu in der Lage war, das Ruhepotential der Endothelzellen zu beeinflussen. Es wurden 6 Versuche mit moderater und 19 Versuche mit schwerer Hypoxie durchgeführt (Abbildung 19). Das durchschnittliche Ruhepotential von -54,6  $\pm$  3,1 mV in Kontrolle reduzierte sich geringgradig auf -52,9  $\pm$  3,3 mV (n=19; p=0,35) unter starker Hypoxie von durchschnittlich 8,0  $\pm$  1,5 pO<sub>2</sub>

### 3.3 Hypoxie

und verringerte sich geringgradig weiter in der Auswaschphase nach 10 Minuten auf  $-51,1 \pm 3,8$  mV.

In moderater Hypoxie zeigte sich das Ruhepotential ebenfalls unbeeinflusst. In Kontrolllösung lag das Ruhepotential bei  $-61,7 \pm 2,6$  mV, in moderater Hypoxie von durchschnittlich  $31,1 \pm 1,3$  Torr bei  $-61,5 \pm 3,1$  mV ( $n=6$ ;  $p=0,95$ ) und in der Auswaschphase bei  $-60,8 \pm 3,2$  mV (Abbildung 19 C).

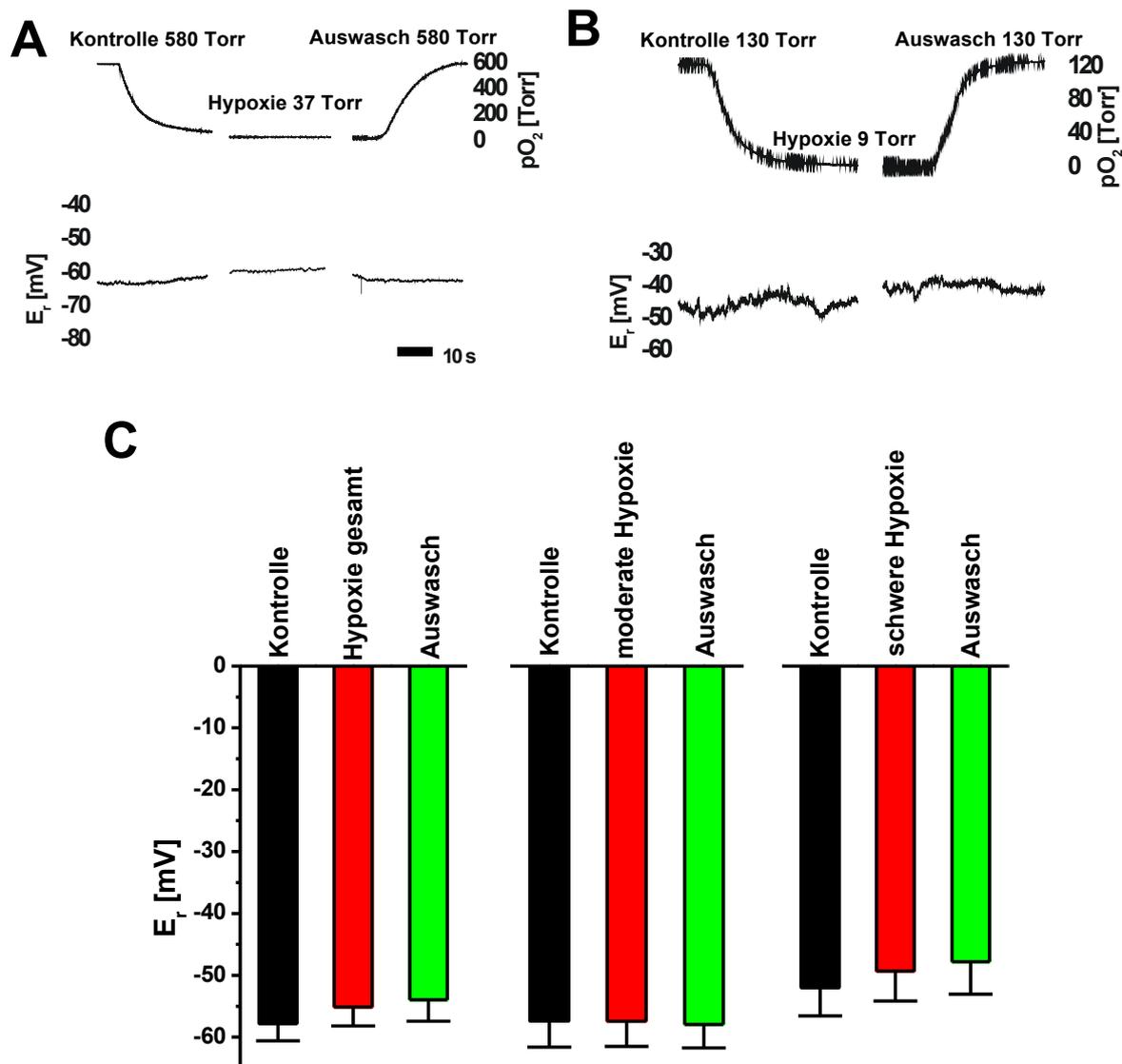


Abbildung 19: endotheliale Ruhepotentiale von Typ II-Endothelzellen unter Hypoxie

**A:** Originalregistrierung des Ruhepotentials einer Typ II-Endothelzelle unter moderater Hypoxie.  
**B:** Originalregistrierung des Ruhepotentials einer Typ II-Endothelzelle unter schwerer Hypoxie.  
**C:** Zusammenfassende Darstellung der Hypoxieversuchsreihe an Typ II-Endothelzellen mit geringem Eingangswiderstand. Es kam zu keiner relevanten Beeinflussung des Ruhepotentials durch moderate ( $n=6$ ) oder schwere ( $n=19$ ) Hypoxie.

Um sicherzustellen, dass ein möglicher Effekt mit bedeutender zeitlicher Latenz auftritt und deshalb wegen zu kurz dauernder Versuchsprotokolle übersehen werden konnte, wurden einige Versuche mit schwerer Hypoxie durchgeführt, in denen die Zellen über 20 Minuten schwerer Hypoxie ausgesetzt waren (Abbildung 20). Hier zeigte sich ebenfalls die fehlende Beeinflussung des RP durch die Hypoxie.

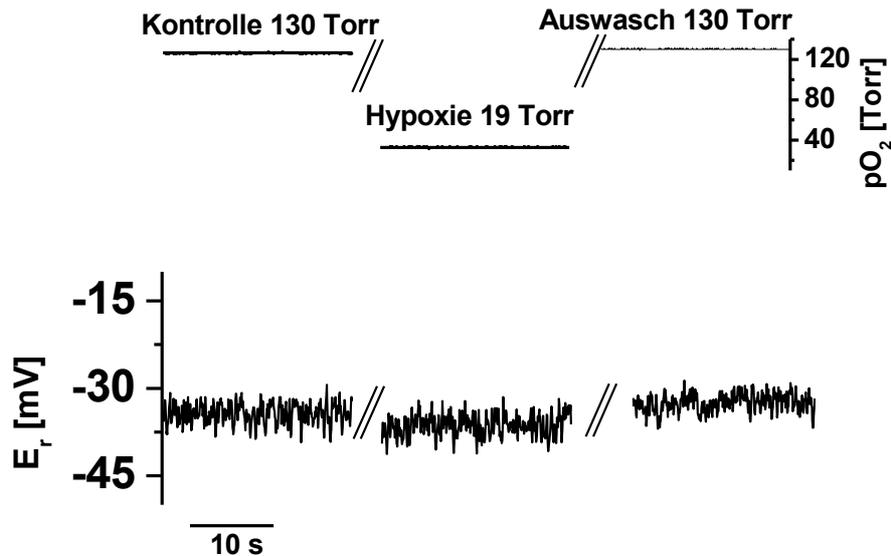


Abbildung 20: Ruhepotential unter lang anhaltender Hypoxie

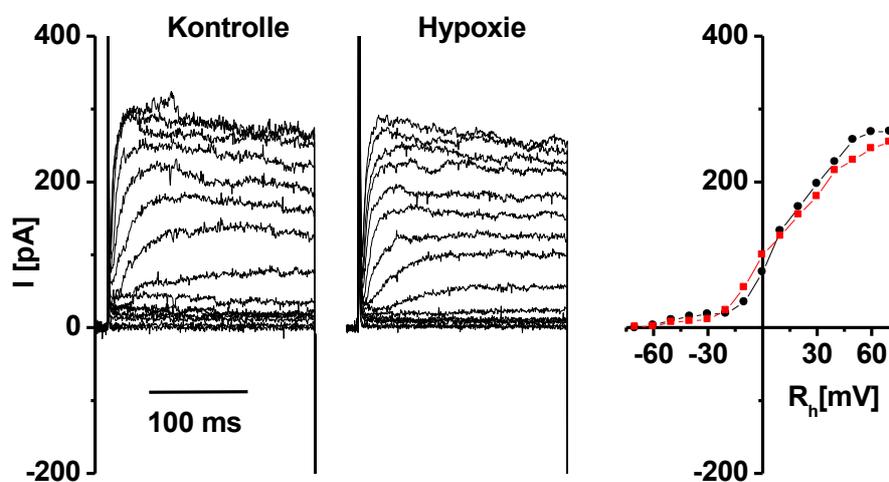
Auszüge aus Originalregistrierung des Ruhepotentials von -32 mV einer Typ II-Endothelzelle unter schwerer 20-minütiger Hypoxie. Das Ruhepotential wird durch den Sauerstoff nicht signifikant beeinflusst. Ebenso unverändert bleibt die Fluktuation des Ruhepotentials.

#### 3.3.1. Effekte von Hypoxie auf den Auswärtsstrom

Nachdem für schwere Hypoxie keine Beeinflussung des Ruhepotentials der Endothelzellen nachgewiesen werden konnte, sollte der Einfluss von Hypoxie auf die spannungsabhängigen Auswärtsströme von Typ I-Endothelzellen untersucht werden. Wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, wurde ebenfalls ein Versuchsprotokoll verwendet, das im *voltage-clamp* Modus ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV Spannungssprünge ausführt, die jeweils um 10 mV anstiegen, bis zu einem maximalen Reizpotential von  $E=120$  mV appliziert (Abbildung 21). Unter diesen Konditionen zeigte sich keine Beeinflussung des

gemessenen Kaliumstromes oder dessen Kinetik. In Versuchen mit tiefer Hypoxie betrug der Auswärtsstrom bei  $E=40$  mV Reizpotential in Kontrolle durchschnittlich  $204 \pm 26$  pA, unter Hypoxie betrug der relative Strom  $I/I_0$   $0,996 \pm 0,114$  und im Auswasch  $0,902 \pm 0,164$  ( $n=7$ ,  $p=0,97$ ) bei einer mittlere Hypoxie von  $8,3 \pm 3,7$  pO<sub>2</sub> (Abbildung 22).

In Versuchen mit moderater Hypoxie betrug der Auswärtsstrom bei 40 mV Reizpotential in Kontrolle durchschnittlich  $342 \pm 31$  pA, unter Hypoxie betrug der relative Strom  $I/I_0$   $0,920 \pm 0,078$  und im Auswasch  $0,898 \pm 0,073$  ( $n=17$ ,  $p=0,32$ ) bei einer durchschnittlichen Hypoxie von  $31,8 \pm 1,6$  pO<sub>2</sub> (Abbildung 22).



**Abbildung 21: Strom-Spannungs-Beziehung unter schwerer Hypoxie**

**A:** Originalregistrierung der Auswärtsströme in Kontrolle und unter schwerer Hypoxie pO<sub>2</sub>=10 Torr.  
**B:** Strom-Spannungs-Kurve des gleichen Versuches in Kontrolle (schwarze Kreise) und unter schwerer Hypoxie von 10 Torr (rote Quadrate). Durch die Hypoxie kam es zu keiner Reduktion oder Veränderung des Auswärtsstromes oder dessen Kinetik.

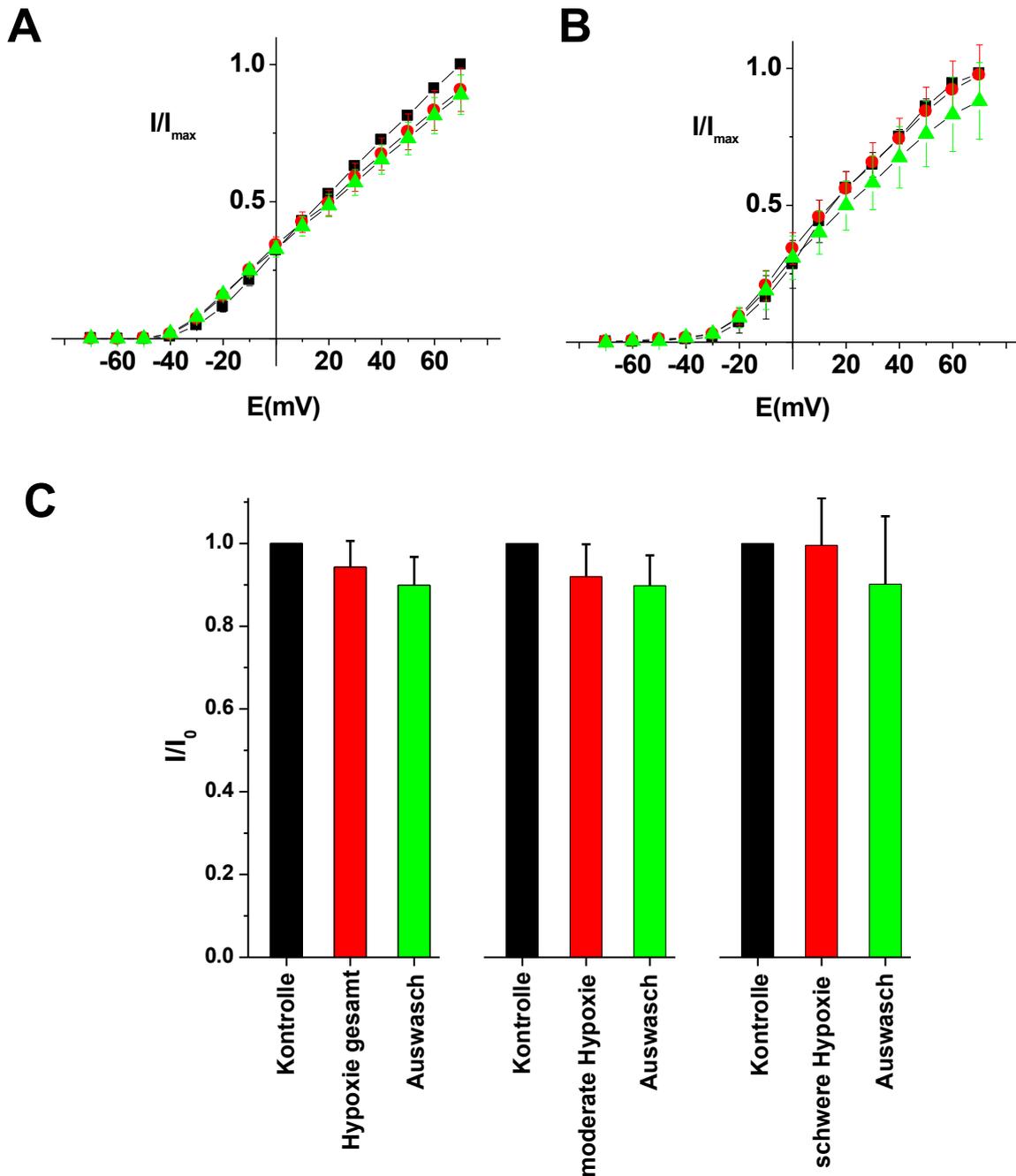


Abbildung 22: Zusammenfassung von Strom-Spannungsbeziehungen unter Hypoxie

Zusammenfassende Abbildung zu der Beeinflussung des Auswärtsströme durch Hypoxie. A: Strom Spannungskurve mit auf  $I_{\max}$  normierte Auswärtsströme unter moderater Hypoxie von 20 – 40 Torr (n=16; schwarze Quadrate=Kontrolle; rote Kreise=Hypoxie; grüne Dreiecke=Auswasch). B: Strom-Spannungskurve mit auf  $I_{\max}$  normierte Auswärtsströme unter schwerer Hypoxie von 0-20 Torr (n=7; schwarze Quadrate=Kontrolle; rote Kreise=Hypoxie; grüne Dreiecke=Auswasch). Es wird deutlich, dass der gemessene spannungsabhängige Kaliumstrom in Endothelzellen nicht signifikant durch Hypoxie zu beeinflussen ist. C: Darstellung der auf  $I_0$  normierten Ströme der Untersuchten Zellen insgesamt, unter moderater bzw. schwerer Hypoxie bei einem Reizpotential von 40 mV. In keiner der Untersuchten Gruppen kam es zu einer signifikanten Änderung des Ruhepotentials.

# 4. Diskussion

### *4.1. Besonderheiten mit dem Dünnschnittmodell*

Die Dünnschnittpräparation des Meerschweinchenherzens bietet in Kombination mit der *patch-clamp* Technik die besondere Möglichkeit, Untersuchungen von Endothelzellen kleiner Arteriolen in ihrem physiologischen Verbund mit glatten Muskelzellen zu untersuchen. Ein großer Teil der elektrophysiologischen Untersuchungen, die zum Erkenntnisgewinn von Gefäßregulationsmechanismen durchgeführt werden, berücksichtigt nicht die Kopplung der Endothelzellen untereinander und mit glatten Muskelzellen zu einem funktionellen Synzytium. Die Untersuchungen werden häufig an isolierten Endothelzellen (Brahler *et al.*, 2009) an Gefäßringen (Smani *et al.*, 2002) oder an isolierten Gefäßen (Rhinehart *et al.*, 2002) vorgenommen. Hierbei untersuchte Effekte können z.B. durch für die Präparation verwendete Enzyme verfälscht oder unter physiologischen Bedingungen nicht existent sein. Insbesondere, wenn es um die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Endothel und glatten Muskelzellen bei der Gefäßregulation geht, erscheint das Modell der Dünnschnittpräparation entscheidende Vorteile gegenüber sonstigen Modellen zu bieten. Aufgrund der Vielfältigkeit der Wechselwirkungsmöglichkeiten und der Komplexität des Modells scheint es jedoch für die Untersuchung von pharmakokinetischen Untersuchungen nur bedingt geeignet zu sein, da es zu Anreicherungen der zu untersuchenden Substanzen in den Dünnschnitten kommen kann und damit ein Auswasch-Effekt möglicherweise nicht korrekt untersucht werden kann.

### *4.2. Endothelzelltypen*

In Bestätigung zu Ettore (2006) konnten in den durchgeführten Untersuchungen zwei unterschiedliche Zelltypen mit geringem und hohem Eingangswiderstand gefunden werden. Zellen mit hohem Eingangswiderstand wiesen einen spannungsabhängigen Auswärtsstrom auf. Im Gegensatz zur vorausgegangenen Arbeit fand sich in Zellen ohne messbaren Auswärtsstrom (Typ II-Endothelzelle) im Durchschnitt ein um ca. 14 mV negativeres Ruhepotential als bei Zellen mit Auswärtsstrom (Typ I-Endothelzelle). Erklärbar wäre der Unterschied des Ruhepotentials durch ein unterschiedliches Schwellenpotential der für das Ruhepotential verantwortlichen Kanäle und würde für einen Besatz mit

unterschiedlichen Ionenkanälen sprechen. Der Betrag des Membranpotentials ist ähnlich den in der Literatur beschriebenen Potentialen von Endothelzellen in koronaren Arteriolen (Chen & Cheung, 1992; Beny & Gribi, 1989). Hier findet sich ebenfalls der Hinweis, dass mit glatten Muskelzellen gekoppelte Endothelzellen ein negativeres Membranpotential aufweisen als ungekoppelte, was im vorliegenden Modell für die Kopplung der Zellen mit geringem Eingangswiderstand an direkt anliegende glatte Muskelzellen spräche.

#### ***4.3. Endothelium derived hyperpolarizing factor (EDHF)***

In Zellen mit geringem Eingangswiderstand konnte durch die Applikation von Acetylcholin eine Hyperpolarisation des Membranpotentials hervorgerufen werden. Diese bestätigt die in der Literatur beschriebene Wirkung von Acetylcholin als EDHF im vorliegenden Modell (Feletou & Vanhoutte, 1988; Chen *et al.*, 1988). In Zellen mit hohem Eingangswiderstand konnte durch ACh keine Hyperpolarisation hervorgerufen werden. Dies unterstützt die von Ettore (2006) geäußerte Annahme, dass die Zellen mit hohem Eingangswiderstand ungekoppelte Zellen darstellen könnten, da für die EDHF-Wirkung von ACh eine Kopplung von Endothelzellen an die darunterliegende glatte Gefäßmuskelschicht eine Grundvoraussetzung ist. Gestützt wird diese Annahme zusätzlich von den Experimenten, in denen die Hyperpolarisation durch ACh komplett durch die Co-Applikation von 18- $\beta$ -Glycyrrhetinsäure unterbunden werden konnte. Diese Beobachtung bestätigt die in der Literatur beschriebene Wirkung der 18-GA als *gap-junction* entkoppelnde Substanz ebenso wie die Notwendigkeit der Zellkopplung von Endothelzellen an die glatte Muskelzellschicht zur EDHF-abhängigen Hyperpolarisation (Goto *et al.*, 2002; Guan *et al.*, 2007; Edwards *et al.*, 1998). Insgesamt erscheint die EDHF abhängige Vasodilatation noch wesentlich komplexer zu sein. So ergeben sich Hinweise, dass SK<sub>Ca</sub>-Kanäle an der Hyperpolarisation der Endothelzellen (Siegl *et al.*, 2005; Weston *et al.*, 2010) und BK<sub>Ca</sub>-Kanäle an der Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen (Siegl *et al.*, 2005) und damit der Vasodilatation beteiligt sind.

Auffällig war die fehlende Reversibilität der Wirkung der 18-GA. Nach Entfernung der 18-GA unter fortbestehender Applikation von ACh führte dies zu keiner erneuten Hyperpolarisation, wie zu erwarten gewesen wäre, da für 18-GA eine reversible Entkopplung von *gap-junctions* beschrieben wurde (Davidson *et al.*, 1986). Dies stellt eine Besonderheit im

vorliegenden Modell der Dünnschnittpräparation dar (Ettorre, 2006) und gilt sowohl für höhermolekulare, bzw. lipophile Proteine und Toxine wie auch für Moleküle mit hoher unspezifischer Gewebebindung. Die 18-GA ähnelt in ihrer Molekülstruktur dem Cortisol und ist damit sehr lipophil, d.h. sie besitzt eine hohe unspezifische Gewebebindung.

#### ***4.4. Beeinflussung der K<sub>ATP</sub>-Kanäle durch Glibenclamid und Diazoxid***

Die Präsenz und Funktion von K<sub>ATP</sub>-Kanälen wurden in vielen Zellen beschrieben, insbesondere in der Funktion als Hypoxiesensor auf glatten Gefäßmuskelzellen, wo sie durch Hyperpolarisation der Zellmembran der glatten Muskelzelle zu einer Verringerung der Offenwahrscheinlichkeit von spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanälen führen, wodurch das Zytoplasma an Ca<sup>2+</sup>-Ionen verarmt und eine hypoxische Vasodilatation hervorgerufen wird, kommt ihnen eine sehr wichtige Rolle zu (Daut *et al.*, 1990; von Beckerath *et al.*, 1991). Das Vorkommen von K<sub>ATP</sub>-Kanälen in Endothelzellen wird kontrovers diskutiert. Nur vereinzelt wurden K<sub>ATP</sub>-Kanäle auf Endothelzellen nachgewiesen (Schnitzler *et al.*, 2000), wo sie für eine Modulation der NO-Synthese und die Permeabilität der Gefäßwände zuständig sein sollen.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Beeinflussung des Ruhepotentials der Endothelzellen mit geringem Eingangswiderstand durch Glibenclamid, einem Inhibitor von K<sub>ATP</sub>-Kanälen, und Diazoxid, einem Aktivator von K<sub>ATP</sub>-Kanälen, im Widerstandsstromgebiet der kleinen koronaren Arteriolen beeinflusst werden. Für Mesenterialarterien der Ratte wurden durch (Kansui *et al.*) 2009 vergleichbare Ergebnisse beschrieben. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der K<sub>ATP</sub>-Kanal auch unter Normoxie eine Grundaktivität besitzt und an der Bildung des Ruhepotentials des myoendothelialen Synzytiums beteiligt ist, da eine Applikation von Glibenclamid das Ruhepotential der Endothelzellen aus der Kontrolle deutlich absenken konnte. Da sich die Ruhepotentiale der gekoppelten Endothel- und Muskelzellen über ihre *gap-junctions* gegenseitig beeinflussen, können sie als ein elektrisches Synzytium gesehen werden. Zusätzlich bestätigte das Fehlen der Modulation des Ruhepotentials durch Glibenclamid oder Diazoxid in Endothelzellen mit einem hohen Eingangswiderstand sowohl die Annahme, dass diese untersuchten Endothelzellen nicht mit den glatten Muskelzellen gekoppelt sind, als auch, dass sich die K<sub>ATP</sub>-Kanäle in den untersuchten Gefäßen nicht auf den Endothelzellen selbst, sondern auf den an diese gekoppelten glatten Muskelzellen befinden.

Dass die  $K_{ATP}$ -Kanäle nicht in den Endothelzellen selbst, sondern in den glatten Muskelzellen zu finden sind, wird ebenfalls durch den fehlenden Einzelkanalnachweis des  $K_{ATP}$ -Kanals in outside-out-Membranpatches gestützt (Daten nicht gezeigt).

#### ***4.5. Funktionelle Zellkopplung zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen***

Vielfach konnte in der Literatur die funktionelle Kopplung von den Endothelzellen untereinander, den glatten Muskelzellen untereinander und den Endothelzellen an glatte Muskelzellen mit Farbstoffen wie Lucifer Yellow (LY) gezeigt werden (Segal & Beny, 1992; Little *et al.*, 1995; Beny & Gribi, 1989). In diesen Arbeiten zeigte sich, dass die Kopplung über *gap-junctions* nicht allein als eine Kopplung wie über eine unspezifische Zellpore zu sehen ist, sondern abhängig von ihrer Zusammensetzung aus verschiedenen Connexinen unterschiedliche Eigenschaften in der Durchlässigkeit für bsp. second messenger wie Inositol Triphosphat und  $Ca^{2+}$  besitzen kann. *Gap-junctions* besitzen ähnlich wie Ionenkanäle variable Offenwahrscheinlichkeiten, verschiedene Leitungszustände und vereinzelt sogar Ionenselektivität (Brink *et al.*, 1996; Brink *et al.*, 2000). Die Färbbarkeit der Endothelzellen untereinander wird als sehr gut beurteilt. Auch glatte Muskelzellen sind nach der Injektion von Lucifer Yellow anfärbbar. Färbung glatter Muskelzellen untereinander bzw. Färbung von Endothelzellen durch Farbstoffinjektion in glatte Muskelzellen färben sich nur sehr schlecht oder gar nicht an, obwohl die Kopplung dieser Zellen untereinander beschrieben ist (Beny, 1990; Hirst & Neild, 1978). Im vorliegenden Modell konnte trotz der pharmakologischen Untersuchung mit ACh und 18-GA, die stark auf eine funktionelle Kopplung der Endothelzellen an die glatte Gefäßmuskelschicht hinwiesen, weder mit Lucifer Yellow, noch mit Carboxyfluorescein eine Zellkopplung nachgewiesen werden. Die fehlende Passage von LY wurde für mehrere Zelltypen bereits beschrieben (Goddard *et al.*, 1991; Vaney, 1991; Robinson *et al.*, 1993). Zusätzlich wurde beschrieben, dass LY unter bestimmten Umständen sogar die Passage von *gap-junctions* blockieren kann (Little *et al.*, 1995). In der verwendeten Konfiguration mit Applikation von LY in Endothelzellen stellt es jedoch normalerweise einen guten Farbstoff für den Nachweis von Zellkopplung dar und führt in der Regel zur Anfärbung von weiteren Endothelzellen, bzw. von glatten Muskelzellen.

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre die verminderte Leitfähigkeit für LY, wie sie bei Zusammensetzung der *gap-junctions* bei fehlendem Connexin 40 vorkommen kann, erscheint jedoch nicht sehr wahrscheinlich.

Ähnliche Ergebnisse bezüglich der fehlenden Farbstoffausbreitung über *gap-junctions* wurden am Kremastermuskel der Maus *in vivo* gefunden (Siegl *et al.*, 2005). Hier wird die Hypothese geäußert, dass *in vivo* die Kopplung von glatter Muskelzelle und Endothelzelle in kleinen Arterien keine bedeutende Rolle zu spielen scheint, sondern dass dies ein Artefakt der Präparation von isolierten Gefäßen sein könnte. Die EDHF-abhängige Vasodilatation wird in diesem Modell nicht durch eine elektrotonische Kopplung der Endothel- und glatten Muskelzellen, sondern durch die Diffusion eines Faktors erklärt, der in den glatten Gefäßmuskelzellen zu einer Aktivierung des BK<sub>Ca</sub>-Kanals und damit zu einer Gefäßdilatation führt.

#### ***4.6. 1-Heptanol und 18-β-Glycyrrhetinsäure***

Heptanol und 18-β-Glycyrrhetinsäure werden in der Literatur als *gap-junction* Entkoppler beschrieben (Little *et al.*, 1995; Bastide *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 1998; Davidson *et al.*, 1986). Für beide Substanzen konnte eine Erhöhung des Eingangswiderstandes bzw. eine Verminderung des Membranleitwertes in Typ II-Endothelzellen gezeigt werden und ist vereinbar mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen (Matchkov *et al.*, 2004). Auch die höhere Wirksamkeit von 1-Heptanol gegenüber 18-GA wird hier genannt. Die geringe Reversibilität der Zellentkopplung von 1-Heptanol und 18-GA könnte durch unspezifische Bindungen der Substanzen an die Dünnschnitte bedingt sein und steht im Kontrast zur in der Literatur genannten Reversibilität (Takens-Kwak *et al.*, 1992; Kuhberger *et al.*, 1994). Hier wird 1-Heptanol jedoch neben Mannitol und Saccharose als relativ spezifischer *gap-junction* Blocker beschrieben.

Dass 18-GA und 1-Heptanol keine hochselektiven und spezifischen Substanzen für die Entkopplung von *gap-junctions* sind, wird seit längerem vermutet (Hashitani & Suzuki, 1997; Yamamoto *et al.*, 1998; Murai *et al.*, 1999). Der genaue Mechanismus der Zellentkopplung durch 1-Heptanol ist nicht abschließend geklärt. Die zugrundeliegende Molekülstruktur des 1-Heptanols, das einen mehrwertigen Alkohol darstellt, lässt eine spezifische Wirkung auf Connexine durch Interaktion mit einer Bindungsstelle als unwahrscheinlich erscheinen.

Bisher wird angenommen, dass 1-Heptanol durch unspezifische Interaktion mit der Lipiddoppelschicht zu einer Strukturveränderung der Zellmembran führt und dadurch nicht nur die Offenwahrscheinlichkeit von *gap-junctions*, sondern auch von Ionenkanälen verändern kann (Takens-Kwak *et al.*, 1992; Bastiaanse *et al.*, 1993). Hieraus resultiert eine dosisabhängige Blockade von spezifischen Membranströmen bei unveränderter Einzelkanalleitfähigkeit im Membranpatch. Mittlerweile wurden in Übereinstimmung mit dieser Hypothese weitere sogenannte nicht-kopplungsbedingte Effekte (*non-junctional effects*) durch 1-Heptanol beschrieben. Unter anderem findet sich eine Inhibition der interzellulären Kalziumkommunikation (Guan *et al.*, 1997; Matchkov *et al.*, 2004). In geringer Konzentration von 150  $\mu$ M wurde für 1-Heptanol eine Hyperpolarisation von Endothelzellen durch Aktivierung von Kaliumkanälen beschrieben (Matchkov *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu wurde für 1-Heptanol aber auch die Möglichkeit für eine spezifische direkte polare bzw. apolare Interaktion mit Kanalproteinen beschrieben (Peracchia, 1991). In den, in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte neben der bekannten Zellentkopplung durch 1-Heptanol erstmals eine dosisabhängige Blockade des spannungsabhängigen Auswärtsstromes der Endothelzellen gezeigt werden. Am ehesten ist dies durch eine Blockade der in den untersuchten Endothelzellen überwiegend vorkommenden Kaliumkanälen (K<sub>V</sub> 1.3) zu erklären. Grundsätzlich wäre hier auch ein unspezifischer Effekt des 1-Heptanols durch Veränderung der Membranstruktur möglich. Zur abschließenden Beurteilung wäre hierfür die Messung von Einzelkanalleitfähigkeiten der Kaliumströme notwendig. Die Blockade des K<sub>V</sub> 1.3-Kanals stellt letztlich eine Erklärung dafür dar, dass in Zellen mit geringem Eingangswiderstand auch nach Entkopplung der untersuchten Endothelzellen vom Synzytium keine Auswärtsströme gemessen werden konnten.

#### ***4.7. O<sub>2</sub>-Sensing in koronaren Arteriolen***

Die koronare Blutzirkulation wird ständig dem Sauerstoffbedarf des Myokards durch Koordination des Gefäßwiderstandes vor allem in kleinen Arteriolen mit einem Durchmesser unter 100  $\mu$ m, welche in funktionellen Einheiten mit verschiedenen Regulationsmechanismen zusammengefasst sind, angepasst. Von diesen schnell auf Hypoxie ablaufenden Mechanismen sind hypoxieinduzierte Langzeiteffekte wie gesteigerte Genexpression, *up-regulation* von

Wachstumsfaktoren, Hypertrophie usw. klar abzugrenzen (Bao *et al.*, 2010; Tintu *et al.*, 2009). Hierdurch ist die koronare Gefäßregulation nicht abhängig von einem Mechanismus allein. Neben der Regulation des Blutflusses durch isolierte Hypoxie können weitere Mechanismen wie Glucosedeprievation, Absinken des pH's, Anstieg der Adenosinkonzentration, Abfall der ATP-Konzentration zu einer Gefäßdilatation führen.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte durch die akute Applikation von moderater oder schwerer Hypoxie keine Beeinflussung des Auswärtsstroms von koronaren Endothelzellen in kleinen Arteriolen gezeigt werden. Obwohl für den überwiegend in den untersuchten Endothelzellen vorkommenden K<sub>V</sub> 1.3-Kanal eine Modulation durch Hypoxie in T-Lymphozyten beschrieben wurde, war dies im vorliegenden Modell nicht der Fall. Für die Sauerstoffsensitivität des Kanals ist das Vorkommen der src-Protein Tyrosin-Kinase p56Lck notwendig (Szigligeti *et al.*, 2006), die möglicherweise in den untersuchten Endothelzellen nicht co-exprimiert wird. Das Kanalprotein des K<sub>V</sub>-1.3 selbst ist bisher nicht als Sauerstoffsensor beschrieben. Dass spannungsabhängige Kaliumkanäle jedoch an der hypoxischen Vasodilatation beteiligt sind, konnte für verschiedene Vertreter dieser Familie zumindest für den Ductus arteriosus gezeigt werden (Weir *et al.*, 2005; Michelakis *et al.*, 2002; Tristani-Firouzi *et al.*, 1996).

Darüber hinaus konnte in den untersuchten Endothelzellen weder unter moderater, noch unter schwerer Hypoxie eine Beeinflussung des Ruhepotentials nachgewiesen werden. Zu erwarten gewesen wäre in den an glatte Muskelzellen gekoppelten Endothelzellen eine hypoxische Hyperpolarisation des Membranpotentials, da der Hauptmechanismus, der in koronaren Arteriolen zu einer hypoxischen Dilatation führt, die Aktivierung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen und der damit verbundenen Hyperpolarisation des Membranpotentials in glatten Gefäßmuskelzellen darstellt (von Beckerath *et al.*, 1991; Dart & Standen, 1995). Dieser Mechanismus wird als endothelunabhängig beschrieben, scheint in Abhängigkeit des Gefäßstromgebietes jedoch sehr vielgestaltig zu sein. Eine Endothelunabhängigkeit der hypoxischen Vasodilatation würde für die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen, da eine Aktivierung der K<sub>ATP</sub>-Kanäle glatter Gefäßmuskelzellen trotz beschriebener myoendothelialer Kopplung über *gap-junctions* in den Endothelzellen möglicherweise nicht messbar sein könnte. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die nicht beobachtete Beeinflussung des Ruhepotentials der Endothelzellen durch Hypoxie wäre, dass im untersuchten Stromgebiet der koronaren Arteriolen im Gegensatz zu anderen Gefäßstromgebieten der K<sub>ATP</sub>-Kanal keinen Effektor für die hypoxische Vasodilatation darstellt. Dies erscheint jedoch unter Berücksichtigung der bereits genannten Literatur wenig plausibel.

In cerebralen Arteriolen wird ein endothelabhängiger Mechanismus angenommen. Hier soll die Gefäßdilatation über eine Aktivierung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen glatter Gefäßmuskelzellen durch ein diffundierendes Cyclooxygenaseprodukt aus Endothelzellen zustandekommen (Fredricks *et al.*, 1994). Gleich ob die hypoxische Vasodilatation endothelabhängig ist oder nicht, der eigentliche Wirkmechanismus, der zur Vasodilatation führt, ist eine Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen durch Aktivierung der K<sub>ATP</sub>-Kanäle (Daut *et al.*, 1990; von Beckerath *et al.*, 1991; Nakhostine & Lamontagne, 1993). In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mit Diazoxid und Glibenclamid in Verbindung mit 18-GA konnte nachgewiesen werden, dass diese Substanzen K<sub>ATP</sub>-Kanäle der glatten Gefäßmuskelzellen aktivieren, bzw blockieren können und die hieraus resultierende Beeinflussung des Ruhepotentials sich auf die angekoppelten Endothelzellen auswirkt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Modulation des Ruhepotentials durch Entkopplung der glatten Muskelzellen von den Endothelzellen vermindert werden konnte. Dies bedeutet im Umkehrschluss, wenn im vorliegenden Modell durch Hypoxie eine Vasodilatation durch Aktivierung von K<sub>ATP</sub>-Kanälen glatter Muskelzellen hervorgerufen worden wäre, hätte dies ebenfalls zu einer Hyperpolarisation der untersuchten Endothelzellen nach wenigen Minuten geführt. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Beeinflussung des Membranpotentials der Endothelzellen durch Hypoxie wäre, dass in den untersuchten Stromgebieten mit Gefäßen kleiner als 100 µm kein Sensor für Hypoxie vorhanden ist, sondern in vorgeschalteten Gebieten, die die Vasodilatation durch Hyperpolarisation des Membranpotentials über elektrotonische Kopplung fortleiten.

Eine weitere Erklärung wäre denkbar, wenn im untersuchten Stromgebiet überwiegend das Connexin 43 (Cx43) an der Bildung der *gap-junctions* beteiligt wäre. Für dieses Connexin ist eine *down-regulation* der Kanalexpression und eine verminderte Passagefähigkeit für ATP unter hypoxischen Bedingungen beschrieben (Faigle *et al.*, 2008). Hypoxie würde hier also zu einer geringeren Aktivierung von K<sub>ATP</sub>-Kanälen unter Hypoxie führen. Allerdings handelt es sich in der Studie nach 48-stündiger Hypoxieexposition eher um einen chronischen Effekt.

Derartige Annahmen sind jedoch rein spekulativ, eine zufriedenstellende Erklärung ist anhand der vorliegenden Daten nicht möglich und bedarf weiterer Untersuchungen zur Klärung der hypoxischen Vasodilatation im untersuchten Stromgebiet.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde am Modell der Dünnschnittpräparation des Meerschweinchenherzens eine gezielte Untersuchung der Widerstandsgefäße des subepikardialen Koronarstromgebietes an Gefäßen kleiner als 100  $\mu\text{m}$  mit der *patch-clamp* Technik zur Untersuchung koronarer Gefäßregulationsmechanismen durchgeführt.

- Es konnten Endothelzellen mit geringem und hohem Membranwiderstand identifiziert werden.
- Zellen mit geringem Membranwiderstand zeigten durchschnittlich ein negativeres Ruhepotential als Zellen mit hohem Membranwiderstand.
- Nur Endothelzellen mit geringem Membranwiderstand zeigten eine Hyperpolarisation auf die Applikation von Acetylcholin.
- Durch Applikation von Glibenclamid konnte eine Depolarisation, durch Diazoxid eine Hyperpolarisation der Endothelzellen mit geringem Membranwiderstand aus Kontrollbedingungen hervorgerufen werden.
- Das Ruhepotential von Endothelzellen mit hohem Membranwiderstand zeigte sich unbeeinflusst durch Diazoxid und Glibenclamid, da auf den untersuchten Endothelzellen der  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal nicht vorkommt.
- Weder durch Anwendung von Lucifer Yellow, noch durch Carboxyfluorescein konnte eine Fortleitung des Farbstoffes in Nachbarzellen nachgewiesen werden.
- 1-Heptanol und 18- $\beta$ -Glycyrrhetinsäure führten zu einer Entkopplung der Endothelzellen und damit zur Verringerung des Membranleitwertes.
- 1-Heptanol führte zu einer dosisabhängigen Inhibition von spannungsabhängigen Auswärtsströmen mit einer  $\text{IC}_{50}$  von  $2,4 \pm 0,27$  mmol/l.
- Durch die Co-Applikation von 18- $\beta$ -Glycyrrhetinsäure mit Acetylcholin konnte eine Hyperpolarisation durch Acetylcholin verhindert werden.
- Weder moderate (20-40 mmHg  $\text{pO}_2$ ) noch schwere Hypoxie (0-20 mmHg  $\text{pO}_2$ ) führte zu einer Veränderung des Ruhepotentials von Endothelzellen.
- Die spannungsabhängigen Auswärtsströme der Endothelzellen konnten weder durch moderate (20-40 mmHg  $\text{pO}_2$ ) noch durch schwere Hypoxie (0-20 mmHg  $\text{pO}_2$ ) beeinflusst werden.

## 6. Summary

In this study regulatory mechanisms of coronary perfusion of subepicardial coronary arterioles with a diameter smaller than 100  $\mu\text{m}$  have been examined in a thin-slice preparation of the guinea-pig heart with *patch-clamp* technique.

- Endothelial cells with low and high membrane resistance were identified.
- Endothelial cells with low membrane resistance showed a more negative resting potential compared to cells with high membrane resistance.
- Only endothelial cells with low membrane resistance were hyperpolarized by acetylcholine.
- Endothelial cells with low membrane resistance under control conditions were depolarized by glibenclamide and hyperpolarized by diazoxide.
- Resting potential of endothelial cells with high membrane resistance was not altered by glibenclamide or diazoxide due to missing expression of  $K_{\text{ATP}}$ -channels in the examined endothelial cells.
- Neither Lucifer Yellow, nor Carboxyfluoresceine showed a distribution of dye into adjacent cells.
- 1-heptanol and 18- $\beta$ -glycyrrhetic acid uncoupled endothelial cells and thereby reduced the membrane conductance.
- 1-heptanol inhibited voltage dependant outward currents of endothelial cells dose-dependent with an  $\text{IC}_{50}$  of  $2.4 \pm 0.27$  mmol/l.
- Co-application of 18- $\beta$ -glycyrrhetic acid and acetylcholine abolished hyperpolarisation by acetylcholine.
- Neither moderate (20-40 mmHg  $\text{pO}_2$ ) nor severe hypoxia (0-20 mmHg  $\text{pO}_2$ ) showed an influence on the resting potential of endothelial cells.
- Voltage dependant outward currents of endothelial cells were not altered by moderate (20-40 mmHg  $\text{pO}_2$ ) or severe hypoxia (0-20 mmHg  $\text{pO}_2$ ).

## 7. Literaturverzeichnis

Aaronson PI, Robertson TP, Knock GA, Becker S, Lewis TH, Snetkov V, & Ward JP (2006). Hypoxic pulmonary vasoconstriction: mechanisms and controversies. *J Physiol* **570**, 53-58.

Akatsuka Y, Egashira K, Katsuda Y, Narishige T, Ueno H, Shimokawa H, & Takeshita A (1994). ATP sensitive potassium channels are involved in adenosine A2 receptor mediated coronary vasodilatation in the dog. *Cardiovasc Res* **28**, 906-911.

Archer SL, Wu XC, Thebaud B, Nsair A, Bonnet S, Tyrrell B, McMurtry MS, Hashimoto K, Harry G, & Michelakis ED (2004). Preferential expression and function of voltage-gated, O<sub>2</sub>-sensitive K<sup>+</sup> channels in resistance pulmonary arteries explains regional heterogeneity in hypoxic pulmonary vasoconstriction: ionic diversity in smooth muscle cells. *Circ Res* **95**, 308-318.

Bao W, Qin P, Needle S, Erickson-Miller CL, Duffy KJ, Ariazi JL, Zhao S, Olzinski AR, Behm DJ, Pipes GT, Jucker BM, Hu E, Lepore JJ, & Willette RN (2010). Chronic Inhibition of Hypoxia-Inducible Factor (HIF) Prolyl 4-Hydroxylase Improves Ventricular Performance, Remodeling and Vascularity Following Myocardial Infarction in the Rat. *J Cardiovasc Pharmacol*.

Barrett JN, Magleby KL, & Pallotta BS (1982). Properties of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J Physiol* **331**, 211-230.

Bastiaanse EM, Jongsma HJ, van der LA, & Takens-Kwak BR (1993). Heptanol-induced decrease in cardiac gap junctional conductance is mediated by a decrease in the fluidity of membranous cholesterol-rich domains. *J Membr Biol* **136**, 135-145.

Bastide B, Herve JC, Cronier L, & Deleze J (1995). Rapid onset and calcium independence of the gap junction uncoupling induced by heptanol in cultured heart cells. *Pflugers Arch* **429**, 386-393.

Beny JL (1990). Endothelial and smooth muscle cells hyperpolarized by bradykinin are not dye coupled. *Am J Physiol* **258**, H836-H841.

Beny JL & Brunet PC (1988). Electrophysiological and mechanical effects of substance P and acetylcholine on rabbit aorta. *J Physiol* **398**, 277-289.

Beny JL & Gribi F (1989). Dye and electrical coupling of endothelial cells in situ. *Tissue Cell* **21**, 797-802.

Berne R (1963). Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol* **204**, 317-322.

Berthoud VM, Ledbetter ML, Hertzberg EL, & Saez JC (1992). Connexin43 in MDCK cells: regulation by a tumor-promoting phorbol ester and Ca<sup>2+</sup>. *Eur J Cell Biol* **57**, 40-50.

Bolton TB, Lang RJ, & Takewaki T (1984). Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *J Physiol* **351**, 549-572.

Brahler S, Kaistha A, Schmidt VJ, Wolfle SE, Busch C, Kaistha BP, Kacik M, Hasenau AL, Grgic I, Si H, Bond CT, Adelman JP, Wulff H, de WC, Hoyer J, & Kohler R (2009). Genetic deficit of SK3 and IK1 channels disrupts the endothelium-derived hyperpolarizing factor vasodilator pathway and causes hypertension. *Circulation* **119**, 2323-2332.

Brink PR, Ramanan SV, & Christ GJ (1996). Human connexin 43 gap junction channel gating: evidence for mode shifts and/or heterogeneity. *Am J Physiol* **271**, C321-C331.

Brink PR, Ricotta J, & Christ GJ (2000). Biophysical characteristics of gap junctions in vascular wall cells: implications for vascular biology and disease. *Braz J Med Biol Res* **33**, 415-422.

Bryan PT & Marshall JM (1999). Cellular mechanisms by which adenosine induces vasodilatation in rat skeletal muscle: significance for systemic hypoxia. *J Physiol* **514**, 163-175.

Buckler KJ, Williams BA, & Honore E (2000). An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J Physiol* **525**, 135-142.

Busse R, Fichtner H, Luckhoff A, & Kohlhardt M (1988). Hyperpolarization and increased free calcium in acetylcholine-stimulated endothelial cells. *Am J Physiol* **255**, H965-H969.

Busse R, Forstermann U, Matsuda H, & Pohl U (1984). The role of prostaglandins in the endothelium-mediated vasodilatory response to hypoxia. *Pflugers Arch* **401**, 77-83.

Cai WJ, Koltai S, Kocsis E, Scholz D, Schaper W, & Schaper J (2001). Connexin37, not Cx40 and Cx43, is induced in vascular smooth muscle cells during coronary arteriogenesis. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 957-967.

Chaytor AT, Bakker LM, Edwards DH, & Griffith TM (2005). Connexin-mimetic peptides dissociate electrotonic EDHF-type signalling via myoendothelial and smooth muscle gap junctions in the rabbit iliac artery. *Br J Pharmacol* **144**, 108-114.

Chen G, Suzuki H, & Weston AH (1988). Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol* **95**, 1165-1174.

Chen GF & Cheung DW (1992). Characterization of acetylcholine-induced membrane hyperpolarization in endothelial cells. *Circ Res* **70**, 257-263.

Christ GJ, Spray DC, el-Sabban M, Moore LK, & Brink PR (1996). Gap junctions in vascular tissues. Evaluating the role of intercellular communication in the modulation of vasomotor tone. *Circ Res* **79**, 631-646.

Clutton-Brock TH, Fink S, Markle D, Luthra AJ, & Hendry SP (1994). The evaluation of a new intravascular blood gas monitoring system in the pig. *J Clin Monit* **10**, 387-391.

Dart C & Standen NB (1995). Activation of ATP-dependent K<sup>+</sup> channels by hypoxia in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery. *J Physiol* **483**, 29-39.

Daut J, Maier-Rudolph W, von BN, Mehrke G, Gunther K, & Goedel-Meinen L (1990). Hypoxic dilation of coronary arteries is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Science* **247**, 1341-1344.

Davidson JS, Baumgarten IM, & Harley EH (1986). Reversible inhibition of intercellular junctional communication by glycyrrhetic acid. *Biochem Biophys Res Commun* **134**, 29-36.

Davis MJ, Meininger GA, & Zawieja DC (1992). Stretch-induced increases in intracellular calcium of isolated vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* **263**, H1292-H1299.

De Mello WC (1983). The role of cAMP and Ca on the modulation of junctional conductance: an integrated hypothesis. *Cell Biol Int Rep* **7**, 1033-1040.

Dietrich HH, Ellsworth ML, Sprague RS, & Dacey RG, Jr. (2000). Red blood cell regulation of microvascular tone through adenosine triphosphate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**, H1294-H1298.

Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, & Weston AH (1998). K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* **396**, 269-272.

Ellsworth ML (2004). Red blood cell-derived ATP as a regulator of skeletal muscle perfusion. *Med Sci Sports Exerc* **36**, 35-41.

Ettorre, G. (2006), Spannungsabhängige Kalium-Kanäle in Endothelzellen in einer Dünnschnittpräparation des linken Ventrikels des Meerschweinchenherzens, S. 1-69, Dissertation, Laufersweiler Verlag, Wettenberg, ISBN 3-8359-5020-7.

Faigle M, Seessle J, Zug S, El Kasmi KC, & Eltzschig HK (2008). ATP release from vascular endothelia occurs across Cx43 hemichannels and is attenuated during hypoxia. *PloS One* **3**, e2801.

Farias M, III, Gorman MW, Savage MV, & Feigl EO (2005). Plasma ATP during exercise: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, H1586-H1590.

Feletou M & Vanhoutte PM (1988). Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol* **93**, 515-524.

Fleming I, Fisslthaler B, Michaelis UR, Kiss L, Popp R, & Busse R (2001). The coronary endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) stimulates multiple signalling pathways and proliferation in vascular cells. *Pflugers Arch* **442**, 511-518.

Fredricks KT, Liu Y, Rusch NJ, & Lombard JH (1994). Role of endothelium and arterial K<sup>+</sup> channels in mediating hypoxic dilation of middle cerebral arteries. *Am J Physiol* **267**, H580-H586.

Frobert O, Mikkelsen EO, Bagger JP, & Gravholt CH (2002). Measurement of interstitial lactate during hypoxia-induced dilatation in isolated pressurised porcine coronary arteries. *J Physiol* **539**, 277-284.

Goddard JC, Behrens UD, Wagner HJ, & Djamgoz MB (1991). Biocytin: intracellular staining, dye-coupling and immunocytochemistry in carp retina. *Neuroreport* **2**, 755-758.

Goto K, Fujii K, Kansui Y, Abe I, & Iida M (2002). Critical role of gap junctions in endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **29**, 595-602.

Gruss, M. (1998), Eigenschaften und Funktionen von BKCa Kanälen in kleinen Hinterwurzelganglienzellen junger Ratten: Untersuchungen in einer dünnen Schnittpräparation, S. 1-100, Dissertation, Justus-Liebig-Universität Giessen, Giessen, ISBN

Guan BC, Si JQ, & Jiang ZG (2007). Blockade of gap junction coupling by glycyrrhetic acids in guinea pig cochlear artery: a whole-cell voltage- and current-clamp study. *Br J Pharmacol* **151**, 1049-1060.

Guan X, Cravatt BF, Ehring GR, Hall JE, Boger DL, Lerner RA, & Gilula NB (1997). The sleep-inducing lipid oleamide deconvolutes gap junction communication and calcium wave transmission in glial cells. *J Cell Biol* **139**, 1785-1792.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, & Sigworth FJ (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* **391**, 85-100.

Harrington LS, Evans RJ, Wray J, Norling L, Swales KE, Vial C, Ali F, Carrier MJ, & Mitchell JA (2007). Purinergic 2X1 receptors mediate endothelial dependent vasodilation to ATP. *Mol Pharmacol* **72**, 1132-1136.

Harris AL (2001). Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q Rev Biophys* **34**, 325-472.

Harris D, Martin PE, Evans WH, Kendall DA, Griffith TM, & Randall MD (2000). Role of gap junctions in endothelium-derived hyperpolarizing factor responses and mechanisms of K(+)-relaxation. *Eur J Pharmacol* **402**, 119-128.

Hashitani H & Suzuki H (1997). K<sup>+</sup> channels which contribute to the acetylcholine-induced hyperpolarization in smooth muscle of the guinea-pig submucosal arteriole. *J Physiol* **501**, 319-329.

Hill CE, Hickey H, & Sandow SL (2000). Role of gap junctions in acetylcholine-induced vasodilation of proximal and distal arteries of the rat mesentery. *J Auton Nerv Syst* **81**, 122-127.

Hirst GD & Neild TO (1978). An analysis of excitatory junctional potentials recorded from arterioles. *J Physiol* **280**, 87-104.

Hodgkin AL & Huxley AF (1952a). A quantitative description of membrane currents and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* **117**, 500-544.

Hodgkin AL & Huxley AF (1952b). The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* **116**, 497-506.

Hodgkin AL & Huxley AF (1952c). The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* **116**, 473-496.

Hodgkin AL & Huxley AF (1952d). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* **116**, 449-472.

Hodgkin AL, Huxley AF, & Katz B (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* **116**, 424-448.

Hoyer J, Kohler R, & Distler A (1997). Mechanosensitive cation channels in aortic endothelium of normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* **30**, 112-119.

Junge D (1991). Lithium block of outward current channels in Helix neurons. *Neurosci Lett* **132**, 82-84.

Kalsner S (1977). The effect of hypoxia on prostaglandin output and on tone in isolated coronary arteries. *Can J Physiol Pharmacol* **55**, 882-887.

Kansui Y, Goto K, Fujii K, Oniki H, Matsumura K, & Iida M (2009). Cilostamide produces hyperpolarization associated with K(ATP) channel activation, but does not augment endothelium-derived hyperpolarization in rat mesenteric arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **36**, 729-733.

Kline DD, Buniel MC, Glazebrook P, Peng YJ, Ramirez-Navarro A, Prabhakar NR, & Kunze DL (2005). Kv1.1 deletion augments the afferent hypoxic chemosensory pathway and respiration. *J Neurosci* **25**, 3389-3399.

Knight GE, Oliver-Redgate R, & Burnstock G (2003). Unusual absence of endothelium-dependent or -independent vasodilatation to purines or pyrimidines in the rat renal artery. *Kidney Int* **64**, 1389-1397.

Kuhberger E, Groschner K, Kukovetz WR, & Brunner F (1994). The role of myoendothelial cell contact in non-nitric oxide-, non-prostanoid-mediated endothelium-dependent relaxation of porcine coronary artery. *Br J Pharmacol* **113**, 1289-1294.

Lewis A, Hartness ME, Chapman CG, Fearon IM, Meadows HJ, Peers C, & Kemp PJ (2001). Recombinant hTASK1 is an O(2)-sensitive K(+) channel. *Biochem Biophys Res Commun* **285**, 1290-1294.

Li X & Simard JM (2001). Connexin45 gap junction channels in rat cerebral vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H1890-H1898.

Little TL, Xia J, & Duling BR (1995). Dye tracers define differential endothelial and smooth muscle coupling patterns within the arteriolar wall. *Circ Res* **76**, 498-504.

Liu Q (1999). Constriction to hypoxia-reoxygenation in isolated mouse coronary arteries: role of endothelium and superoxide. *J Appl Physiol* **87**, 1392-1396.

Luksha L, Agewall S, & Kublickiene K (2009). Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* **202**, 330-344.

Malmjsjo M, Edvinsson L, & Erlinge D (2000). P2X receptors counteract the vasodilatory effects of endothelium derived hyperpolarising factor. *Eur J Pharmacol* **390**, 173-180.

Martell, A. E. and Smith, R. M. (1975), Critical stability constants, S. 416, Plenum Press, New York : ISBN 0-3063-5211-7.

Matchkov VV, Rahman A, Peng H, Nilsson H, & Aalkjaer C (2004). Junctional and nonjunctional effects of heptanol and glycyrrhetic acid derivates in rat mesenteric small arteries. *Br J Pharmacol* **142**, 961-972.

McMurtry IF, Davidson AB, Reeves JT, & Grover RF (1976). Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by calcium antagonists in isolated rat lungs. *Circ Res* **38**, 99-104.

Mehnert H & Karg E (1969). Glibenclamide (HB 419): a new oral antidiabetic of sulphonylurea type. *Ger Med Mon* **14**, 373-377.

Messina EJ, Sun D, Koller A, Wolin MS, & Kaley G (1992). Role of endothelium-derived prostaglandins in hypoxia-elicited arteriolar dilation in rat skeletal muscle. *Circ Res* **71**, 790-796.

Michelakis ED, Rebeyka I, Wu X, Nsair A, Thebaud B, Hashimoto K, Dyck JR, Haromy A, Harry G, Barr A, & Archer SL (2002). O<sub>2</sub> sensing in the human ductus arteriosus: regulation of voltage-gated K<sup>+</sup> channels in smooth muscle cells by a mitochondrial redox sensor. *Circ Res* **91**, 478-486.

Murai T, Muraki K, Imaizumi Y, & Watanabe M (1999). Levchromakalim causes indirect endothelial hyperpolarization via a myo- endothelial pathway. *Br J Pharmacol* **128**, 1491-1496.

Nakhostine N & Lamontagne D (1993). Adenosine contributes to hypoxia-induced vasodilation through ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activation. *Am J Physiol* **265**, H1289-H1293.

Neher E & Sakmann B (1976). Single channel currents recorded from membranes of denervated frog muscle fibers. *Nature* **260**, 799-802.

Osipenko ON, Tate RJ, & Gurney AM (2000). Potential role for kv3.1b channels as oxygen sensors. *Circ Res* **86**, 534-540.

Palmer TE, Cumpston PH, Foster WJ, & Jones RD (1995). Continuous intravascular blood gas analysis during aortic aneurysm repair: the Paratrend 7. *Anaesth Intensive Care* **23**, 200-202.

Peers C (1990). Hypoxic suppression of K<sup>+</sup> currents in type I carotid body cells: selective effect on the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current. *Neurosci Lett* **119**, 253-256.

Peracchia C (1991). Effects of the anesthetics heptanol, halothane and isoflurane on gap junction conductance in crayfish septate axons: a calcium- and hydrogen-independent phenomenon potentiated by caffeine and theophylline, and inhibited by 4-aminopyridine. *J Membr Biol* **121**, 67-78.

Perez-Garcia MT, Colinas O, Miguel-Velado E, Moreno-Dominguez A, & Lopez-Lopez JR (2004). Characterization of the K<sub>v</sub> channels of mouse carotid body chemoreceptor cells and their role in oxygen sensing. *J Physiol* **557**, 457-471.

Pohl U & Busse R (1989). Hypoxia stimulates release of endothelium-derived relaxant factor. *Am J Physiol* **256**, H1595-H1600.

Pohl U, Herlan K, Huang A, & Bassenge E (1991). EDRF-mediated shear-induced dilation opposes myogenic vasoconstriction in small rabbit arteries. *Am J Physiol* **261**, H2016-H2023.

Randall MD, Alexander SP, Bennett T, Boyd EA, Fry JR, Gardiner SM, Kemp PA, McCulloch AI, & Kendall DA (1996). An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochem Biophys Res Commun* **229**, 114-120.

Ray CJ, Abbas MR, Coney AM, & Marshall JM (2002). Interactions of adenosine, prostaglandins and nitric oxide in hypoxia-induced vasodilatation: in vivo and in vitro studies. *J Physiol* **544**, 195-209.

Rhinehart K, Zhang Z, & Pallone TL (2002). Ca<sup>2+</sup> signaling and membrane potential in descending vasa recta pericytes and endothelia. *Am J Physiol Renal Physiol* **283**, F852-F860.

Robinson SR, Hampson EC, Munro MN, & Vaney DI (1993). Unidirectional coupling of gap junctions between neuroglia. *Science* **262**, 1072-1074.

Rubin A, Roth F, Taylor R, & Rosenkilde H (1962). Pharmacology of diazoxide, an antihypertensive, nondiuretic benzothiadiazine. *J Pharmacol Exp Ther* **136**, 344-352.

Sainsbury CA, Coleman J, Brady AJ, Connell JM, Hillier C, & Petrie JR (2007). Endothelium-dependent relaxation is resistant to inhibition of nitric oxide synthesis, but sensitive to blockade of calcium-activated potassium channels in essential hypertension. *J Hum Hypertens* **21**, 808-814.

Sanchez D, Lopez-Lopez JR, Perez-Garcia MT, Sanz-Alfayate G, Obeso A, Ganfornina MD, & Gonzalez C (2002). Molecular identification of K $\alpha$  subunits that contribute to the oxygen-sensitive K<sup>+</sup> current of chemoreceptor cells of the rabbit carotid body. *J Physiol* **542**, 369-382.

Schnitzler MM, Derst C, Daut J, & Preisig-Muller R (2000). ATP-sensitive potassium channels in capillaries isolated from guinea-pig heart. *J Physiol* **525**, 307-317.

Segal SS & Beny JL (1992). Intracellular recording and dye transfer in arterioles during blood flow control. *Am J Physiol* **263**, H1-H7.

Segal SS, Damon DN, & Duling BR (1989). Propagation of vasomotor responses coordinates arteriolar resistances. *Am J Physiol* **256**, H832-H837.

Shimizu S, Bowman PS, Thorne G, III, & Paul RJ (2000). Effects of hypoxia on isometric force, intracellular Ca(2+), pH, and energetics in porcine coronary artery. *Circ Res* **86**, 862-870.

Shimokawa H & Morikawa K (2005). Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Mol Cell Cardiol* **39**, 725-732.

Siegl D, Koeppen M, Wolfle S, Pohl U, & de Wit C (2005). Myoendothelial Coupling Is Not Prominent in Arterioles Within the Mouse Cremaster Microcirculation In Vivo. *Circ Res* **97**, 781-788.

Simpson I, Rose B, & Loewenstein WR (1977). Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels. *Science* **195**, 294-296.

Smani T, Hernandez A, Urena J, Castellano AG, Franco-Obregon A, Ordonez A, & Lopez-Barneo J (2002). Reduction of Ca(2+) channel activity by hypoxia in human and porcine coronary myocytes. *Cardiovasc Res* **53**, 97-104.

Sohl G & Willecke K (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* **62**, 228-232.

Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, & Nelson MT (1989). Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle. *Science* **245**, 177-180.

Statistisches Bundesamt. Anzahl der Gestorbenen nach Kapiteln der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10). <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content75/GestorbeneAnzahl,templateId=renderPrint.psml>, 2007, Stand 24-1-2010

Stewart WW (1978). Functional connections between cells as revealed by dye-coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer. *Cell* **14**, 741-759.

Stewart WW (1981). Lucifer dyes--highly fluorescent dyes for biological tracing. *Nature* **292**, 17-21.

Suarez S & Ballmer-Hofer K (2001). VEGF transiently disrupts gap junctional communication in endothelial cells. *J Cell Sci* **114**, 1229-1235.

Swietach P, Rossini A, Spitzer KW, & Vaughan-Jones RD (2007). H<sup>+</sup> ion activation and inactivation of the ventricular gap junction: a basis for spatial regulation of intracellular pH. *Circ Res* **100**, 1045-1054.

Szigligeti P, Neumeier L, Duke E, Chougnat C, Takimoto K, Lee SM, Filipovich AH, & Conforti L (2006). Signalling during hypoxia in human T lymphocytes--critical role of the src protein tyrosine kinase p56Lck in the O<sub>2</sub> sensitivity of Kv1.3 channels. *J Physiol* **573**, 357-370.

Takens-Kwak BR, Jongasma HJ, Rook MB, & van Ginneken AC (1992). Mechanism of heptanol-induced uncoupling of cardiac gap junctions: a perforated patch-clamp study. *Am J Physiol* **262**, C1531-C1538.

Tintu A, Rouwet E, Verlohren S, Brinkmann J, Ahmad S, Crispi F, van Bilsen M, Carmeliet P, Staff AC, Tjwa M, Cetin I, Gratacos E, Hernandez-Andrade E, Hofstra L, Jacobs M, Lamers WH, Morano I, Safak E, Ahmed A, & le Noble F (2009). Hypoxia induces dilated cardiomyopathy in the chick embryo: mechanism, intervention, and long-term consequences. *PloS One* **4**, e5155.

Tristani-Firouzi M, Reeve HL, Tolarova S, Weir EK, & Archer SL (1996). Oxygen-induced constriction of rabbit ductus arteriosus occurs via inhibition of a 4-aminopyridine-, voltage-sensitive potassium channel. *J Clin Invest* **98**, 1959-1965.

Umeda F, Masakado M, Takei A, Yamauchi T, Sekiguchi N, Hashimoto T, & Nawata H (1997). Difference in serum-induced prostacyclin production by cultured aortic and capillary endothelial cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **56**, 51-55.

Vaney DI (1991). Many diverse types of retinal neurons show tracer coupling when injected with biocytin or Neurobiotin. *Neurosci Lett* **125**, 187-190.

Vedernikov YP, Graser T, & Li DS (1990). Hypoxic and posthypoxic responses in isolated coronary arteries and veins: role of endothelium. *Biomed Biochim Acta* **49**, 1177-1184.

Vedernikov YP & Hellstrand P (1989). Effects of reduced oxygen tension on endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine differ in rabbit femoral artery and jugular vein. *Acta Physiol Scand* **135**, 343-348.

von Beckerath N, Cyrys S, Dischner A, & Daut J (1991). Hypoxic vasodilatation in isolated, perfused guinea-pig heart: an analysis of the underlying mechanisms. *J Physiol* **442**, 297-319.

Weir EK, Lopez-Barneo J, Buckler KJ, & Archer SL (2005). Acute Oxygen-Sensing Mechanisms. *N Engl J Med* **353**, 2042-2055.

Weston AH, Porter EL, Harno E, & Edwards G (2010). Impairment of endothelial SK(Ca) channels and of downstream hyperpolarizing pathways in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* **160**, 836-843.

White R & Hiley CR (2000). Hyperpolarisation of rat mesenteric endothelial cells by ATP-sensitive K(+) channel openers. *Eur J Pharmacol* **397**, 279-290.

Yamakawa N, Ohhashi M, Waga S, & Itoh T (1997). Role of endothelium in regulation of smooth muscle membrane potential and tone in the rabbit middle cerebral artery. *Br J Pharmacol* **121**, 1315-1322.

Yamamoto Y, Fukuta H, Nakahira Y, & Suzuki H (1998). Blockade by 18beta-glycyrrhetic acid of intercellular electrical coupling in guinea-pig arterioles. *J Physiol* **511**, 501-508.

Yao X, Kwan HY, Dora KA, Garland CJ, & Huang Y (2003). A mechanosensitive cation channel in endothelial cells and its role in vasoregulation. *Biorheology* **40**, 23-30.

Zhang Q, Cao C, Mangano M, Zhang Z, Silldorff EP, Lee-Kwon W, Payne K, & Pallone TL (2006). Descending vasa recta endothelium is an electrical syncytium. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291**, R1688-R1699.

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Präparation des Meerschweinchenherzens.....	16
Abbildung 2: Perfusion des isolierten Herzens mit PSL.....	17
Abbildung 3: Herstellung der Gewebedünnschnitte .....	18
Abbildung 4: Schaltkreis eines <i>voltage-clamp</i> -Aufbaus (Gruss, 1998).....	27
Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Versuchsstandes (Gruss, 1998) .....	30
Abbildung 6: Der Paratrend 7+ Satellite-Monitor.....	34
Abbildung 7: Die Messsonde des Paratrend 7+ .....	35
Abbildung 8: Strom-Spannungs-Rampen in zwei verschiedener Endothelzelltypen .....	37
Abbildung 9: Verteilung der Ruhepotentiale der Zelltypen I und II.....	38
Abbildung 10 Hyperpolarisation einer Typ II-Endothelzelle durch 10 $\mu$ M ACh.....	39
Abbildung 11: Depolarisation einer Typ II-Endothelzelle durch Glibenclamid.....	40
Abbildung 12: Hyperpolarisation einer Typ II-Endothelzelle durch Diazoxid.....	41
Abbildung 13: Darstellung von Endothelzellen mit Carboxyfluorescein und LY.....	42
Abbildung 14: Zellentkopplung durch 1-Heptanol und 18-GA.....	43
Abbildung 15: Entkopplung einer Endothelzelle durch Ein- und Auswasch von Heptanol....	43
Abbildung 16: Blockade von Auswärtsströmen von Typ I-Endothelzellen durch 1-Heptanol	45
Abbildung 17: Dosis-Wirkungskurve von 1-Heptanol .....	46
Abbildung 18: Hyperpolarisation durch ACh und Depolarisation durch Zellentkopplung.....	47
Abbildung 19: endotheliale Ruhepotentiale von Typ II-Endothelzellen unter Hypoxie .....	48
Abbildung 20: Ruhepotetnial unter lang anhaltender Hypoxie.....	49
Abbildung 21: Strom-Spannungs-Beziehung unter schwerer Hypoxie .....	50
Abbildung 22: Zusammenfassung von Strom-Spannungsbeziehungen unter Hypoxie.....	51

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**

## 10. Danksagung

Hiermit möchte ich von ganzem Herzen meinem Betreuer und Doktorvater PD Dr. Andreas Scholz, der mir während der gesamten Zeit, die zur Erarbeitung dieser Arbeit notwendig war, ein guter Mentor, Lehrer und Freund war. Ohne seinen Enthusiasmus für solides wissenschaftliches Arbeiten wären die Durststrecken, die es während jeder experimentellen Phase einer Dissertationsarbeit gibt, sicherlich trockener ausgefallen. Sein umfassendes Wissen war mir immer Ansporn und Quelle für neue Ideen und Erkenntnisse. Ich bedauere sehr, dass seine international angesehenen Arbeitsgruppe weichen musste und damit seine guten Einfälle, sein Verständnis für physiologische Vorgänge und seine außerordentlich gute Lehre der forschenden Gesellschaft und der Studentenschaft verloren gegangen sind.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Freund und Kollegen Giovanni Ettore, der mich auf meinem Weg in die Wissenschaft begleitet hat und mir die Methodik der Elektrophysiologie beigebracht hat. Er stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Weiterhin möchte ich allen übrigen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe danken, die diese Arbeit ermöglicht haben. Vor allem bei Brigitte Agari unserer MTA, und Otto Becker unserem weltbesten Feinmechaniker, möchte ich mich besonders bedanken.

Mein allergrößter Dank gilt jedoch meiner Familie, ganz besonders meiner Mutter Helga und meinem Vater Horst, der die Fertigstellung dieser Arbeit leider nicht mehr erleben durfte. Durch ihre Aufopferung haben sie meine Ausbildung, mein Studium und diese Arbeit unterstützt und ermöglicht.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Verlobten Julia Martin, meinem treuestem Fan im Sport und im wahren Leben, für ihre Nachsicht bedanken, die durch ihren Verzicht auf gemeinsame Stunden diese Arbeit erst ermöglicht hat.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5699-5

