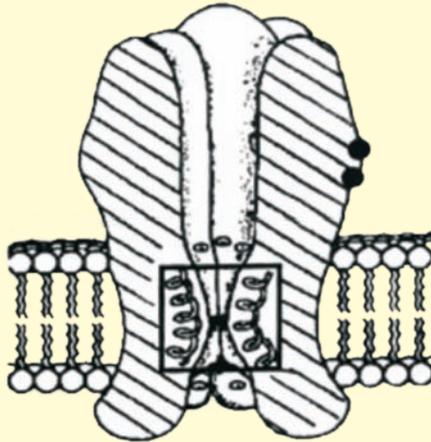


Expression und Funktion von nikotinischen
Azetylcholinrezeptoruntereinheiten in der
Arteria uterina der Ratte

CHRISTINE RETTIG



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin 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 2011

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.

1st Edition 2011

© 2011 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

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie
der Groß- und Kleintiere mit tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. A. Wehrend

und

aus der Frauenklinik des Universitätsklinikums Gießen und Marburg
Standort Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. H.-R. Tinneberg

Expression und Funktion von nikotinischen Azetylcholinrezeptoruntereinheiten in der Arteria uterina der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von Christine Rettig
Tierärztin aus Düsseldorf

Gießen 2011

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M.. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. A. Wehrend
Prof. Dr. Dr. h.c. H.-R. Tinneberg

Tag der Disputation: 22.03.2011

gewidmet Nele und Thomas,
die immer für diejenigen da sind,
die ihre Hilfe benötigen

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Azetylcholinrezeptoren	2
1.1.1 Struktur	3
1.1.2. Agonisten und Antagonisten am nAChR	8
1.2 Cholinerge Systeme	8
1.2.1. in neuronalen Geweben	11
1.2.2. in non-neuronalen Geweben	13
1.2.3. in der Blutgefäßwand	16
1.3. Klinische Relevanz des Themas	18
2. Fragestellung	20
3. Material und Methoden	22
3.1.1. Versuchstiere	22
3.1.2. Entnahme und Vorbereitung der Gefäße	22
3.1.3. Aufbau des Systems	23
3.2. Reagenzien und Lösungen	25
3.3. Durchführung	26
3.4. Versuchsaufbau	28
3.5. statistische Auswertung	29

Inhalt

4. Ergebnisse	31
4.1. Applikation von Nikotin an der A. uterina von nicht-trächtigen Ratten	31
4.2. Applikation von Nikotin an der A. uterina von frühträchtigen Ratten	32
4.3. Applikation von Nikotin an der A. uterina von spätträchtigen Ratten	33
4.4. Applikation von Hexamethonium und EC50 Nikotin an der A. uterina von nicht-trächtigen Ratten	34
4.5. Applikation von Metylycaconitin und EC50 Nikotin an der A. uterina von nicht-trächtigen Ratten	35
4.6. Applikation von Dihydro- β -Erythroidin und EC50 Nikotin an der A. uterina von nicht-trächtigen Ratten	36
4.7. Applikation von Nikotin an der A. uterina von nicht-trächtigen Ratten im Ca-freien Medium	37
5. Diskussion	38
5.1. Diskussion von Material und Methoden	39
5.1.1. Wahl des Versuchsmodells	39
5.1.2. Allgemeiner Versuchsaufbau im Arteriographen	40
5.1.3. Methode der Deendothelierung	40
5.1.4. Weitere funktionelle Versuche in der Zukunft	41
5.1.5. Weitere morphologische Versuche in der Zukunft	42
5.2. Diskussion der Ergebnisse	42
5.2.1. Effekt von Nikotin an der A. uterina	42
5.2.2. Einfluss der Hormonlage auf die Kontraktion	42
5.2.3. Einfluss einer Gravidität auf die Kontraktion	42
5.2.4. funktionelle Beteiligung von nAChR	43
5.2.5. Lokale Wirkung von Nikotin im Gefäß	45
5.2.5.1. Nikotin als cholinerges Agonist beeinflusst cholinerge Systeme	46
5.2.5.2. Nikotin wirkt an EC	46
5.2.5.3. Nikotin wirkt an VSMC	48
5.2.5.4. Nikotinwirkung an präterminalen Nervenendigungen	49
5.2.5.5. Weitere Auswirkungen von Nikotin am Gefäß	49
5.2.6. Einfluss von Ca ²⁺ auf die Nikotin induzierte Vasokonstriktion	50
5.3. Klinische Bedeutung der Ergebnisse	51
5.4. Ausblick	53

Inhalt

6. Zusammenfassung	55
7. Literaturverzeichnis	57
8. Anhang	84
8.1. Weiterführende Tabellen	84
8.2. Versuchsdaten	86
8.3. Erklärung	92
8.4. Danksagung	93
8.5. Lebenslauf	94

Abkürzungsverzeichnis:

A.	Arteria
ACh	Azetylcholin
AChE	Azetylcholinesterase
AChR	Azetylcholinrezeptor
AS	Aminosäure
BChE	Butyrylcholinesterase
CarAT	Carnitine Azetyltransferase
ChAT	Cholin Azetyltransferase
CHT	Cholin Transporter
cCHT	common-type Cholin Transporter
pCHT	peripherer Cholin Transporter
CTL	Cholin-Transport like Transporter
DH β E	Dihydro- β -Erythroidin
EC ₅₀	Konzentration bei der 50% der maximalen Antwort erreicht wird
EC	Endothelzellen
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthetase
FS	früh trächtig
HEX	Hexamethonium
mAChR	muskarinischer Azetylcholinrezeptor
MCC	Metyllycaconitin
mnAChR	muskulärer nikotinischer Azetylcholinrezeptor
ME	mit Endothel -> endothelintakt
MEM	Minium Essential Medium Lösung
nAChR	nikotinischer Azetylcholinrezeptor
nnAChR	neuronaler nikotinischer Azetylcholinrezeptor
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid Synthetase
NS	nicht trächtig
OCT	organische Kationen Transporter
OE	ohne Endothel -> endotheldenudiert
PBS	Phosphate-Buffered Saline Lösung
ROS	reaktive Sauerstoffspezies

Inhalt

RT-PCR	quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion
SS	spät trchtig
TM	transmembranäre Domäne
TTX	Tetradotoxin
UA	A. uterina
VACHT	vesikulärer Azetylcholin Transporter
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
VSMC	glatte Muskelzellen am Gefäß

Abbildungsverzeichnis:

- Abb. 1: Strukturformel des Nikotins
- Abb. 2: Strukturformel des Azetylcholins
- Abb. 3: Struktur des neuronalen nikotinischen Azetylcholinerezeptor
- Abb. 4: Longitudinaler Schnitt durch einen neuronalen nAChR
- Abb. 5: ACh-Bindungsstelle zwischen zwei benachbarten Untereinheiten
- Abb. 6: Schematische Darstellung der cholinergen Nervenendigung
- Abb. 7: ACh-Kreislauf, Synthese, Freisetzung, Wirkung und Inaktivierung an der nicht- neuronalen Zelle
- Abb. 8: schematische Darstellung des apparativen Aufbaus
- Abb. 9: Foto einer Arterie im Artheriographensystem
- Abb. 10: Versuchsaufbau
- Abb. 11: Dosiswirkungskurve der Nikotinapplikation an der endothelintakten (ME) und endotheldenudierten (OE) A. uterina (UA) von nicht-trächtigen Ratten (NS)
- Abb. 12: Dosiswirkungskurve der Nikotinapplikation an der endothelintakten (ME) und endotheldenudierten (OE) A. uterina (UA) von frühträchtigen Ratten (FS)
- Abb. 13: Dosiswirkungskurve der Nikotinapplikation an der endothelintakten (ME) und endotheldenudierten (OE) A. uterina (UA) von spätträchtigen Ratten (SS)
- Abb. 14: Dosiswirkungskurve der Hexamethonium + EC₅₀ Nikotin Applikation an der endothelintakten (ME) und endotheldenudierten (OE) A. uterina (UA) von nicht-trächtigen Ratten (NS)
- Abb. 15: Dosiswirkungskurve der Methyllycaconitine + EC₅₀ Nikotin Applikation an der endothelintakten (ME) und endotheldenudierten (OE) A. uterina (UA) von nicht-trächtigen Ratten (NS)
- Abb. 16: Dosiswirkungskurve der Dihydro-β-Erythroidin + EC₅₀ Nikotin Applikation an der endothelintakten (ME) und endotheldenudierten (OE) A. uterina (UA) von nicht-trächtigen Ratten (NS)
- Abb. 17: Dosiswirkungskurve der Nikotinapplikation an der endothelintakten (ME) und endotheldenudierten (OE) A. uterina (UA) von nicht-trächtigen Ratten (NS) im Ca-freien Medium (PBS)

Tabellenverzeichnis:

Tab. 1: Unterschied zwischen neuronalen und nicht-neuronalen cholinergen Systemen

Tab.2: Mögliche Kombination der AChR-Untereinheiten

Konstriktion bei Applikation der aufgeführten Nikotin-Konzentrationen c_1 - c_6 an der

Tab. 3: endothelintakten A. uterina von nicht-trächtigen Ratten

Tab. 4: endotheldenudierten A. uterina von nicht-trächtigen Ratten

Tab. 5: endothelintakten A. uterina von spät trächtigen Ratten

Tab. 6: endotheldenudierten A. uterina von späträchtigen Ratten

Tab. 7: endothelintakten A. uterina von frühträchtigen Ratten

Tab. 8: endotheldenudierten A. uterina von frühträchtigen Ratten

Tab. 9: endothelintakten A. uterina von nicht-trächtigen Ratten im Ca^{+} -freien Medium (PBS)

Tab. 10: endotheldenudierten A. uterina von nicht-trächtigen Ratten im Ca^{+} -freien Medium (PBS)

Dilatation bei Applikation der aufgeführten Blocker-Konzentrationen c_1 - c_4 gemeinsam mit der errechneten EC50 Nikotin-Konzentration in Bezug auf die zuvor applizierten alleinigen EC50 Nikotin-Konzentration bei der nicht-trächtigen Ratte durch

Tab. 11: Metylycaconitin an der endothelintakten A. uterina

Tab. 12: Metylycaconitin an der endotheldenudierten A. uterina

Tab. 13: Dihydro- β -Erythroidin an der endothelintakten A. uterina

Tab. 14: Dihydro- β -Erythroidin an der endotheldenudierten A. uterina

Tab. 15: Hexamethonium an der endothelintakten A. uterina

Tab. 16: Hexamethonium an der endotheldenudierten A. uterina

Inhalt

Konstriktion bei Applikation der aufgeführten Blocker-Konzentrationen c_1 - c_4 gemeinsam mit der errechneten EC50 Nikotin-Konzentration in Bezug auf die zuvor applizierten alleinigen EC50 Nikotin-Konzentration bei der nicht-trächtigen Ratte durch

Tab. 17: Metylycaconitin an der endothelintakten A. uterina

Tab. 18: Metylycaconitin an der endotheldenudierten A. uterina

Tab. 19: Dihydro- β -Erythroidin an der endothelintakten A. uterina

Tab. 20: Dihydro- β -Erythroidin an der endotheldenudierten A. uterina

Tab. 21: Hexamethonium an der endothelintakten A. uterina

Tab. 22: Hexamethonium an der endotheldenudierten A. uterina

1. Einleitung

„Jeder Frau ist dringend zu empfehlen, das Rauchen während der Schwangerschaft so früh wie nur möglich einzustellen“, rät die amerikanische Neurowissenschaftlerin Lise Eliot in ihrem Buch „Was geht da drinnen vor?“ (Eliot und Schaden 2003). Klinische Studien ergaben, dass Rauchen während der Schwangerschaft zu vielzähligen negativen Effekten für Mutter und Kind führen kann. Es steht u. a. mit einem erhöhten Risiko für Fehlgeburten (Windham et al. 1999) sowie mit einem reduzierten fetalen Wachstum und Geburtsgewicht (Figueras 2007, Mitchell et al. 2002) im Zusammenhang. Krishna (1978) zeigte, dass bei Tabak kauenden Müttern ebenfalls ein Anstieg des Risikos für Fehlgeburten sowie eine Reduktion des Geburtsgewichtes nachzuweisen ist. Daraus schließen Lambers und Clark (1996), dass Nikotin vermutlich der Hauptfaktor der schädlichen Wirkung des Zigarettenkonsums ist, da in der oben genannten Studie keine anderen Substanzen des Zigarettenrauchs (z.B. Kohlenmonoxid) zusätzlich aufgenommen wurden.

Nikotin ist ein Alkaloid, das vorwiegend in der Tabakpflanze und in geringerer Konzentration auch in anderen Nachtschattengewächsen vorkommt. Es ist zum ersten Mal vom französischen Chemiker Nicholas-Louis Vauquelin 1809 isoliert worden (Changeux und Edelstein 2006).

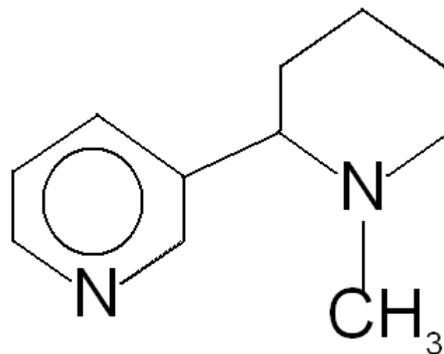


Abb. 1: Strukturformel des Nikotins

Nikotin wirkt im menschlichen Körper als Agonist am nikotinischen Azetylcholinrezeptor (nAChR). Es führt bei geringer Dosis zu einer Erregung der nAChR, während höhere Dosen eine Dauerdepolarisierung dieser Rezeptoren verursachen (Burgis 2008).

1.1. Azetylcholinrezeptoren

Azetylcholin (ACh) ist ein phylogenetisch sehr altes Molekül, das sowohl in eu- als auch in prokariotischen Zellen weit verbreitet ist (Wessler et al. 1999). Hier wirkt es als Neurotransmitter und stimuliert als physiologischer Agonist membranständige Azetylcholinrezeptoren.

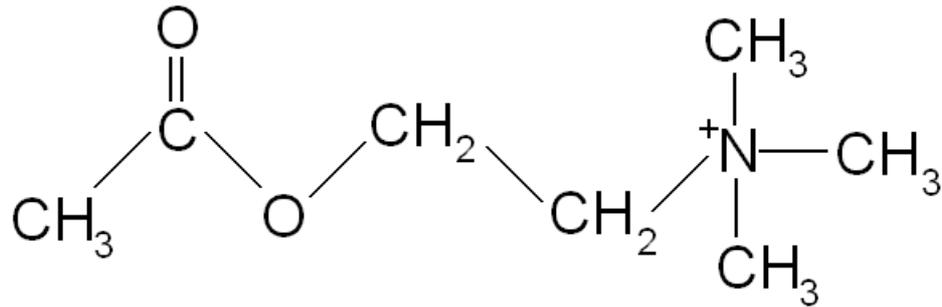


Abb. 2: Strukturformel des Azetylcholins

Dale (1914) zeigte, dass es zwei verschiedene Gruppen von Azetylcholinrezeptoren gibt: Die muskarinischen (mAChR) und nikotinischen Azetylcholinrezeptoren (nAChR). Die **mAChR** sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die durch Atropin desensibilisiert werden können, während es sich bei den **nAChR** um Liganden gesteuerte Ionenkanäle handelt, deren Funktion durch Nikotin verändert werden kann (Dale 1914, Le Novère und Changeux 1995).

Der **nAChR** zählt zur Gruppe der ionotropen Rezeptoren, zu der auch Serotonin-, GABA_A-, GABA_C- und Glycin-Rezeptoren gehören. Sie sind für eine schnelle Informationstransmission verantwortlich, indem sie durch einen Ioneneinstrom das Zellmembranpotential verändern. Neben dem physiologischen Agonist ACh bilden sie Zielrezeptoren vieler pharmakologischer Substanzen wie z.B. Nikotin oder Curare. Ferner sind sie an verschiedenen Krankheitsgeschehen beteiligt wie z.B. an Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Schizophrenie, Depression und Schmerzzuständen (Changeux und Taly 2008).

Es sind zwei verschiedene Typen des nikotinischen AChR bekannt: der muskuläre Typ in der Skelettmuskulatur sowie der neuronale Typ. Der neuronale Typ kommt sowohl im peripheren und zentralen Nervensystem (Gay und Yakel 2007, Kalamida et al. 2007), als auch in non-neuronalen Geweben vor, wie z.B. in Lungengefäßen, Epidermis, Epithel der Luftwege und

Einleitung

des Darms, Pleura und Epithel von Mund- und Vaginalschleimhaut und Blutgefäßen (Wessler et al. 1998, Klapproth et al. 1997, Brüggmann et al. 2002).

1.1.1. Struktur

Der **nikotinische** Azetylcholinrezeptor besteht aus fünf homologen Proteinuntereinheiten (α -, β -, γ - und δ -Untereinheiten), die einen zentralen Kanal einschließen. Der **muskuläre** AChR (mnAChR) setzt sich stöchiometrisch aus $\alpha_2\beta\gamma\delta$ Untereinheiten zusammen (Changeux und Edelstein 2006). Während der Embryogenese wird in muskulären Rezeptoren von höheren Wirbeltieren die im Embryo vorhandene γ -Untereinheit gegen eine ε -Untereinheit im adulten Organismus ausgetauscht (Witzemann et al. 1989). Dabei ist die γ -Untereinheit als Regulator in der Entwicklung der Synapsen zuständig (Yampolsky et al. 2008).

Der **neuronale** nAChR (nnAChR) besteht entweder als Hetero- oder als Homopentamer aus α - und β -Untereinheiten (Brejc et al. 2001). Als Homopentamere bezeichnet man Rezeptoren, die sich aus fünf gleichen Untereinheiten (z.B. α) zusammensetzen, wobei Heteropentamere aus α - und β -Untereinheiten gebildet werden. Zwölf neuronale nAChR Untereinheiten konnten bei Wirbeltieren identifiziert werden - α_2 bis α_{10} und β_2 bis β_4 . Sie werden alle – mit Ausnahme der α_8 -Untereinheit, die nur im Huhn vorkommt – in Säugetiergewebe exprimiert (Lindstrom 2000, Gotti und Clementi 2004). α_7 , α_8 und α_9 können Homopentamere bilden, während α_2 , α_3 , α_4 , α_5 , α_6 und α_{10} nur in Gegenwart von anderen α - oder β -Untereinheiten funktionsfähige Rezeptoren bilden können (Kalamadi et al. 2007, Barrera et al 2008). Bei diesen Heteropentameren können Heterodimere, die wie der $\alpha_4\beta_2$ -nAChR aus zwei verschiedenen α -/ β -Untereinheiten gebildet werden, von Heterotrimeren unterschieden werden, (Nelson et al. 2003, Wu et al. 2006). Ein Beispiel dafür sind $\alpha_3\alpha_5\beta_2$ - oder $\alpha_3\alpha_5\beta_4$ -nAChR, die aus drei verschiedenen Untereinheitentypen zusammengesetzt sind (Maus et al. 1998).

Proteinfineinstruktur jeder Untereinheit

Jede Untereinheit nikotinscher AChRs setzt sich aus 450 bis maximal 700 Aminosäuren (AS) zusammen. Zwischen den Untereinheiten zeigen sie innerhalb derselben Spezies eine 60-prozentige Sequenzhomologie, die v.a. die in den Ionenkanal einbezogenen Regionen betrifft (Boulter et al. 1990). Dieser ähnliche Aufbau untermauert den gemeinsamen evolutionären Ursprung (Brejc et al. 2001).

Einleitung

Folgende Abschnitte können in jeder nAChR-Untereinheit unterschieden werden (siehe Abb. 3):

- eine große **N-terminale extrazelluläre** Domäne von ungefähr 220 Aminosäuren (AS)
- vier **transmembranäre** Sequenzen, benannt TM1 bis TM4, wobei die ersten drei ca. 90 AS umfassen und die vierte weitere 20 AS beinhaltet
- eine große **zytoplasmatische** Schleife von 120 bis 140 AS die zwischen TM3 und TM4 ins Zellinnere ragt
- und eine kurze **C-terminale extrazelluläre** Sequenz von 10-20 AS (Williams et al. 1998, Lindstrom 2000, Kalamida et al. 2007).

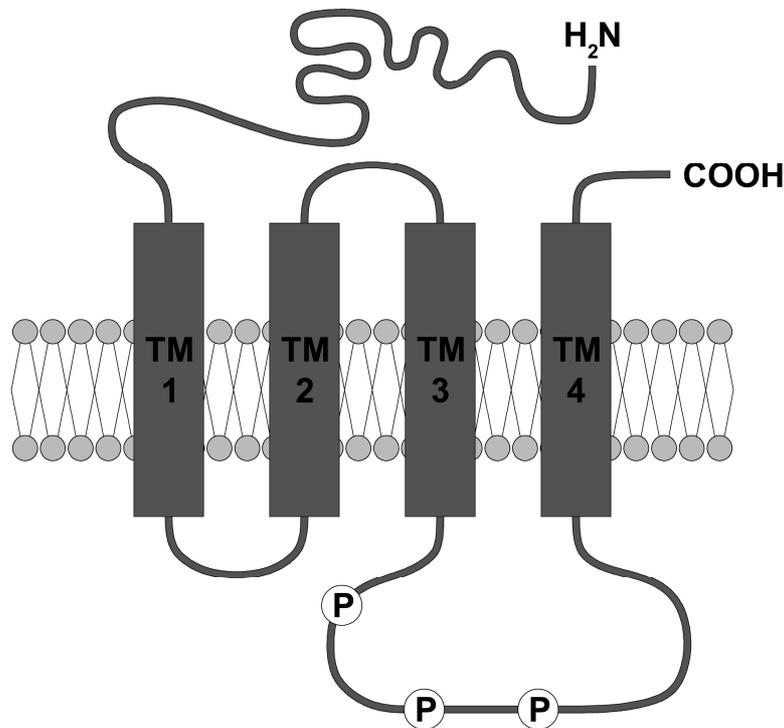


Abb. 3: Proteinfeinstruktur der Untereinheit in einem neuronalen nikotinischen Azetylcholinrezeptor (aus Buisson et al. 2000)

TM1 - TM4 stellen die transmembranären Sequenzen dar, die durch die Lipide der Zellmembran hindurch reichen. Der untere Teil der Abbildung zeigt den zytoplasmatischen Anteil des Rezeptors, während der obere Teil mit dem C-terminalen und N-terminalen Ende den extrazellulären Anteil veranschaulicht.

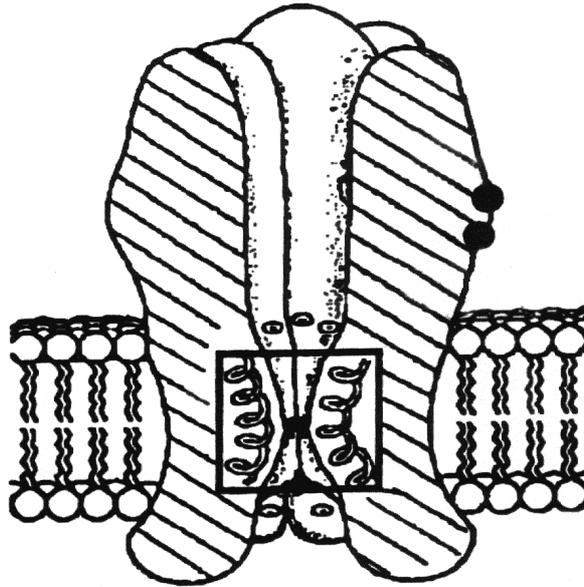


Abb. 4: Longitudinaler Schnitt durch einen neuronalen nAChR (modifiziert nach Unwin 1993).

Der mittig dargestellte Rezeptor besteht aus einem - im oberen Teil der Abbildung dargestellten - extrazellulären Anteil sowie dem intrazellulären Part im unteren Bildbereich. Die Bindungsstelle für ACh wurde mit zwei schwarzen Punkten markiert. Im vergrößerten Teil der Abbildung ist die α -helikale Proteinstruktur des Rezeptors dargestellt.

Aufbau des Gesamtrezeptors

Der AChR bildet einen 62 Å hohen Zylinder mit einem Diameter von 80 Å. Die fünf den AChR aufbauenden Untereinheiten besitzen alle ungefähr die gleiche Größe (maximale Ausdehnung 30Å x 40Å x 160Å) und die gleiche dreidimensionale Struktur (Unwin 2005). Sie setzen sich aus 450 bis maximal 700 Aminosäuren zusammen, die α -helikal angeordnet sind (Miyazawa et al. 2003). Der zentral gelegene **Ionenkanal** des nAChR ist sanduhrförmig und besitzt einen durchschnittlichen Diameter von 18 Å (Brejc et al. 2001). Die Form der Pore wird durch einen inneren Ring, bestehend aus den TM2-Domänen aller Untereinheiten, gebildet, dessen AS α -helikal angeordnet sind. Die Domänen TM1, 3 und 4 schirmen diesen inneren Ring gegen die Lipide der Zellmembran ab (Unwin 2005). Der Kanal des AChR verengt sich vom extrazellulären zum zytoplasmatischen Ende (Lindstrom 2000). Die engste Stelle der Pore befindet sich in der transmembranären Region, wo sie im geschlossenen Zustand ca. 3 Å an der engsten Stelle misst. Sie bleibt daher für ein gelöstes Natrium⁺ Ion mit einem Radius von ca. 4 Å impermeabel (Amiri et al. 2005).

Die von den Aminosäureketten der Untereinheiten gebildeten Helices sind auf der **extrazellulären Seite** der Membran auseinandergespreizt und ermöglichen so Ionen auch von

Einleitung

lateral in die Pore einzudringen, indem sie den normalen Weg durch die äußere Öffnung umgehen. Die größten dieser Öffnungen befinden sich zwischen den Untereinheiten und dehnen sich bis in die Ligandenbindungsstelle aus (Miyazawa et al. 2003). Unwin zeigte ebenfalls, dass sich zwischen den Untereinheiten Spalten befinden, die eine maximale Größe von 8 Å aufweisen, was groß genug ist um ein Natrium- oder Kalium-Ion passieren zu lassen (Unwin 2005).

Die **taschenartige ACh-Bindungsstelle** befindet sich auf der extrazellulären Seite des Rezeptors (markiert durch zwei schwarze Punkte). Jede Liganden-Bindungsstelle befindet sich in einem Spalt, der aus mehreren AS-Schleifen von zwei angrenzenden Untereinheiten (siehe Abb. 5) gebildet wird. Der Hauptteil entsteht durch Schleife A, Schleife B und Schleife C einer Untereinheit (spezifisch für die α -Untereinheiten), während die angrenzende Untereinheit ebenfalls AS-Schleifen bildet (Brejc et al. 2001).

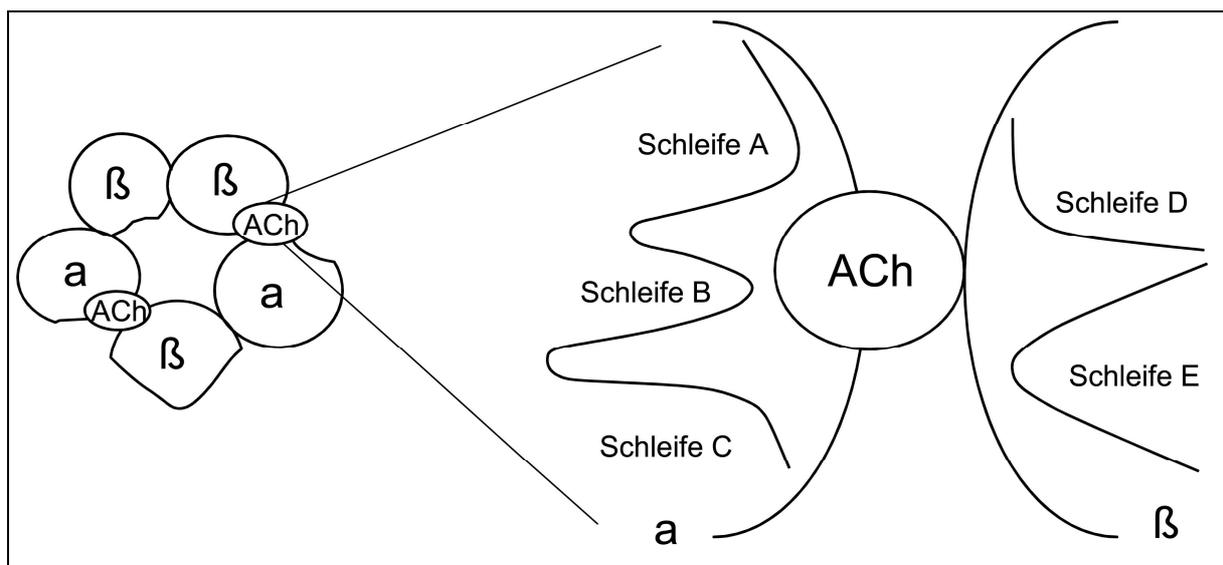


Abb. 5: ACh-Bindungsstelle zwischen zwei benachbarten Untereinheiten (Schaubild nach Itier und Bertrand 2001) *Links sieht man die Schleifen A, B und C der α -Untereinheit und rechts die Schleifen D und E der β -Untereinheit. Zwischen diesen Schleifen bindet das ACh-Molekül.*

Die Einbuchtungen der α -Untereinheiten, die als ACh-Bindungsstellen bezeichnet werden, besitzen die richtige Größe und Form um ein ACh-Molekül aufzunehmen. Die Bindungsstellen stehen durch schmale Tunnel von 10 - 15 Å Länge mit dem Ionenkanal in Verbindung. Es scheint, dass ACh gemeinsam mit anderen Kationen in den Ionenkanal gelangt und dann selektiv zur Bindungsstelle geleitet wird (Miyazawa et al. 1999).

Einleitung

Die Zusammensetzung der Rezeptoren aus verschiedenen Untereinheiten determiniert deren Eigenschaften wie Ligandenspezifität, Ligandenaffinität, Kanalkinetik und Ca^{2+} -Durchlässigkeit (Buisson et al. 2000). So wird zum Beispiel die Ligandenaffinität für ACh durch einen höheren Anteil β_2 -Untereinheiten im Rezeptor gesteigert (Nelson et al. 2003). Die Ca^{2+} -Durchlässigkeit des Rezeptors wird durch die Ladung der AS der TM2 Domäne bestimmt. Im Bereich der TM2 Domäne bestehen die α_4 -, α_5 - und β_3 -Untereinheiten aus homologen Glutamat-Resten, was zu einer hohen Ca^{2+} -Durchlässigkeit führt. Im Gegensatz dazu findet sich bei der β_2 -Untereinheit an dieser Position Lysin (Tapia et al. 2007).

Aktivierungszustände von nAChR

Die Aktivierung des nikotinischen Azetylcholinrezeptors besteht aus drei Schritten:

- 1) die Bindung des Agonisten an den Rezeptor,
- 2) eine Konformationsänderung, die zu einem Ladungsimpuls durch schnelles Öffnen und Schließen des Ionenkanals führt, und
- 3) die Trennung des Agonisten vom Rezeptor oder die Desensibilisierung oder Inaktivierung des Rezeptors, die den Ladungsimpuls beendet (Derkach et al. 1991).

Durch Anbindung von Azetylcholin kommt es zu einer Konfigurationsänderung im Rezeptor, was mit der Öffnung der zentralen Pore verbunden ist (Changeux und Edelstein 2006, Gay und Yakel 2007, Unwin 2005). Die Bindung des Liganden führt zu einer Rotation des extrazellulären Bereichs und der TM2-Helices (Alberquerque et al. 2009). Im Wesentlichen hat dies drei wichtige Konsequenzen: Die vorübergehende Entfernung der hydrophoben Seitenkette aus der Pore, eine Vergrößerung des Porendurchmessers auf ca. 8 Å und eine Bewegung von hydrophilen Seitenketten in den Kanal, was den Ionenfluss fördert (Albuquerque et al. 2009). Eine exakte Beschreibung der konformativen Änderungen auf der Ebene der atomaren Struktur, die die ACh-Bindungsstelle mit dem Ionenkanal verbindet, fehlt jedoch bisher (Changeux und Taly 2008).

Es gibt vier verschiedene Konformationen des AChR: geschlossen, offen, inaktiviert und desensibilisiert. Wird das Substrat (z.B. ACh) nicht schnell genug abgebaut oder wirkt über einen längeren Zeitraum, geht der Rezeptor vom offenen in den desensibilisierten Zustand über (Nelson et al. 2005, Quick und Lester 2002). Dabei ist es vom Rezeptortyp und vom

Einleitung

Substrat abhängig, wie lange der desensibilisierte Zustand anhält. Die Inaktivierung folgt auf einen längeren Stimulus von einigen Minuten bis Stunden und ist infolge einer Phosphorylierung von Untereinheiten irreversibel (Olale et al. 1997).

1.1.2. Agonisten und Antagonisten am nAChR

Außer Azetylcholin können viele andere Substanzen den Rezeptor beeinflussen, wie z.B. Nikotin als reversibler Agonist, Bromoazetylcholin als irreversibler Agonist (Derkach et al. 1991), Mecamylamine als reversibler Antagonist und α -Bungartoxin als irreversibler Antagonist (Grando et al. 1995) oder Strychnin als selektiver Blocker der α_9 -Untereinheit des ACh-Rezeptors (Elgoyhen et al. 1994).

Die spezifischen Antagonisten, die in dieser Studie verwendet wurden, sind Hexamethonium, Metylycaconitin und Dihydro- β -Erythroidin. Hexamethonium ist ein potenter Antagonist an neuronalen nAChR (Bertrand et al. 1992). Metylycaconitin ist ein Pflanzengift, das als sehr spezifischer, kompetitiver Hemmer am nikotinischen AChR v.a. die α_7 -Untereinheit blockiert (Matsubayashi et al. 2004). Dihydro- β -Erythroidin (DH β E) ist ein Alkaloid aus dem mexikanischen Korallenbaum (*Erythrina americana*), das kompetitiv mit hoher Affinität an nAChR bindet. Dieser Antagonist blockiert mit großer Selektivität die $\alpha_4\beta_2$ -Untereinheiten (Shoaib et al. 2000).

1.2. Cholinerge Systeme

ACh ist seit ungefähr 3 Milliarden Jahren als Signalmolekül in nicht-neuronalen Zellen und Geweben aktiv, während seine neuronale Funktion erst seit einer im Vergleich relativ kurzen Zeit von einer halben Milliarde Jahren besteht (Grando et al. 2003). ACh und die Fähigkeit ACh zu synthetisieren ist ubiquitär in allen Lebensformen vorhanden. Daher ist davon auszugehen, dass ACh ein evolutionär altes Molekül ist, das seit der Entstehung der ersten Lebensformen als lokaler Mediator verschiedene physiologische Funktionen reguliert (Kawashima et al. 2007). Horiuchi wies nach, dass ACh und die Fähigkeit ACh zu synthetisieren sowohl in evolutionär primitiven Lebensformen, als auch in multizellulären Organismen zu finden ist (Horiuchi et al. 2003).

Der nAChR war lange Zeit als typischer Rezeptor neuronaler Systeme bekannt. Er ist charakterisiert durch seine Beteiligung an der Signalweiterleitung im Bereich der Synapsen

Einleitung

(Changeux und Edelstein 2006). Da Wessler et al. (1998) der Nachweis dieser Rezeptoren auch in der nicht innervierten Plazenta gelang, konnte die Existenz eines non-neuronalen cholinergen Systems postuliert werden.

Die wichtigsten Unterschiede zwischen neuronalem und nicht-neuronalem ACh sind in der folgenden Tabelle dargestellt (Wessler et al. 2003):

Neuronal		Nicht-neuronal
Nervenendigung	Synthese	gesamte Zelle
Vesikel	Aufbewahrung	Zytosol (?)
Exozytose synchronisiert bei Bedarf	Freisetzung	über Transporter kontinuierlich
zentralisiert	Rezeptoren	gleichmäßig verteilt
kurz wirksam	Wirksamkeit	kontinuierlich wirksam
schnell	Elimination	langsam

Tabelle 1: Unterschiede zwischen neuronalen und nicht-neuronalen cholinergen Systemen (nach Wessler et al. 2003)

Azetylcholin wird aus AzetylCoEnzym A und Cholin durch das spezifisch cholinerge Enzym Cholinazetyltransferase (ChAT) synthetisiert (Kawashima et al 2007). Dieser Mechanismus wurde erstmalig von Nachmansohn und Machado (1943) beschrieben. Es konnten zwei Formen der ChAT unterschieden werden: die common type ChAT (cChAT) und die periphere ChAT (pChAT). Die cChAT kommt v.a. in den Neuronen des zentralen Nervensystems und dort in Zytoplasma und im Kern vor, während die etwas kürzere pChAT im Zytoplasma von peripheren Neuronen zu finden ist (Matsuo et al. 2005). Ein weiteres Enzym, das ACh synthetisieren kann, ist die Carnitinacetylcholintransferase (CarAT), die aus Acetylcarnitin freigesetztes Acetyl-CoA zu ACh verarbeitet (Ayala 1995).

Im Gegensatz zu der Situation in Nerven, wo ACh durch den vesikulären Azetylcholintransporter (VACHT) in Vesikeln gespeichert wird, sind zur Zeit keine Speichermedien für ACh in non-neuronalen Zellen bekannt und ACh scheint direkt nach seiner Produktion freigesetzt zu werden (Racké et al. 2006).

Einleitung

Die Freisetzung von ACh aus der Zelle kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen:

- Durch ein Aktionspotential strömt Ca^{2+} in die Zelle ein, was als Signal für die Exozytose dient. Die mit ACh geladenen Vesikel verschmelzen mit der Zellmembran und das gespeicherte ACh wird in den Extrazellulärraum ausgeschüttet (Dudel 2006).
- Ein weiterer möglicher Mechanismus der Freisetzung von ACh in den synaptischen Spalt ist die Abgabe über Mediatophoren (Wessler et al. 1999). Mediatophoren wurden im elektrischen Organ des Torpedos beschrieben. Es handelt sich dabei um Proteine von ~200 kDa, die in der Lage sind, nach Calciumstimulus ACh zu transportieren. Der Transmitter wird dabei in Form von Quanten, d.h. in Form von definierten Mengen, freigesetzt (Falk-Variante et al. 1996).
- Des Weiteren können bidirektional arbeitende polyspezifische organische Kationen Transporter (OCT), die sich in der Zellmembran befinden. ACh in den Extrazellulärraum transportieren (Wessler et al. 2001). Ihre Funktion hängt von Substratkonzentration und Membranpotential ab (Koepsell et al. 2007).

ACh wird schnell von spezifischen und unspezifischen Cholinesterasen abgebaut. Als spezifische Cholinesterasen hydrolisiert die Azetylcholinesterase (AChE) ACh in Acetat und Cholin. Neben der AChE gibt es jedoch noch verschiedene unspezifische Cholinesterasen, wie die Butyrylcholinesterase (Kummer et al. 2008). Cholinesterasen sind intra- sowie extrazellulär zu finden. Durch ihr weitläufiges Vorkommen wird verhindert, dass ACh außerhalb des Gebietes wirken kann, an dem es gebildet wird. Die Geschwindigkeit des Abbaus hängt vom Zell- und Gewebeaufbau ab und trägt somit zu einer kurzen, langen oder kontinuierlichen cholinergen Stimulation bei (Grando et al. 2007).

Der limitierende Faktor in der ACh-Synthese ist die Wiederaufnahme von Cholin. Da Cholin die Zellmembran nicht selbstständig überwinden kann, ist es auf ein Transport-System angewiesen (Pfeil et al. 2003). Es gibt unterschiedliche Transportmechanismen für Cholin. So kann es durch eine erleichterte Diffusion, einen natrium- und energieabhängigen Transport oder durch einen aktiven Transportmechanismus in die Zelle gelangen. Cholin-Transporter sind die Gruppe der hochaffinen Cholin Transporter (CHT) (Okuda und Haga 2000), die Gruppe der OCTs, die eine geringere Spezifität für Cholin haben und die von anderen Zelltypen exprimiert werden (Pfeil et al. 2003), und die Cholin-Transport-like Gruppe (CTL) (Michel et al. 2006). In PC12-Zellen wurde außerdem gezeigt, dass Cholin von vesikulären Azetylcholintransportern transportiert werden kann. Hier wird es mit siebenfach geringerer Affinität im Vergleich zum ACh transportiert (Bravo et al. 2004).

Einleitung

1.2.1. Cholinerge Systeme in neuronalen Geweben

Bereits Mitte des 20. Jahrhunderts konnte die Synapse durch elektronenmikroskopische Studien als morphologische Einheit beschrieben werden (Couteaux 1958). Es wurde gezeigt, dass im Axonterminal Neurotransmitter (wie z.B. ACh) in 10-60 nm großen Vesikeln gelagert werden, der synaptische Spalt eine Breite von 10-100 nm aufweist und charakteristische Verdichtungen und Falten auf der postsynaptischen Seite existieren (Couteaux 1958). nAChR besitzen in neuronalen Geweben eine bedeutende Funktion: sie ermöglichen und modulieren den Informationsfluss innerhalb von Neuronen und Synapsen.

An Synapsen wird das Aktionspotential bzw. die in ihm enthaltene Information auf die nachgeschaltete Zelle übertragen (Clarke 1993). Die Überleitung erfolgt über die Freisetzung von chemischen Substanzen, den Transmittern (Corringer et al. 2000), wie z.B. ACh. Die Depolarisation der präsynaptischen Endigung durch ein fortgeleitetes Aktionspotential bewirkt das Öffnen von Ca^{2+} -Kanälen und damit - aufgrund der Potential- und Konzentrationsgradienten - den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen. Das Ausmaß des Ca^{2+} -Einstroms ist abhängig vom Ausmaß der Depolarisation (d.h. der Amplitude des Aktionspotentials). Die eingeströmten Ca^{2+} -Ionen bewirken die synchrone exozytotische Freisetzung von ACh aus zahlreichen synaptischen Vesikeln in den synaptischen Spalt (Berlit 1999, Oda 1999). Im Bruchteil von 1 ms diffundieren die ACh-Moleküle zu **postsynaptischen nAChR** und aktivieren sie. An jeden Rezeptor binden 2-3 ACh-Moleküle (sogenannte „kooperative“ Bindungsform). Die Aktivierung führt zum Öffnen von Membrankanälen, die für Na^+ , K^+ und Ca^{2+} -Ionen durchgängig sind (Changeux und Taly 2008, Berlit 1999). Dies führt zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} (Dani und Bertrand 2007). Bei Öffnung des Kanalproteins fließt mehr Na^+ einwärts als K^+ auswärts, weil die Innenseite der Membran im polarisierten Zustand negativ geladen ist und dies den Einstrom positiv geladener Teilchen fördert. Funktionell ist der Na^+ -Einstrom entscheidend: Er führt zur Depolarisation und dies führt zu einer Weiterleitung des Aktionspotentials (Lüllmann et al. 2006). Anschließend pumpt die Na^+/K^+ -ATPase die eingedrungenen Na^+ -Ionen wieder nach außen. Dies führt zur Repolarisierung der Membran (Koolmann und Röhme 2003).

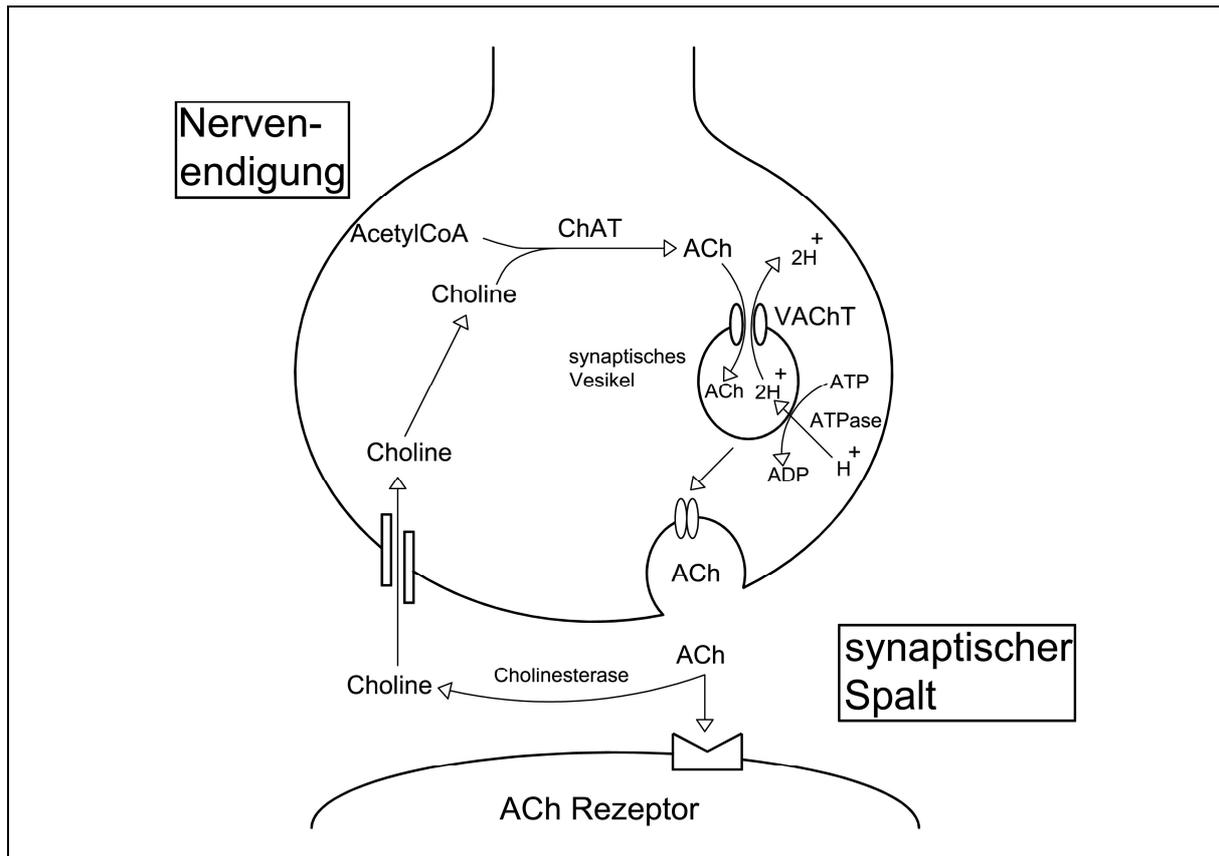


Abb. 6: Schematische Darstellung der cholinergen Nervenendigung (nach Oda 1999)

In der Nervenendigung wird ACh in Vesikeln (in Form von VAChT) gespeichert. Wenn ein Aktionspotential an der Nervenendigung ankommt, verschmelzen die Vesikel mit der Zellmembran und ACh wird in den synaptischen Spalt freigesetzt und kann am ACh-Rezeptor der gegenüberliegenden Zelle einen Impuls auslösen. Im synaptischen Spalt befindet sich das Enzym Cholinesterase, das nicht mehr benötigtes ACh spaltet. Das entstandene Cholin wird wieder in die Nervenendigung zurücktransportiert, wo es mit AcetylCoA von der Cholinacetyltransferase in Acetylcholin umgebaut wird.

Neben dieser **postsynaptische** Lokalisation des nAChR können verschiedene subzelluläre Lokalisation in neuronalen Geweben unterschieden werden:

- **Extrasynaptische-praeterminale** nAChR findet man v.a. im Verlauf motorischer Axone, aber auch im zentralen Nervensystem. Die Rezeptoren können lokale neuronale axonale Aktionspotentiale (Albuquerque et al. 2000) und ferner die synaptische Transmitterausschüttung beeinflussen (Wonnacott 1997). Dabei arbeiten sie aktionspotentialabhängig und sind mit Tetrodotoxin (TTX) blockierbar. Im Hippokampus findet man beispielsweise praeterminale nAChR mit α_7 - und $\alpha_4\beta_2$ -

Einleitung

Untereinheiten, die bei Aktivierung mit ACh die synaptische GABA-Ausschüttung hemmen (Albuquerque et al. 1998).

- **Praesynaptische** nAChR befinden sich in den Synapsen und regulieren die Sekretion von Neurotransmittern in intakten Neuronen (McKay et al. 2007). So sind sie z.B. für die Freisetzung von ACh, Noradrenalin, Dopamin, Glutamat und GABA verantwortlich (Gotti und Clementi 2004).

Zusammensetzung der nAChR im Nervensystem

Die α_4 -Untereinheit kann im zentralen Nervensystem am häufigsten nachgewiesen werden und bildet als $\alpha_4\beta_2$ -Heteropentamer 90% aller hochaffinen Nikotin-Bindungsstellen (Whiting und Lindström 1988). Der $\alpha_4\beta_2$ -nAChR spielt im Gehirn eine große Rolle im Nucleus accumbens, wo er die Effekte von chronischem Nikotinkonsum reguliert (Mc Callum et al. 2006). Typische Raucher weisen eine fast ständige Sättigung ihrer $\alpha_4\beta_2$ -nAChR im Gehirn im Verlaufe des Tages auf (Brody et al. 2006).

Die α_7 -Untereinheit findet sich sehr konzentriert im Hippokampus, aber auch perisynaptisch, also am Rand von Synapsen im peripheren Nervensystem. Sie haben eine hohe Ca^{2+} -Durchlässigkeit und werden z.B. durch α_7 -Bungartoxin und Strychnin inhibiert (Séguéla et al. 1993, Gotti und Clementi 2004).

1.2.2. Cholinerge Systeme in non-neuronalen Geweben

Nachdem funktionelle Bestandteile des cholinergen Systems in vielen Geweben des Säugetierorganismus ohne räumlichen Bezug zu cholinergen Neuronen nachgewiesen werden konnten, wurde die Existenz eines „non-neuronalen cholinergen Systems“ postuliert (Wessler et al. 1998). Beispielsweise wurde in humanen Keratinozyten ChAT und AChE nachgewiesen und ihre Fähigkeit zu ACh-Synthese, -Speicherung, -Ausschüttung und -Abbau dokumentiert. Es wurde angenommen, dass ACh im Gewebeverband der Keratinozyten als autokriner und parakriner Mediator agiert (Grando et al. 1993).

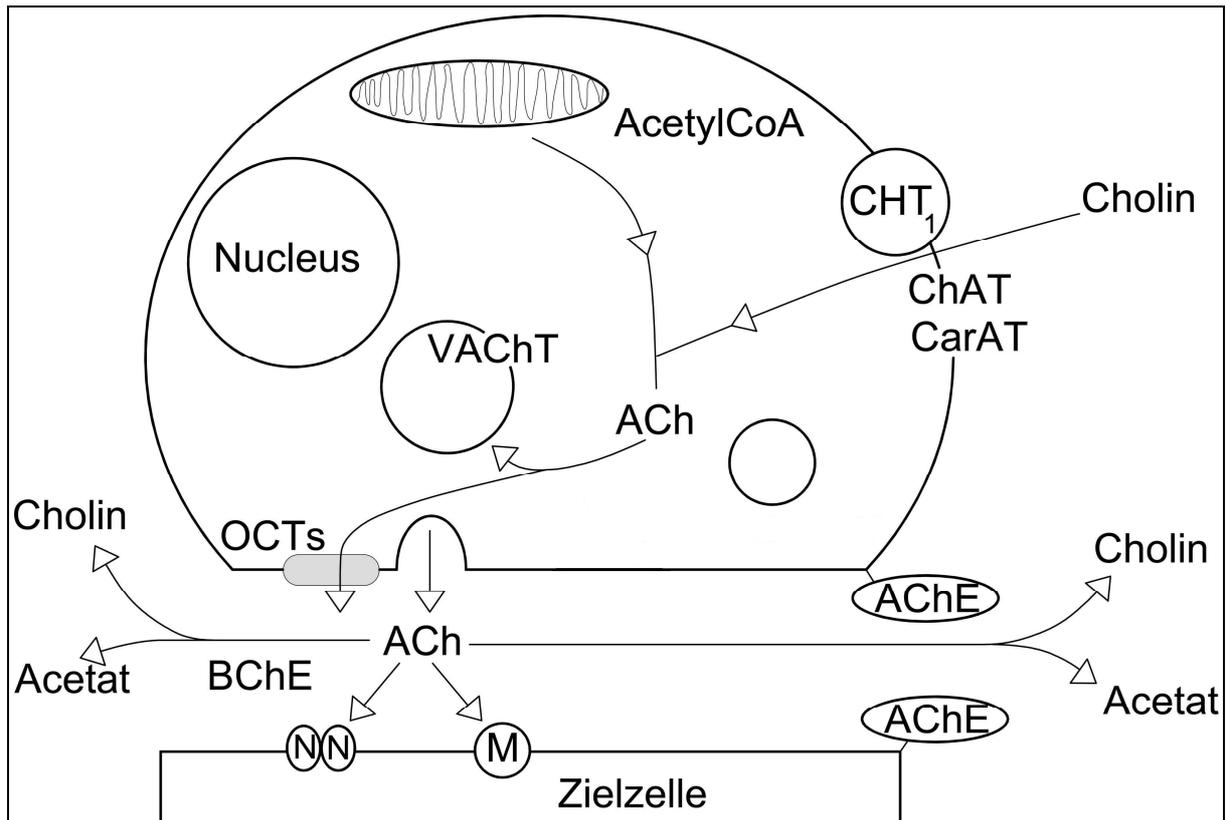


Abb. 7: ACh-Kreislauf, Synthese, Freisetzung, Wirkung und Inaktivierung an der nicht-neuronalen Zelle (nach Kummer et al. 2008)

OCT – organischer Kationen Transporter, CarAT – Carnitin Azetyltransferase, BChE – Butyrylcholinesterase, ChAT – Cholin Azetyltransferase, M – muskarinischer Rezeptor, n – nikotinischer Rezeptor, VChT – vesikulärer ACh Transporter

In der Zelle wird ACh teils in Form von Vesikeln, teils als freies Molekül gespeichert. Durch einen Impuls beginnt die Freisetzung von ACh durch eine Verschmelzung der Vesikel mit der Zellmembran oder über OCT. ACh kann dann auf der gegenüberliegenden Seite des synaptischen Spaltes an der Zielzelle wirken. Im synaptischen Spalt befinden sich AChE und BChEsterase, die eine Spaltung des nicht mehr benötigten AChs verursachen. Anschließend wird das entstandene Cholin wieder von Cholin-Azetyltransferase in die Zelle zurücktransportiert.

Die **ACh-Synthese** erfolgt in non neuronalen Geweben durch die Synthesenzyme cChAT und pChAT. cChAT und pChAT wurden in der Plazenta der Ratte (Pfeil et al. 2004), ChAT in der menschlichen Plazenta (Bhuiyan et al. 2006), CarAT im Urothel (Lips et al. 2007) und ChAT in den Endothelzellen der menschlichen Nabelschnur (Kirkpatrick et al. 2003) nachgewiesen. Nach der Synthese folgt die **Speicherung** des ACh in VChT, wie sie in einigen Zellen der Plazenta der Ratte (Pfeil et al. 2004) und in menschlichen Endothelzellen

Einleitung

(Kirkpatrick et al. 2001) existieren. In der humanen Plazenta wird Azetylcholin durch OCT - v.a. OCT1 und OCT3 - in den extrazellulären Raum **abgegeben** (Wessler et al. 2001). Auch Schlereth et al. (2006) zeigten, dass ACh in der Haut durch OCT2 freigesetzt wird. OCT1 kommt in Leber, Niere und Dünndarm von Nagern vor, beim Menschen v.a. in der Leber, OCT2 in Niere und bestimmten Regionen des Gehirns, während OCT3 v.a. in der Plazenta und in kleinen Anteilen auch im Darm, Herz und Gehirn beschrieben wurde (Jonker und Schinkel 2004, Michel et al. 2006). Die **ACh-Ausschüttung** findet durch OCT1 und OCT3 im Urothel des Menschen und der Maus (Lips et al. 2007) und durch OCT1 und OCT2 im Atemwegsepithel der Maus (Kummer et al. 2006) statt.

ACh **wirkt** als lokales Signalmolekül auf zellulärer Ebene und als Zytotransmitter, der in einer auto-, juxta- und parakrinen Weise (d.h. die eigene Zelle, die Nachbarzelle und den Zellkomplex beeinflussend) verschiedenste Zellfunktionen moduliert. Es können Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Sekretion, Organisation des Zytoskelettes, Zell-Zell-Kontakt, Migration zwischen den Zellen, Zilien Aktivität und Immunfunktionen beeinflusst werden (Grando et al. 2003). So stellte Klapproth die Hypothese auf, dass ACh von Epithelzellen freigesetzt wird und ihre Sekretions- und Absorptionsfunktionen direkt reguliert sowie an der Regulation der Zellmitose beteiligt ist (Klapproth et al. 1997). Eine weitere Funktion von ACh ist die Stimulation des cholinergen Rezeptors im Trophoblasten, was zu einem Transport von Molekülen über die Plazentaschranke und somit zu einer Ernährung des Ungeborenen führt ((Rowell und Sastry 1981, Sweiry und Yudilevish 1985)).

Die **Zielstrukturen** von ACh im Gewebe sind die unterschiedlichen nAChR-Untereinheiten. Im Urothel der Maus konnten α_2 -, α_4 -, α_5 -, α_6 -, α_7 -, α_9 - und α_{10} -nAChR -Untereinheiten (Zarghooni et al. 2007), in der Plazenta des Menschen und der Ratte sämtliche α -Untereinheiten des nAChR (Lips et al. 2005) und außerdem in der menschlichen Plazenta auch mAChR (Bhuiyan et al. 2006) nachgewiesen werden.

Die Spaltung von ACh und damit der **Abbau** erfolgt durch Azetylcholinesterasen in Erythrozyten und durch unspezifische Cholinesterasen im Blut (Wessler et al. 1998). Cholin wird anschließend von Cholin Transportern, z.B. CTL1 in der Mukosa des Colons (O'Regan et al. 2000) oder CHT1 im Atemwegsepithel (Pfeil et al. 2003), wieder in die Zelle aufgenommen.

1.2.4. Cholinerges System in der Blutgefäßwand

Zwei cholinerge Systeme können in Blutgefäßen unterschieden werden: In der Gefäßwand lassen sich sämtliche Bestandteile des neuronalen cholinergen Systems - wie das Azetylcholin-Synthesenzym ChAT, AChE zum Transmitterabbau und nikotinische nAChR - ohne direkten Bezug zu neuronalen Strukturen nachweisen. Diese bilden in ihrer Gesamtheit das **intrinsisch-intimale** cholinerge System (Villablanca 1998):

- Das Synthesenzym ChAT konnte in den Endothelzellen von kleinen Gehirngefäßen bei der Ratte nachgewiesen werden (Parnavelas et al. 1985).
- Kawashima et al. (1990) wiesen nach, dass ACh von der kultivierten A. carotis des Rindes synthetisiert und freigesetzt wird.
- In den zerebellären Kapillaren konnten hohe Konzentrationen von AChE nachgewiesen werden (Ciani und Franceschini 1984).
- In coronaren EC (Endothelzellen) konnte die Expression von neuronalen nAChR-Untereinheiten auf mRNA-Level nachgewiesen werden. Funktionell konnte bestätigt werden, dass diese Zellen auf ACh reagieren (so kommt es z.B. durch ACh zu einer Signalweiterleitung mit einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+}) (Moccia et al. 2004).
- In der arteriellen Gefäßwand konnte CHT1 als Bestandteil des intrinsisch non-neuronalen cholinergen Systems nachgewiesen werden (Lips et al. 2003).
- α_3 -, α_5 -, α_7 - und α_{10} -nAChR-Untereinheiten konnten auf den Endothelzellen und alle α -Untereinheiten, außer der α_9 -Untereinheit, auf den glatten Muskelzellen der Arterie der Ratte nachgewiesen werden (Brüggmann et al. 2002).

Das intimale System dient als genereller Regulator des basalen vaskulären Tonus und der Wandstruktur und reagiert auf lokale Stimuli aus dem Lumen (Kummer und Haberberger 1999, Schneider et al. 2003).

Autonome perivaskuläre cholinerge Nervenfasern repräsentieren das **extrinsisch-adventitielle** cholinerge System. Diese Axone finden sich selektiv nur in Gefäßen bestimmter Organe (Schneider et al. 2003). Hier ist ihre Innervationsdichte hochspezifisch für das jeweils versorgte Organ und den dort vorhandenen Gefäßtyp (Sequeria et al. 2005). In einigen Bereichen ist keine oder nur eine geringe perivaskuläre Verteilung von Axonen vorhanden, so sind großlumige Gefäße, wie z.B. Aorta oder A. femoralis nicht oder kaum innerviert

Einleitung

(Kummer und Haberberger 1999), während in anderen Gebieten (z.B. im Gehirn) eine sehr starke perivaskuläre Innervation zu finden ist (Henrich et al. 2003). Weitere Arterien, die von cholinergen Nervenfasern innerhalb perivaskulärer Nervenplexus begleitet werden, sind Coronararterien (Schäfer et al. 1998), Lungenarterien (Haberberger et al. 1997) und Uterinararterien (Amenta et al. 1979). Cholinerg innervierte Gefäße beinhalten den Neurotransmitter ACh, ferner können noch weitere Ko-Mediatoren (NO, Neuropeptide) in organspezifische Verteilung nachgewiesen werden (Schneider et al. 2003). In der Zungenarterie von Meerschweinchen (Henrich et al. 2003), Affe, Schwein und Hund (Yoshida und Toda 1997) konnte die Kollokalisierung von ACh, vasoaktivem intestinalem Peptid (VIP) und Stickstoffmonoxid (NO) in den gleichen cholinergen Nervenfasern bestätigt werden. Parasympathische Nerven der Gefäße in der Speicheldrüse der Katze beinhalten ebenfalls ACh und VIP (Lundberg 1981). VIP hat in diesen Gefäßen eine direkte endothelunabhängige vasodilatatorische Wirkung, ferner scheint es als Neuromodulator die Freisetzung und Wirkung von ACh zu beeinflussen (Wharton und Gulbenkian 1987).

ACh wirkt in der cholinerg innervierten Blutgefäßwand vasodilatatorisch. Beispielsweise kommt es in der A. uterina von Mensch und Meerschweinchen über Aktivierung endothelialer **mAChR** zur NO-Freisetzung. Dieses führt zur Relaxation von VSMC und damit zu einer Vasodilatation (Jovanovic et al. 1994a, Azuma et al. 1995, Furchgott und Zawadzki 1980). Neben dieser parakrinen Wirkung von ACh an benachbarten vaskulären Endothelzellen (EC) und auch glatten Muskelzellen (VSMC) konnte auch eine autokrine ACh-Wirkung in cholinerg innervierten Gefäßen beschrieben werden: Das aus den perivaskulären Neuronen freigesetzte ACh aktiviert hier praeterminale **nAChR** auf benachbarten perivaskulären Nervenendigungen und reguliert im Rahmen eines Feedbackmechanismus so deren Transmitterfreisetzung (Kummer und Haberberger 1999, Toda und Okamura 2003).

Die perivaskulären Nervenfasern reagieren auf systemische Stimuli mit einer entsprechenden ACh-Freisetzung. Aus auto- und parakriner ACh-Wirkung an muskarinischen und nikotinischen Rezeptoren in Blutgefäßwand und Nervenplexus resultiert die Regulation von Gefäßtonus und einer weiteren Transmitterfreisetzung aus benachbarten Nervenendigungen (Toda und Okamura 1991). Auf diese Weise kommt es zur Feinabstimmung des Gefäßbasaltonus auf systemische Bedürfnissen (Kummer und Haberberger 1999).

1.3. Klinische Relevanz des Themas

Rauchen während der Schwangerschaft stellt ein großes Risiko für das ungeborene Kind dar. In Deutschland rauchen 22 % der Frauen, mit einem leichten Anstieg der Anzahl in den letzten 10 Jahren (Statistisches Bundesamt 2008). Obwohl die negativen Effekte des Rauchens in der Schwangerschaft weitreichend bekannt sind, verzichten laut einer englischen Studie 2/3 der Raucherinnen auch während der Gravidität nicht auf das Rauchen (Ward et al. 2007). Rauchen während der Schwangerschaft steht im Zusammenhang mit einem verminderten Geburtsgewicht (Mitchelle et al. 2002) und einem verminderten intrauterinen Wachstum (Figueras 2007). Alleine durch Kinder mit zu niedrigem Geburtsgewicht entstehen in den USA jährlich Kosten von über 15 Milliarden Dollar, wobei über 20 % davon durch Rauchen in der Schwangerschaft verursacht werden (Esposito et al. 2008).

Im Maus-Modell wurde nachgewiesen, dass es sowohl durch aktives Rauchen als auch durch Passivrauchen zu einem verminderten Geburtsgewicht und zu einer Reduktion der Schädel-Rumpf-Länge kommt (Esposito et al. 2008). Durch sonographische Untersuchungen konnte ein erhöhter Widerstand in den uterinen Gefäßen von rauchenden Schwangeren im Vergleich zu nicht-rauchenden Schwangeren gezeigt werden (Albuquerque et al. 2004). Es konnte auch nachgewiesen werden, dass eine chronische, jedoch nicht eine akute Behandlung mit Nikotin einen direkten Einfluss auf die Kontraktilität der A. uterina in der Schwangerschaft hat und die endothelabhängige Relaxation blockiert, was zu einer verstärkten Vasokonstriktion führt (Xiao et al. 2007). Untersuchungen am späträchtigen Schaf zeigten ebenfalls einen erhöhten Widerstand von umbilikalen und uterinen Blutgefäßen und einen verminderten umbilikalen und uterinen Blutfluss (Clark und Irion 1992). In der Ratte konnte ein um mehr als 40% reduzierter uteriner und plazentaler Blutfluss (Birnbaum et al. 1994) und im trächtigen Rhesusaffen ein um 38% reduzierter uteriner Blutfluss (Suzuki et al. 1980) in Folge von Nikotinapplikation festgestellt werden. Aus diesen Studien geht hervor, dass Zigarettenrauch und auch die systemische Applikation von Nikotin zu einer Reduktion des uterinen Blutflusses verbunden mit einer Minderversorgung des Fetus führen könnten.

In Blutgefäßen findet man Rezeptoren für Nikotin. Diese nAChR sind als praeterminale Rezeptoren auf cholinergen Nervenendigungen Teil des extrinsisch-adventitiellen cholinergen Systems, sie können jedoch auch auf Endothel und auf VSMC das intrinsisch-intimale cholinerge System repräsentieren. Durch das Zusammenspiel beider Systeme wird die Vasomotrik des cholinerg innervierten Gefäßes gesteuert.

Einleitung

Könnten nun nikotinische AChR in der Gefäßwand der cholinerg innervierten A. uterina in die Vermittlung dieser Nikotin induzierten Konstriktion eingebunden sein?

Durch Applikation von Hexamethonium - einem selektiven Blocker neuronaler nikotinischer AChR - in die A. uterina des isolierten Schweineuterus konnte eine Vasodilatation hervorgerufen werden (Dynarowicz und Dzieglelewski 1987). Diese Beobachtung spricht für eine generelle funktionelle Beteiligung von neuronalen **nAChR** an der Vasomotorik der A. uterina. Ferner kam es durch Nikotinapplikation an der isolierten und endothelenuierten Uterinarterie des Affens zu einer Veränderung ihres Gefäßquerschnitts (Okamura et al. 2000). Diese Vasokonstriktion könnte der Wirkung des Nikotins an den verbleibenden **praeterminalen Rezeptoren** oder **Rezeptoren auf glatten Muskelzellen** der Gefäßwand entsprechen. Nach Zusammenfassung dieser Beobachtungen kann vermutet werden, dass Nikotin in der uterin arteriellen Gefäßwand sowohl

- praeterminale nAChR des extrinsisch-adventitiellen cholinergen Systems als auch
- endothelialen und glattmuskulären nAChR als Teil des intrinsisch-intimalen cholinergen Systems

aktiviert und so eine Vasokonstriktion der Uterinarterie mit einer daraus folgenden verminderten fetalen Blutversorgung verursachen könnte. Es können noch andere negative Konsequenzen für das Ungeborene folgen. Lips et al. vermuteten, dass es durch eine chronische Stimulation von nAChR durch Nikotin zu einer unausgeglichene Aktivierung oder funktionellen Desensibilisierung des Rezeptors gefolgt von Veränderungen der plazentaren Resorptionsfunktion von Nährstoffen kommt (Lips et al. 2004).

2. Fragestellung

1. Welche Auswirkung hat Nikotin an der A. uterina?

Durch Versuche der Applikation von Nikotin an der A. uterina von trächtigen und nicht-trächtigen Ratten soll die Wirkung von Nikotin überprüft werden.

2. Gibt es einen Unterschied in der Reaktion der Gefäße zwischen Früh- und Spätgravidität?

Durch Entnahme der Gefäße zu verschiedenen Zeitpunkten der Gravidität – an Tag 7-9 im Vergleich zu Tag 18/19 – soll nachgewiesen werden, ob die Gefäße je nach Zeitpunkt der Gravidität unterschiedlich auf die Nikotinexposition reagieren.

3. Welchen Einfluss hat das Endothel auf die Nikotinwirkung?

Versuche mit endothelintakten versus endotheldenudierten Gefäßen sollen zeigen, ob das Endothel einen Einfluss auf die Wirkung von Nikotin hat um damit nachweisen zu können, wo die Rezeptoren sitzen, die für die Reaktion des Gefäßes verantwortlich sind.

4. Lässt sich die Nikotinwirkung durch Blocker verschiedener Azetylcholinrezeptoruntereinheiten modifizieren?

Durch eine Durchführung von Versuchen mit den Blockern Hexamethonium, Metyllycaconitin und Dihydro- β -Erythroidin soll ein Hinweis erbracht werden, welche nAChR Untereinheiten an der nikotininduzierten Konstriktion des Gefäßes beteiligt sind. Dabei blockt Hexamethonium neuronale nAChR, Metyllycaconitin neuronale α_7 -nAChR-Untereinheiten und Dihydro- β -Erythroidin neuronale $\alpha_4\beta_2$ -nAChR-Untereinheiten.

Fragestellung

5. Hängt die Konstriktion von der Beteiligung von Ca^{2+} -Ionen ab?

Die Versuche werden im Ca^{2+} -freien Medium (PBS) statt in Ca^{2+} -haltigem Medium (MEM) durchgeführt um eine Beteiligung von Ca^{2+} -Ionen an der Konstriktion des Gefäßes nach Nikotinexposition nachzuweisen.

3. Material und Methoden

3.1.1. Versuchstiere

Bei den verwendeten Ratten handelte es sich um weibliche Tiere der Zuchtlinie Spraque-Dawley (Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland). Bei einem Alter von 15 - 22 Wochen wogen die nicht trächtigen Ratten 200 bis 300 g, die trächtigen Ratten besaßen ein Gewicht von 350 bis 450 g. Die Tiere wurden nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes gehalten. Ihre Verwendung für wissenschaftliche Zwecke wurde dem Tierschutzbeauftragten der Justus-Liebig-Universität Gießen gemeldet. Es lag ein Tiertötungsantrag mit dem Aktenzeichen V54-19 c 20/15 c vor. Von der Lieferung bis zu Versuchsbeginn wurden die Tiere im Tierstall der Justus-Liebig-Universität Gießen gehalten. Alle Ratten hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Standard-Nagetiernahrung.

Bei den nicht trächtigen Tieren erfolgte vor Versuchsbeginn eine Zyklusbestimmung anhand einer Vaginalzytologie, wobei zwischen Diöstrus, Proöstrus, Östrus und Metöstrus unterschieden wurde.

Die Entnahme der Gefäße bei den trächtigen Tieren erfolgte am Tag 7-9 (frühgravid) bzw. am Tag 18-19 (spätgravid) der Gravidität. Die Anzahl der Feten pro trächtigem Tier lag zwischen 4 und 22 (Median 14).

3.1.2. Entnahme und Vorbereitung der Gefäße:

Die Tötung der Ratten erfolgte durch Isoflurannarkose (Isofluran-Baxter 250 ml, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) und anschließender Dekapitation. Dann wurde die Bauchhöhle entlang der Linea alba eröffnet und der Uterus einschließlich der Parametrien suprazervikal exstirpiert. Anschließend wurde der Uterus in eine Petrischale mit MEM überführt und mit Hilfe von Präpariernadeln aufgespannt. Die Präparation der uterinen Radialarterien wurde unter einem Stereomikroskop (STEMI SR, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Zunächst musste das Fett der Umgebung mit mikrochirurgischen Instrumenten grob entfernt werden bis Arterie und Vene deutlich sichtbar waren. Dabei durften die Gefäße nicht berührt werden, da es sonst zu Läsionen derselben kommen konnte. Arterie und Vene wurden anschließend vorsichtig voneinander gelöst und die Vene entfernt, so dass ein ca. 800 µm langes Stück der Arterie exzidiert werden konnte.

Material und Methoden

Die Gefäße für Versuche mit endothelenundierten Arterien wurden anschließend in eine weitere Petrischale mit MEM überführt, in der mittels Knetmasse Pferdehaare (Durchmesser ca. 35 μm) befestigt waren. Die Arterie wurde über ein Haar gestreift, welches das Gefäßlumen vollständig ausfüllte, und durch ca. zehnmaliges vor- und zurückbewegen wurde das Endothel entfernt. Hermsteiner et al. (1999) zeigte durch Elektronenmikroskopie, dass hierbei das Endothel vollständig entfernt werden konnte.

3.1.3. Aufbau des Systems

Für diese in vitro Studien wurde ein in unserem Labor bereits etabliertes, für diese Experimente optimiertes Arteriographen-System nach Halpern (1984, Living Systems Instrumentation, Burlington, USA) verwendet. Dieses Arteriographen-System wurde bereits durch verschiedene Versuche im Mikrogefäßlabor der Frauenklinik der JLU verwendet und optimiert (Hermsteiner et al. 1999, 2001 und 2002). In ihm kann die Veränderung des Gefäßdurchmessers bei konstantem transmuralen Druck kontinuierlich registriert und aufgezeichnet werden.

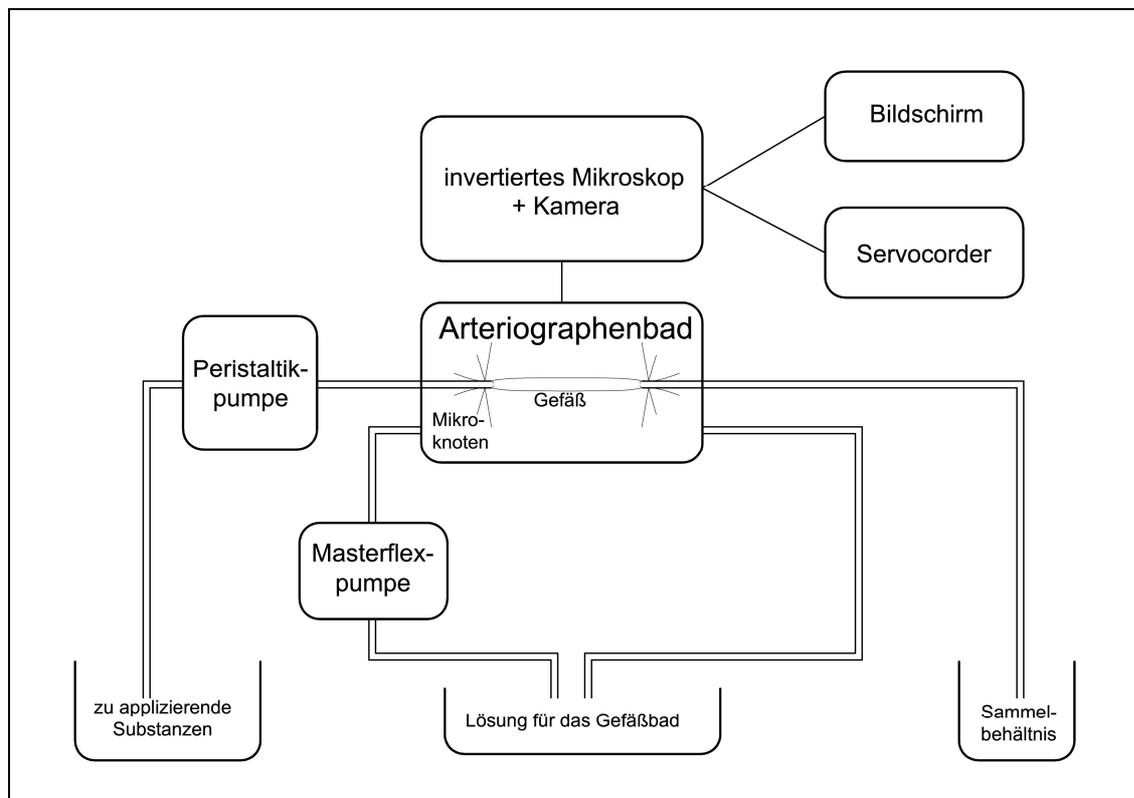


Abb. 8: schematische Darstellung des apparativen Aufbaus

Das Arteriographen-System nach Halpern besteht aus einem Arteriographenbad, in welches die präparierten Uterinarterien überführt wurden. Hier wurde das Gefäß mit dem proximalen

Material und Methoden

Ende auf die angeschliffene Spitze der sich konisch verjüngenden Mikrogaskanüle aufgezogen. Die Arterie wurde hier mittels ca. 20 µm dicker Nylonfäden auf der Kanüle festgeknotet. Nun wurde die fixierte Arterie mit MEM (Minimal Essential Medium) unter einem Druck von 5-10 mm Hg gespült um Blutreste und bei endotheldenudierten Gefäßen auch den verbleibenden Zelldetritus zu entfernen. Im Anschluss wurde auch das distale Ende der Arterie auf die gleiche Weise auf der gegenüberliegenden Mikrogaskanüle fixiert. Die Mikroknotten wurden so gesetzt, dass Abschnitte, die während der vorhergehenden Manipulation mit der Pinzette berührt wurden, durch diese von dem zu untersuchenden Segment getrennt werden. Es wurde darauf geachtet, dass die Arterie weder verdreht war, noch unter Spannung stand.

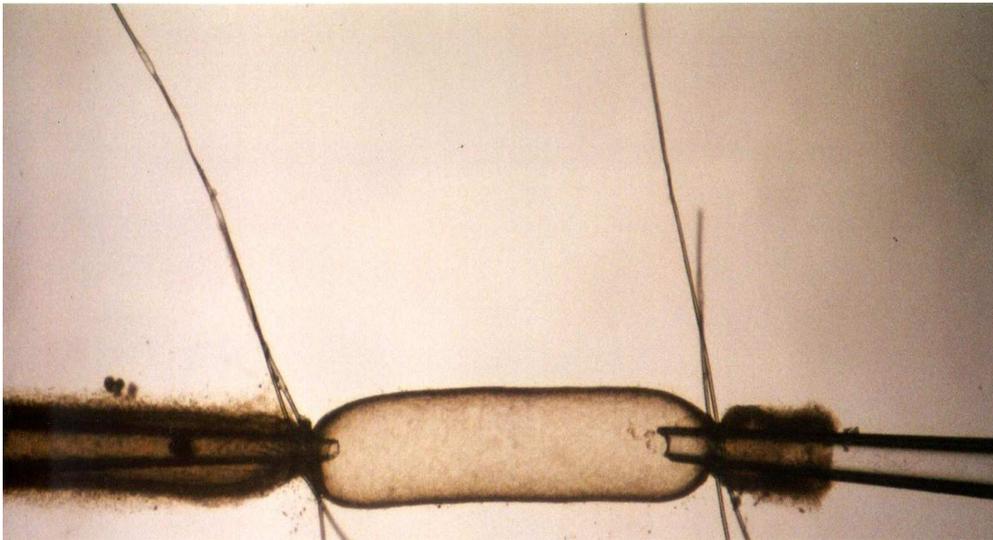


Abb. 9: Foto einer Arterie im Arteriographensystem

Die Enden der entnommenen A. uterina wurden auf zwei Mikrogaskanülen aufgezogen und mittels Mikroknotten fixiert.

Das Gefäßbad wurde kontinuierlich über eine Masterflex-Pumpe der Fa. Cole-Parmer Instrument (Chicago, USA) aus einem Standgefäß mit 800 ml MEM mit einer Geschwindigkeit von 20 ml/min gespült. Die MEM-Lösung wurde durch einen Haake D8-L Wärmeaustauscher mit permanenter Temperaturkontrolle der Fa. Haake Mess-Technik (Karlsruhe, Deutschland) auf konstant 37,5°C gehalten. Der innere Kreislauf durch die Gefäße wurde durch eine Peristaltikpumpe aufrechterhalten, so dass konstanter transmuraler Druck von 55-60 mm Hg gewährleistet wurde (Living Systems Instrumentation, Burlington, USA).

Material und Methoden

Um die Lumenveränderungen der Uterinarterie zu dokumentieren befand sich die Arteriographenkammer auf dem Objektisch eines invertierenden Mikroskops (Axiovert 35, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Im Binokular wurde der freie Abschnitt der kanülierten Arterie so ausgerichtet, dass die optische Achse des Mikroskops senkrecht auf der Längsachse des Gefäßes stand. Seitlich am Mikroskop war eine Fernsehkamera (TC 7014 X, Burle Industries, Lancaster, USA) angebracht, die durch Schwenken so ausgerichtet werden konnte, dass die Messlinien das Gefäß stets im rechten Winkel schnitten. Dabei wurden durch den Übergang von der optisch dichteren Gefäßwand zur weniger dichten Gefäßlichtung getriggerte Impulse erzeugt, deren Spannungswerte den tatsächlichen Abmessungen dieser Strukturen proportional sind und als lineare Maße digital abgelesen werden konnten. Diese Aufzeichnungen des transmuralen Drucks und des Gefäßdurchmessers erfolgten durch einen analogen Servocorder (SR 6211, Graphtec, Tokio, Japan).

3.2. Reagenzien und Lösungen

Als Basislösung wurde Minimum Essential Medium-Lösung (MEM-Lösung, Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Diese enthält verschiedene Aminosäuren, Vitamine, anorganischen Salze sowie Dextrose. Bei dem verwendeten Nikotin handelt es sich um Nikotin Hemisulfat Salz (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), das in MEM gelöst wurde.

Die Blocker der Azetylcholinrezeptoruntereinheiten wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Es handelte sich hierbei um Hexamethonium (HEX), einen neuronalen nAChR-Blocker, um Metylycaconitin (MCC), einen α_7 -nAChR-Blocker, und um Dihydro- β -Erythroidin (DH β E), einen $\alpha_4\beta_2$ -nAChR-Blocker.

Als Ca^{2+} -freie Lösung wurde Phosphate-Buffered Saline Lösung (PBS der Firma Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

U46691 ist ein Prostaglandin-Derivat, das eine potente Vasokonstriktion verursacht. Es wurde am Ende eines jeden Versuches eingesetzt um die Vitalität der getesteten Gefäße zu überprüfen.

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit sie in fester Form vorlagen, in MEM gelöst. Die verdünnten Lösungen wurden am Tag vor dem Versuch hergestellt, nur U46619 wurde erst kurz vor Gebrauch hergestellt, da es bei -20°C gelagert werden muss.

3.3. Durchführung

Zuerst wurden die Gefäße während einer 30-minütigen Aequilibrierungszeit mit MEM gespült, bevor dann die zu testenden Lösungen in den Kreislauf eingebracht wurden. Im Anschluss an die zu testenden Lösungen wurde das Gefäß erneut mit MEM gespült und anschließend mit U46619 getestet, ob weiterhin eine die Vitalität des Gefäßes beweisende Vasokonstriktion ausgelöst werden kann.

Im Studienverlauf wurden jeweils verschiedene Gefäßgruppen getestet:

Im **ersten** Versuchsabschnitt wurde die Reaktion von endothelintakten und endotheldenudierten Gefäßen nicht trächtiger Ratten miteinander verglichen. Hierbei wollten wir den Einfluss des Endothels auf die Konstriktion der Gefäße nachweisen. Der Versuch wurde an fünf endothelintakten und sechs endotheldenudierten Gefäßen durchgeführt. Die Nikotinkonzentrationen waren ansteigend von 1×10^{-7} M/L, 1×10^{-6} M/L, 1×10^{-5} M/L, 1×10^{-4} M/L bis 1×10^{-3} M/L.

Im **zweiten Teil** des Versuches wurden Gefäße von früh- und späträchtigen Ratten auf ihre Reaktion auf Nikotin getestet. Diese Versuche wurden durchgeführt um nachzuweisen, ob ein hormoneller Einfluss auf die Gefäßreaktion besteht. Die Versuche an Gefäßen von früh- und späträchtigen Ratten wurden ebenfalls an endothelintakten und endotheldenudierten Gefäß durchgeführt. In jeder Gruppe wurde fünfmal getestet, so dass eine Gesamtzahl von 20 Versuchen resultiert. Die Nikotinkonzentrationen entsprachen denen im ersten Versuchsabschnitt.

Im **dritten Versuchsabschnitt** wurden drei verschiedene **Blocker** (Hexamethonium, Metylycaconitin und Dihydro- β -Erythroidin) appliziert um die Beteiligung der Untereinheiten nachzuweisen. Zunächst wurde die EC_{50} für Nikotin ermittelt. Die Blocker wurden dann jeweils gemeinsam mit der zuvor errechneten EC_{50} Konzentration von Nikotin appliziert und anschließend wurde die Veränderung des Lumendurchmessers unter Applikation von steigenden Konzentrationen des Blockers gemessen. Zum Abschluss des Versuches wurden die Gefäße erneut einer alleinigen EC_{50} -Nikotin-Applikation unterzogen um zu beweisen, dass der Nikotineffekt gleich bleibt, egal wie häufig die Applikation wiederholt wird. Anschließend wurden die Gefäße mit U46619 gespült, das eine vollständige Vasokonstriktion bewirkt um die Vitalität des Gefäßes zu überprüfen. MCC und DH β E wurden in den Konzentrationen 1×10^{-7} M/L, 5×10^{-7} M/L, 1×10^{-6} M/L bis 5×10^{-6} M/L appliziert, die Konzentrationen von HEX betragen 5×10^{-6} M/L, 1×10^{-5} M/L, 5×10^{-5} M/L und 1×10^{-4} M/L. Es wurden mit MCC jeweils fünf Versuche an endothelintakten und

Material und Methoden

endotheldenudierten Gefäßen durchgeführt. Da sich am endotheldenudierten Gefäß eine große Konstanz der gemessenen Werte zeigte, wurden für DHβE und HEX nur noch jeweils ein Versuch am endotheldenudierten Gefäß, aber ebenfalls fünf Versuche am endothelintakten Gefäß durchgeführt.

Im **vierten Versuchsabschnitt** wurde das Medium in und um das Gefäß so verändert, dass kein Ca^{2+} mehr Bestandteil war. Diese Versuche sollten zeigen, ob Ca^{2+} einen Einfluss auf die Konstriktion der Gefäße hat. Durch transmembranäre Ca^{2+} -Flüsse könnte die Konstriktion durch Nikotin verstärkt werden. Es wurden ebenfalls jeweils fünf Versuche an endotheldenudierten und endothelintakten Gefäßen durchgeführt. Die Nikotinkonzentrationen waren ansteigend von 1×10^{-7} M/L, 1×10^{-6} M/L, 1×10^{-5} M/L, 1×10^{-4} M/L bis 1×10^{-3} M/L, entsprachen also den Konzentrationen im Ca^{2+} -haltigen Medium.

3.4. Versuchsaufbau

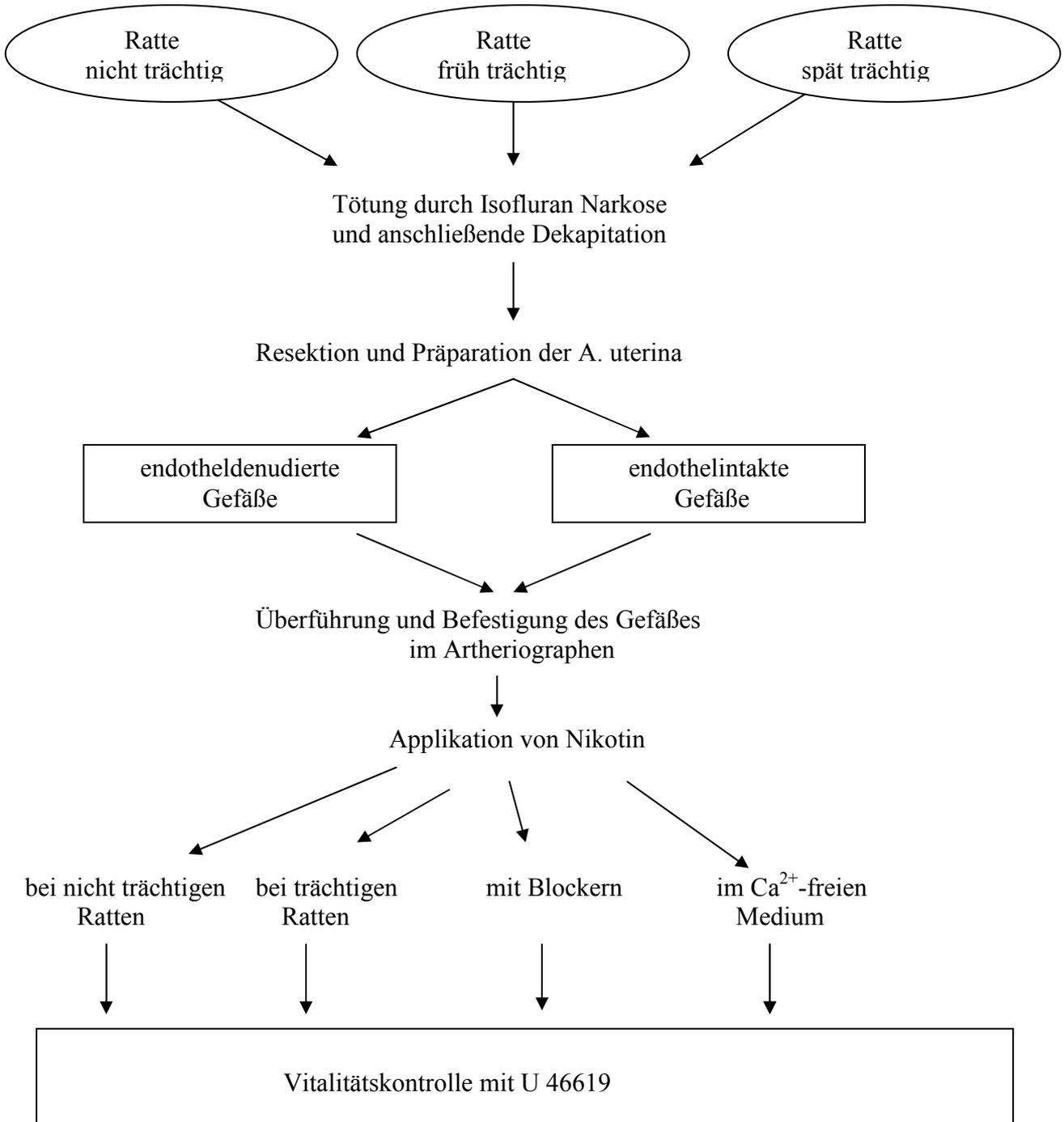


Abb. 10: Versuchsaufbau

3.5. Statistische Auswertung

Die Konstriktion der Arterien wurde in Bezug auf das jeweilige Reagenz mit folgender Formel berechnet:

$$K (\%) = \frac{\varnothing_{MEM} - \varnothing_{Reag}}{\varnothing_{MEM}} \times 100$$

\varnothing_{MEM} = Basal-Durchmesser nach Aequibrillierung,

\varnothing_{Reag} = Durchmesser nach Reagenz

Bei den Versuchen mit EC₅₀-Nikotin und Blocker wurde folgende Formel zur Berechnung der Dilatation benutzt:

$$D (\%) = \frac{\varnothing_{EC50} - \varnothing_{EC50+Reag}}{\varnothing_{EC50}} \times 100$$

\varnothing_{EC50} = Basal-Durchmesser nach Nikotin EC₅₀;

$\varnothing_{EC50+Reag}$ = Durchmesser nach Nikotin EC₅₀ + Blocker

Nach Abschluss der Versuchsserien wurde für jede eingesetzte Konzentration des Reagenz, bzw. der EC₅₀ Nikotin und jeder verwendeten Konzentration des Blockers der Mittelwert der Konstriktion bzw. Dilatation der Gefäße dieser Versuchsserie berechnet. Dann wurde der größte Mittelwert (höchste Konzentration des Reagenz bei endothelintakten Gefäßen) als 100% angenommen und die restlichen Werte in Prozent dieses Wertes errechnet um eine Grafik zu erstellen. Dabei lag folgende Formel zugrunde:

$$\text{Wert in Grafik (\%)} = \frac{\text{Mittelwert der jeweiligen Konzentration}}{\text{(Mittelwert der höchsten Konzentration / 100)}}$$

Material und Methoden

Anschließend wurden Graphen mit Hilfe des Programms Microsoft Excel erstellt, die den Prozentsatz der maximalen Konstriktion bzw. Dilatation in Bezug auf die Konzentration der angewendeten Reagenzien darstellen.

Die Graphen sind im Ergebnisteil unter dem jeweiligen Versuchsabschnitt dargestellt. Tabellen mit den jeweiligen Daten sind im Anhang zu finden.

EC₅₀ Nikotin wurde als halb-maximale Wirkung von Nikotin anhand der erhaltenen Daten für jeden Gefäßtyp einzeln ausgerechnet und bei den Versuchen mit Blockern angewendet.

Zur Ermittlung der Aussagekraft der erhaltenen Daten wurden Signifikanzberechnungen mit Hilfe des SPSS-Computerprogramms (Statistical Package for Social Sciences) durchgeführt. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ gewählt.

Dazu wurden die Daten so verglichen, dass sich jeweils eine Variabel (Endothel, Schwangerschaft, Calcium oder Blocker) ändert. Im nächsten Schritt wurden Vergleiche zwischen den erhaltenen Werten dieser Variablen bei unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Applikation von Nikotin an der A. uterina von nicht-trächtigen Ratten:

Im ersten Versuchsabschnitt wurden steigende Nikotinkonzentrationen (1×10^{-7} M/L, 1×10^{-6} M/L, 1×10^{-5} M/L, 1×10^{-4} M/L, 1×10^{-3} M/L) an Gefäßen von nicht-trächtigen Ratten appliziert. Dies wurde fünfmal an endothelintakten und sechsmal an endotheldenudierten Gefäßen durchgeführt.

Bei einer Nikotinkonzentration von 1×10^{-7} M/L kam es bei den endothelintakten Gefäßen zu einer Konstriktion von 4,20 % im Durchschnitt, während bei den endotheldenudierten Gefäßen kein Effekt nachgewiesen werden konnte. Die stärkste Konzentration (1×10^{-3} M/L) löst an den endothelintakten Gefäßen eine Konstriktion von durchschnittlich 29,25 % aus, während bei den endotheldenudierten Gefäßen lediglich eine maximale Konstriktion von durchschnittlich 9,00 % erfolgte. Ein Einfluss des Zyklus auf die Konstriktion konnte nicht nachgewiesen werden.

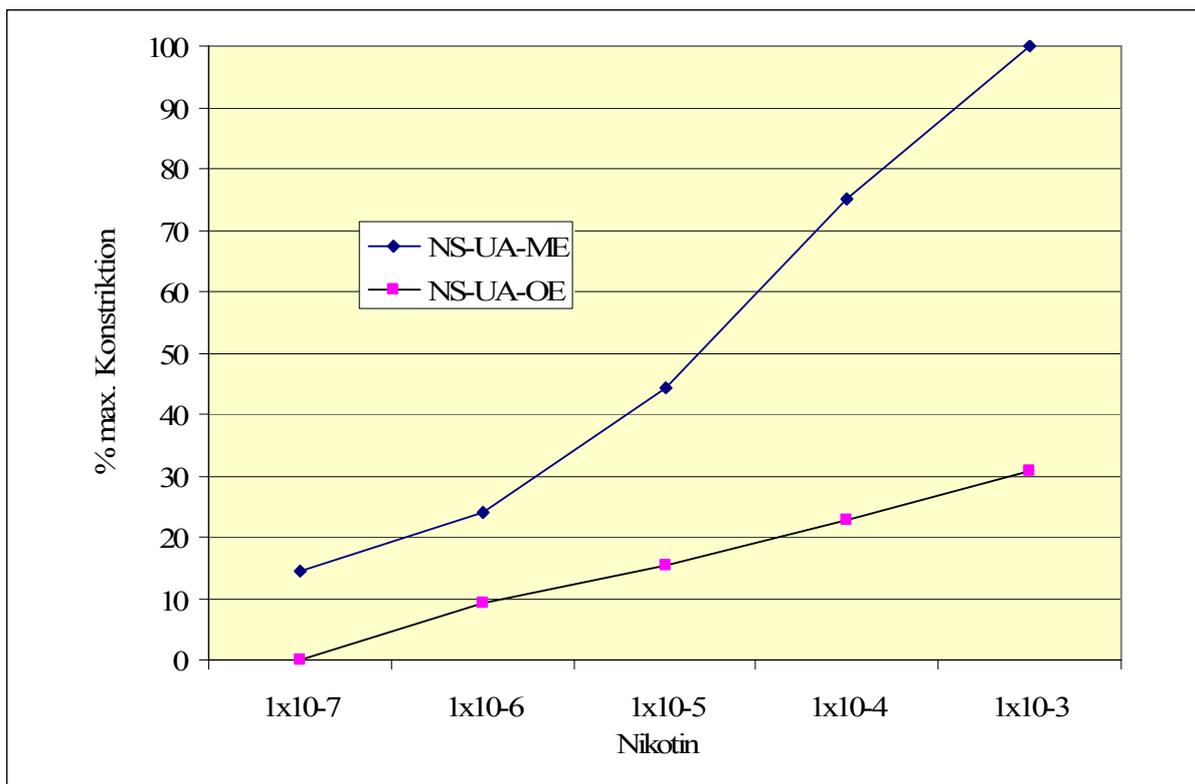


Abb. 11: Dosiswirkungskurve der Nikotinapplikation an der endothelintakten (ME) und endotheldenudierten (OE) A. uterina (UA) von nicht-trächtigen Ratten (NS)

4.2. Applikation von Nikotin an der A. uterina von frühträchtigen Ratten:

Im ersten Teil des zweiten Versuchsabschnittes wurde der gleiche Ablauf wie im ersten Versuchsabschnitt beibehalten, diesmal wurden nur Gefäße von frühträchtigen Ratten (Tag 7-9 der Gravidität) verwendet. Es wurden wieder je fünf Versuche an endothelintakten und endotheldenudierten Gefäßen durchgeführt.

Die endothelintakten Gefäße wiesen bei der niedrigsten Nikotinkonzentration von 1×10^{-7} M/L eine Konstriktion von durchschnittlich 2,00 % auf, während kein Effekt bei den endotheldenudierten Gefäßen gezeigt werden konnte. Bei der stärksten Konzentration (1×10^{-3} M/L) erfolgte an den endothelintakten Gefäßen eine Konstriktion von 27,00 % im Durchschnitt, während die endotheldenudierten Gefäßen eine Konstriktion von durchschnittlich 11,60 % zeigten.

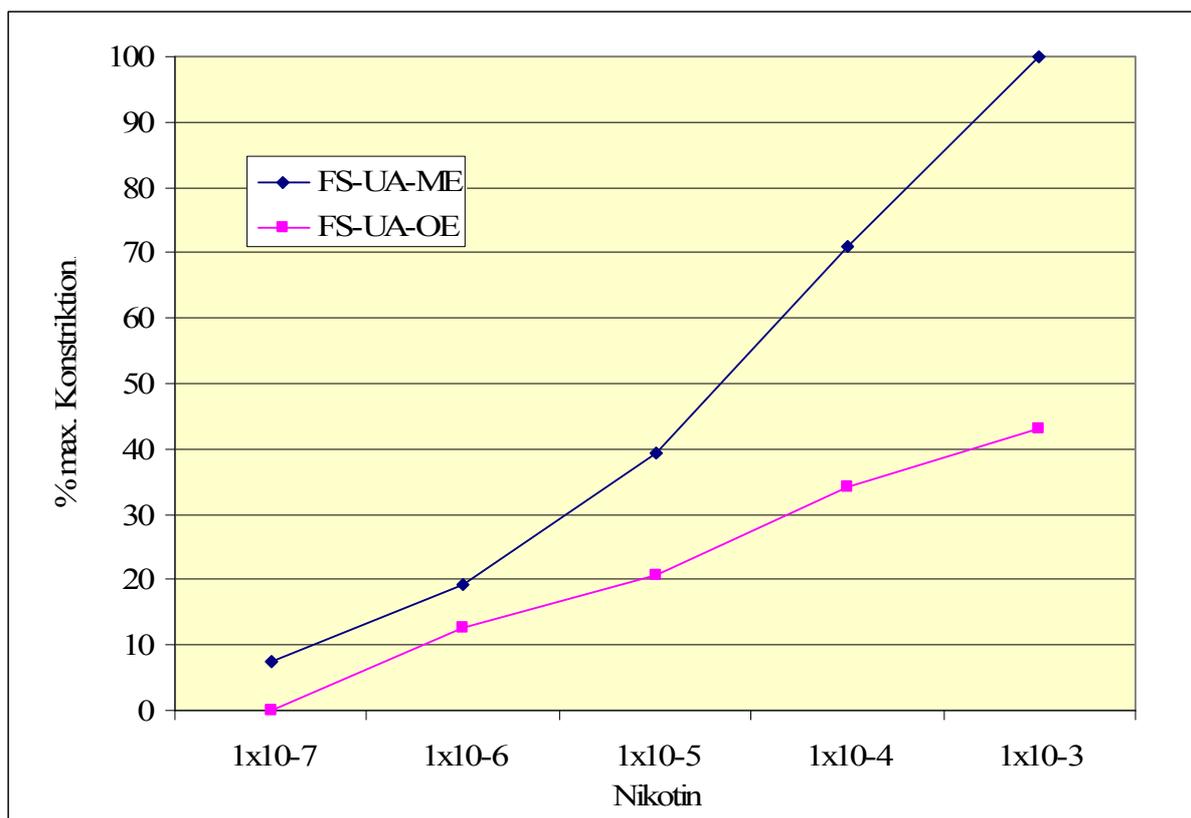


Abb. 12: Dosiswirkungskurve der Nikotinapplikation an der endothelintakten (ME) und endotheldenudierten (OE) A. uterina (UA) von frühträchtigen Ratten (FS)

4.3. Applikation von Nikotin an der A. uterina von spätträchtigen Ratten:

Der zweite Teil des zweiten Versuchsabschnittes entsprach dem ersten, jedoch wurden hierbei Gefäße von spätträchtigen Ratten (Tag 18-19 der Gravidität) verwendet. Hier wurden jeweils fünf Versuche an endothelintakten und endotheldenudierten Gefäßen durchgeführt.

Bei den endothelintakten Gefäßen kam es bei einer Nikotinkonzentration von 1×10^{-7} M/L zu einer Konstriktion von durchschnittlich 3,20 % während die endotheldenudierten Gefäßen keinen messbaren Effekt aufwiesen. An den endothelintakten Gefäßen löst die stärkste Konzentration (1×10^{-3} M/L) eine Konstriktion von 30,80 % im Durchschnitt aus, während nur eine Konstriktion von im Mittel 10,20 % bei den endotheldenudierten Gefäßen erfolgte.

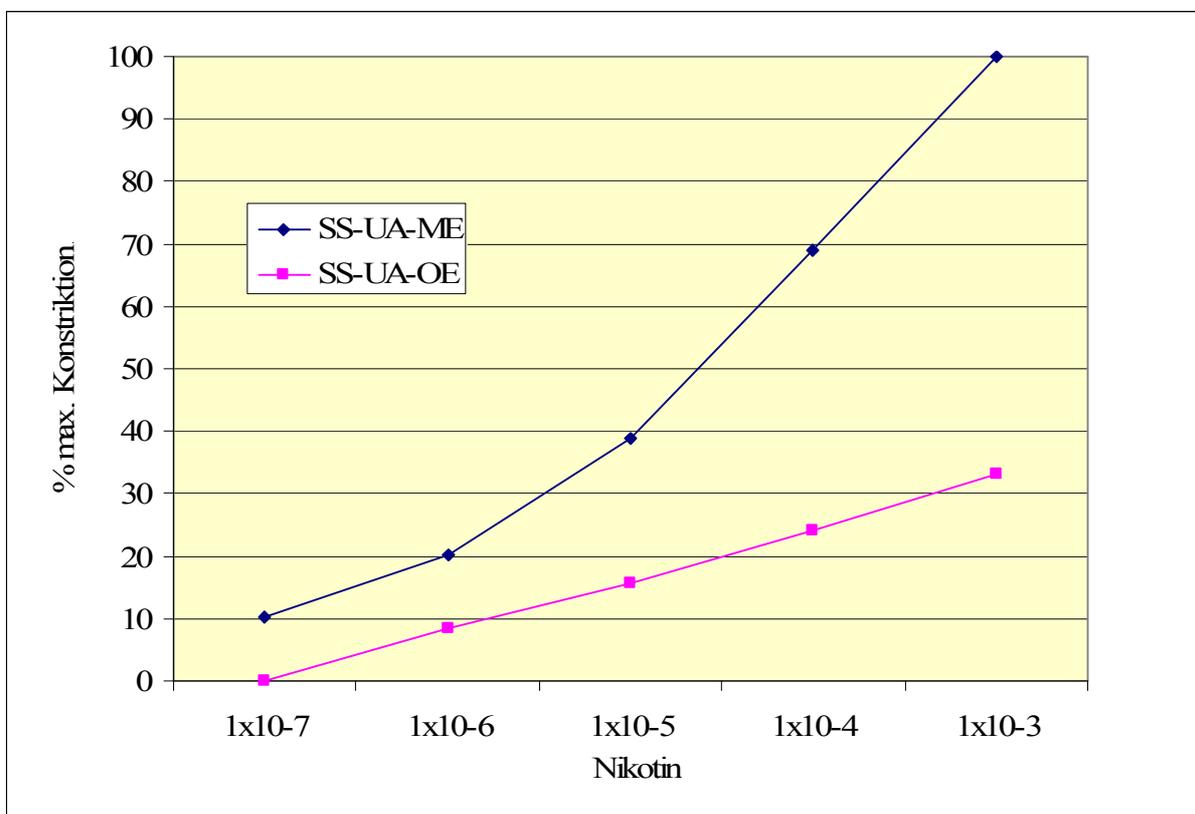


Abb. 13: Dosiswirkungskurve der Nikotinapplikation an der endothelintakten (ME) und endotheldenudierten (OE) A. uterina (UA) von spätträchtigen Ratten (SS)

Ergebnisse

4.4. Applikation von Hexamethonium und EC₅₀ Nikotin an der A. uterina von nicht-trächtigen Ratten:

Im dritten Versuchsabschnitt wurde als erster Blocker Hexamethonium eingesetzt. Hier wurden jeweils fünf Versuche an endothelintakten und ein Versuch an einem endotheldenudierten Gefäßen durchgeführt. Gemeinsam mit steigenden Konzentrationen des Hexamethonium (5×10^{-6} M/L, 1×10^{-5} M/L, 5×10^{-4} M/L, 1×10^{-4} M/L) wurde die zuvor errechnete EC₅₀ Konzentration von Nikotin (1×10^{-5} M/L) appliziert.

Die Berechnung der Dilatation erfolgte in Bezug auf die praekonstringierten Gefäße.

Durch die niedrigste Konzentration des Blockers (5×10^{-6} M/L) kam es zu einer durchschnittlichen Dilatation von 9,40 % an den endothelintakten Gefäßen, während bei dem endotheldenudierten Gefäß eine Dilatation um 1 % erfolgte. Bei einer Konzentration von 1×10^{-4} M/L zeigten die endothelintakten Gefäße eine Dilatation von durchschnittlich 20,20 %, wohingegen die endotheldenudierten Gefäße lediglich um 8 % dilatierten.

Hier zeigt sich sowohl beim endothelintakten, als auch beim endotheldenudierten Gefäß eine Vasodilatation im Vergleich zum Zustand vor Applikation von EC₅₀ Nikotin, was einer vollständigen Aufhebung der Nikotinwirkung durch HEX entspricht.

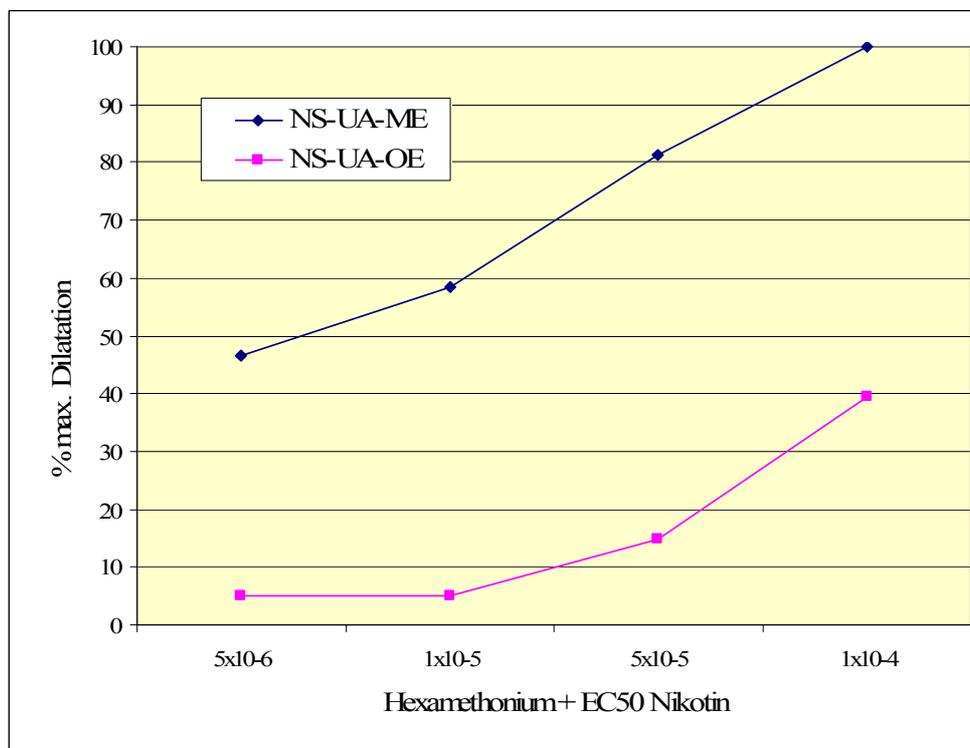


Abb. 14: Dosiswirkungskurve der Hexamethonium + EC₅₀ Nikotin Applikation an der endothelintakten (ME) und endotheldenudierten (OE) A. uterina (UA) von nicht-trächtigen Ratten (NS)

Ergebnisse

4.5. Applikation von Metylycaconitin und EC₅₀ Nikotin an der A. uterina von nicht-trächtigen Ratten:

Als zweiter Blocker wurde Metylycaconitin eingesetzt. Es wurden jeweils fünf Versuche an endothelintakten und endotheldenudierten Gefäßen durchgeführt. Dabei wurde die zuvor errechnete EC₅₀ Konzentration von Nikotin (1×10^{-5} M/L) gemeinsam mit steigenden Konzentrationen des Metylycaconitin appliziert (1×10^{-7} M/L, 5×10^{-7} M/L, 1×10^{-6} M/L, 5×10^{-6} M/L).

Bei Applikation der niedrigsten Konzentration des Blockers (1×10^{-7} M/L) kam es zu einer durchschnittlichen Dilatation von 1,20 % an den endothelintakten und vorkonstringierten Gefäßen, wohingegen bei den endotheldenudierten Gefäßen kein Effekt nachgewiesen werden konnte. Bei einer Konzentration von 5×10^{-6} M/L zeigten die endothelintakten Gefäße eine durchschnittliche Dilatation von 8,20 %, während die endotheldenudierten Gefäße um 2,00 % im Durchschnitt dilatierten.

Diese Dilatation war niedriger als der Gefäßdurchmesser vor Applikation der EC₅₀ Konzentration von Nikotin. Es kommt also trotz Metylycaconitin zu einer Konstriktion des Gefäßes.

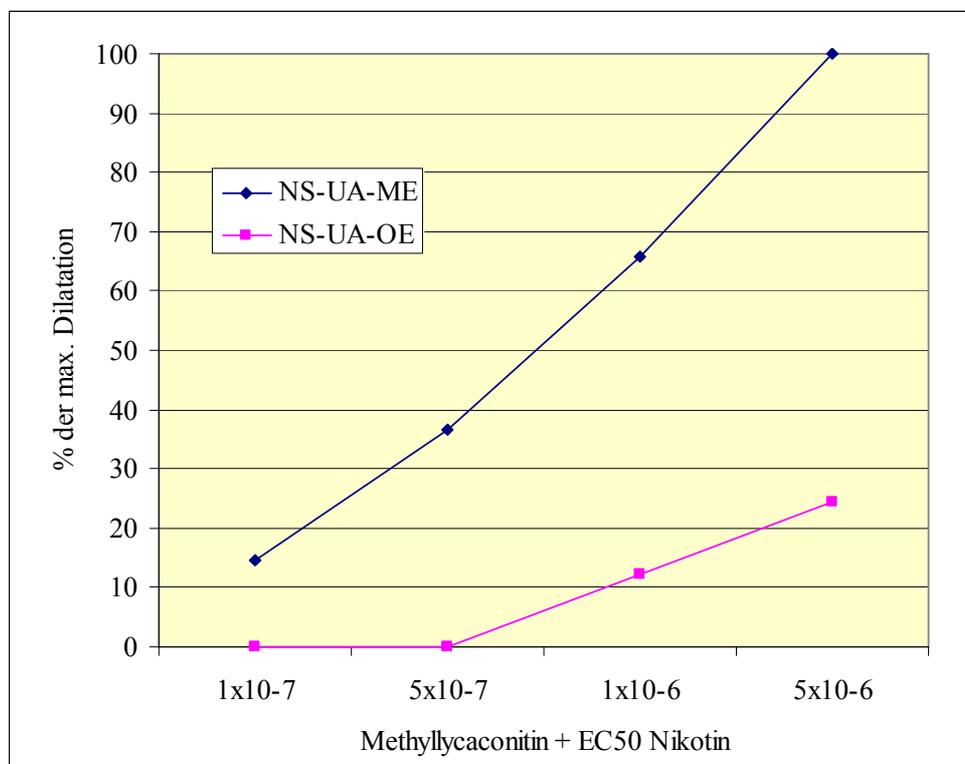


Abb. 15: Dosiswirkungskurve der Metylycaconitin + EC₅₀ Nikotin Applikation an der endothelintakten (ME) und endotheldenudierten (OE) A. uterina (UA) von nicht-trächtigen Ratten (NS)

4.6. Applikation von Dihydro- β -Erythroidin und EC₅₀ Nikotin an der A. uterina von nicht-trächtigen Ratten:

Als Blocker der $\alpha_4\beta_2$ -nAChR-Untereinheiten wurde Dihydro- β -Erythroidin verwendet. Es erfolgten fünf Versuche an endothelintakten Gefäßen und ein Versuch an einem endotheldenudierten Gefäß. Die EC₅₀ Konzentration von Nikotin (5×10^{-5} M/L) wurde gemeinsam mit steigenden Konzentrationen des Dihydro- β -Erythroidin appliziert (1×10^{-7} M/L, 5×10^{-7} M/L, 1×10^{-6} M/L, 5×10^{-6} M/L).

Als Reaktion auf die niedrigste Konzentration des Dihydro- β -Erythroidin (1×10^{-7} M/L) kam es zu einer Dilatation von 3,80 % im Durchschnitt an den endothelintakten Gefäßen, wohingegen bei dem endotheldenudierten Gefäß kein Effekt nachgewiesen werden konnte. Eine durchschnittliche Dilatation von 32,80 % zeigten die endothelintakten Gefäße bei einer Konzentration von 5×10^{-6} M/L, wohingegen das endotheldenudierte Gefäß nur um 8 % dilatierte. Durch Zugabe der höchsten DHBE Konzentration kam es zur vollständigen Aufhebung der Praekonstriktion des Gefäßes. Damit war die Praekonstriktion durch DHBE vollständig reversibel.

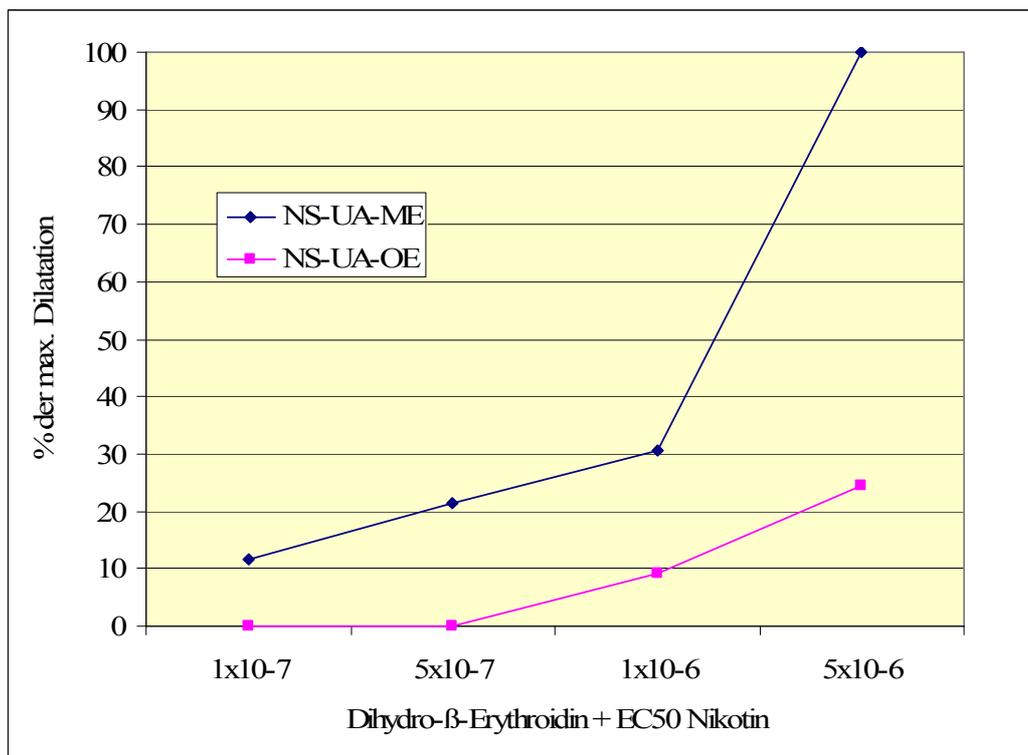


Abb. 16: Dosiswirkungskurve der Dihydro- β -Erythroidin + EC₅₀ Nikotin Applikation an der endothelintakten (ME) und endotheldenudierten (OE) A. uterina (UA) von nicht-trächtigen Ratten (NS)

Ergebnisse

4.7. Applikation von Nikotin an der A. uterina von nicht-trächtigen Ratten im Ca-freien Medium:

In einem weiteren Versuchsabschnitt wurden steigende Nikotinkonzentrationen an der A. uterina von nicht-trächtigen Ratten appliziert, jedoch handelte es sich hier um ein Ca^{2+} -freies Medium (PBS). Auch dieser Versuchsabschnitt erfolgte je fünf Mal an endothelintakten und fünf Mal an endotheldenudierten Gefäßen.

Bei einer Nikotinkonzentration von 1×10^{-7} M/L konnte bei den endothelintakten und bei den endotheldenudierten Gefäßen kein Effekt nachgewiesen werden konnte. Die stärkste Konzentration (1×10^{-3} M/L) löst an den endothelintakten Gefäßen eine Konstriktion von durchschnittlich 25,50 % aus, während bei den endotheldenudierten Gefäßen lediglich eine Konstriktion von durchschnittlich 5,40 % erfolgte.

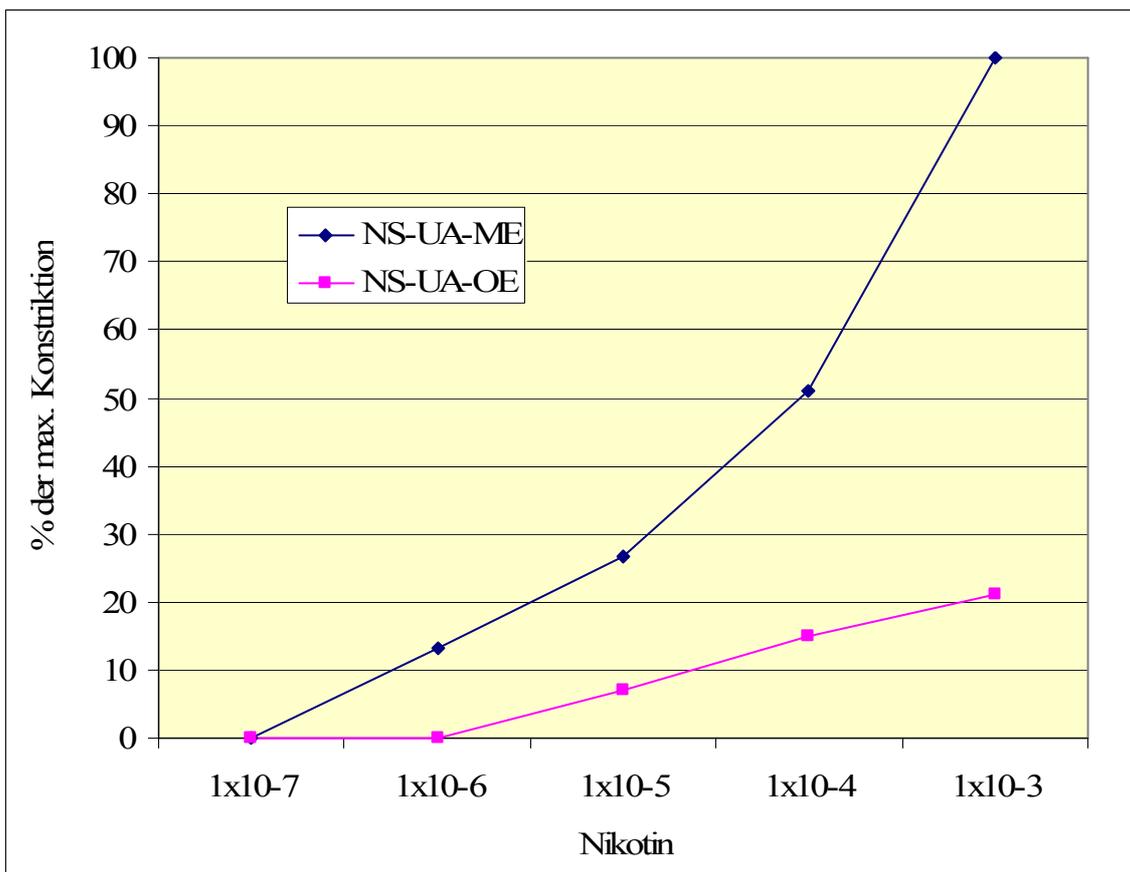


Abb. 17: Dosiswirkungskurve der Nikotinapplikation an der endothelintakten (ME) und endotheldenudierten (OE) A. uterina (UA) von nicht-trächtigen Ratten (NS) im Ca-freien Medium (PBS)

5. Diskussion

Eine Voraussetzung für ein zeitgerechtes intrauterines Wachstum des Feten ist eine dem Bedarf angemessene uterine Perfusion. Die fetale Versorgung mit Nährstoffen kann durch viele Faktoren, wie unter anderem durch Zigarettenkonsum, so gestört werden, dass eine Beeinflussung des kindlichen Wachstums resultiert.

Rauchen während der Schwangerschaft führt zu reduziertem fetalen Wachstum und Geburtsgewicht (Figueras 2007, Mitchell et al. 2002). Albuquerque hat in seinen sonographischen Untersuchungen von rauchenden und nicht rauchenden Schwangeren eine Veränderung von uterin arteriellen Widerstandsverhältnissen nachgewiesen (Albuquerque et al. 2004). Aber auch rauchloser Tabakkonsum hat negative Auswirkungen, so konnte in einer Studie in Indien mit tabakkauenden Müttern ein niedrigeres Geburtsgewicht als Folge des Tabakkonsums demonstriert werden (Gupta et Sreevidya 2004). Ein Hauptbestandteil des Tabaks ist das Nikotin. Durch Tierversuche konnte nachgewiesen werden, dass auch die alleinige Verabreichung von Nikotin den gleichen Effekt zeigt: In Experimenten mit Ratten, Rhesusaffen und Schafen, führte die alleinige Nikotinapplikation zu einem gesteigerten uterin arteriellen Widerstand (Clark und Irion 1992, Suzuki et al. 1980, Birnbaum et al. 1994). Es kommt zu einer Reduktion des uterin arteriellen Blutflusses um 38-42 % verbunden mit einer messbaren fetalen Azidose und Hypoxie (Suzuki et al. 1980). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass es bei Nikotinapplikation im Tiermodell (Ratten und Rhesusaffen) zu einer Reduktion des Geburtsgewichts im Vergleich zu Kontrolltieren kommt (Gauda et al. 2001, Grove et al. 2001).

Zusammengefasst liegt die Vermutung nahe, dass Nikotin durch Veränderung der uterinen Widerstandsverhältnisse und der uterinen Perfusion zu einer Veränderung der fetalen Versorgung, sprich des fetalen Wachstums, beitragen könnte.

Vor diesem Hintergrund ist es das Ziel dieser Studie, die Auswirkungen von Nikotin auf die Gefäßmotorik der A. uterina im Arteriographensystem nach Halpern zu untersuchen: Dazu soll die Vasokonstriktion der A. uterina nach Nikotinapplikation quantifiziert werden und der funktionelle Nachweis erbracht werden, dass nAChR vom neuronalen Typ diese nikotininduzierte Vasokonstriktion vermitteln. Gleichzeitig soll die Rolle des Endothels, der Einfluss von Hormonen in der Gravitätät und von Ca^{2+} in Bezug auf die Vasokonstriktion untersucht werden.

Diskussion

Es stellt sich die Frage, welchen Einfluss Nikotin auf die A. uterina hat: Bei den Versuchen mit alleiniger Nikotinapplikation zeigte sich deutlich eine dosisabhängige Vasokonstriktion der A. uterina. Jedoch könnten auch hormonelle Schwankungen diese Nikotinwirkung beeinflussen. Daher wurde der Zyklusstand der nicht-trächtigen Ratten bestimmt um einen Einfluss auf die Nikotinwirkung auszuschließen. Es konnte kein Einfluss der Zyklusphase nachgewiesen werden. Ebenso wurden die Gefäße von früh- und spätträchtigen, sowie nicht-trächtigen Tieren miteinander verglichen um festzustellen, ob das Bestehen einer Gravidität das Ausmaß der Vasokonstriktion beeinflusst. Obwohl in unkorrigierten Ergebnissen ein Einfluss vorhanden zu sein schien, bestätigte sich dieser in der Signifikanzprüfung nicht.

Es ist zu vermuten, dass nAChR die Vasokonstriktion vermitteln. Um nachzuweisen, ob nAChR vom neuronalen Typ beteiligt sind, wurden Versuche mit dem Blocker Hexamethonium durchgeführt. Da es bei Versuchen mit Hexamethonium zu einer vollständigen Blockade kommt, ist der Nachweis erbracht, dass es sich um neuronale nAChR handelt, die die Konstriktion bewirken. Weitere Versuche mit Metylycaconitin und Dihydro- β -Erythroidin dienten dem Nachweis, welche Untereinheiten der nAChR an der Konstriktion beteiligt sind. Hierbei zeigt sich, dass sowohl α_7 - als auch $\alpha_4\beta_2$ -nAChR Untereinheiten einen Beitrag zur Konstriktion leisten. Dabei führt die Blockade der α_7 -nAChR-Untereinheiten zu einer um 50% reduzierten und die Blockade der $\alpha_4\beta_2$ -nAChR-Untereinheiten zu einer vollständigen Aufhebung der durch Nikotin induzierten Vasokonstriktion. In allen Fällen ist die Blockade reversibel.

Um die Beteiligung des Endothels an der nikotininduzierten Vasokonstriktion zu untersuchen wurde Nikotin auch an endothelenundierten Gefäßen appliziert. Es zeigte sich in allen Versuchsgruppen eine deutliche Abschwächung der Konstriktion der Gefäße. In den Versuchen mit und ohne Ca^{2+} im Medium zeigte sich ein deutlicher Effekt des Ca^{2+} auf die Vasokonstriktion.

5.1. Diskussion von Material und Methoden

5.1.1. Wahl des Versuchsmodells

Nicht alle Arterien sind cholinerg innerviert. Sowohl beim Menschen (Amenta et al 1979) als auch beim Meerschweinchen (Bell et al. 1968) und der Ratte (Sato et al. 1996) findet man eine cholinerge Innervation der uterinen Arterien.

Bei dieser Studie wurde das Ratten-Modell gegenüber der Verwendung humaner Gewebe präferiert: Vorteil des Ratten-Modells ist die gute Reproduzierbarkeit von genetisch ähnlichen

Diskussion

Tieren (Zuchtlinie Sprague-Dawley) unter einheitlichen Haltungsbedingungen. Versuche an humanem Gewebe sind schwieriger durchzuführen, da diese Gewebe nicht zu jeder Zeit in der gewünschten Menge vorliegen und genetisch eine starke Varianz bestehen kann.

5.1.2. Allgemeiner Versuchsaufbau im Arteriographen

Während Salaices et al. (1983), Ljung et al. (1987) und Sorajja et al. (2005) die Versuche an Arterien nur im Gefäßbad durchgeführt haben, wurde in den vorgestellten Versuchen mit dem Arteriographensystem nach Halpern ein System gewählt, das bereits durch verschiedene früher erfolgte Versuche im Mikrogefäßlabor ständig optimiert wurde (Hermsteiner et al. 1999, 2001, 2002). Durch das Vorhandensein eines inneren Kreislaufs mit konstanten Druckverhältnissen, der das Blut im Körper repräsentieren soll, und eines äußeren Gefäßbads ebenfalls in Form eines äußeren Kreislaufs, der das umliegende Gewebe repräsentiert, kommt dieses System den natürlichen Bedingungen im Organismus deutlich näher und ist daher für diese Art von Versuchen zu bevorzugen.

5.1.3. Methode der Deendothelierung

1989 wurde die Methode, mit einem menschlichen Haar das Endothel von kleinen Arterien abzulösen, zum ersten Mal als einfache und effektive Methode beschrieben (Osol et al. 1989). Diese Methode wurde auch in unseren Versuchen verwendet (nur wurde das menschliche Haar durch ein Pferdehaar ersetzt), es zeigte sich eine Endothelabhängigkeit der Vasokonstriktion. Durch die Entfernung des Endothels kommt es zu einer Abschwächung der Vasokonstriktion. Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte verifiziert werden, dass durch die von Osol et al. beschriebene Methode das Endothel vollständig entfernt wird (Hermsteiner et al. 1999). Eine weitere Möglichkeit, die die Abschwächung der Vasokonstriktion erklären könnte, wäre der unerwünschte Effekt der Zerstörung von vaskulären Muskelzellen (VSMC). Um letztere Möglichkeit auszuschließen wurden die Gefäße am Ende jedes Versuches mit U46619 durchspült, einem potenten Vasokonstriktor (dosisabhängige Vasokonstriktion, gezeigt in der Studie von García-Villalón et al. 2005), um die Konstriktionsfähigkeit durch intakte VSMC zu beweisen. Da dieser Versuchsabschnitt in allen Fällen positiv war, kann eine Schädigung der Muskelzellen ausgeschlossen werden.

5.1.4. Weitere funktionelle Versuche in der Zukunft

Es muss bedacht werden, dass auch praeterminale Neurone der Uterinarterienwand zur Konstriktion führen könnten:

Perivaskuläre cholinerge Nerven formieren an der Grenze von Media zu Adventitia einen weitverzweigten Gefäßplexus von postganglionären Neuronenabschnitten. Diese Axone finden sich selektiv nur in Gefäßen bestimmter Organe (Schneider et al. 2003), z.B. auf Koronararterien (Schäfer et al. 1998), Lungenarterien (Haberberger et al. 1997) und den humanen Uterinarterien (Amenta et al. 1979). Da die A. uterina cholinerg innerviert ist, ist nicht auszuschließen, dass praeterminale nAChR auf perivaskulären Nervenendigungen an der nikotininduzierten Gefäßkonstriktion beteiligt sind (Kummer und Haberberger 1999). Um auszuschließen, dass Nikotin auf das extrinsisch-adventitielle cholinerge System wirkt und die Vasokonstriktion hierüber vermittelt wird, sind Versuche mit Tetrodotoxin (TTX) durchzuführen. TTX ist in der Lage selektiv praeterminale nAChR zu inhibieren. Wenn keine praeterminalen nAChR des perivaskulären uterin arteriellen Nervenplexus an der Vermittlung der nikotinbedingten Vasokonstriktion der A. uterina beteiligt sind, müsste im Arteriographensystem das Ausmaß der uterin arteriellen Durchmesseränderung nach TTX-Gabe unverändert bleiben. Ay et al. zeigten, dass TTX die durch ACh verursachte Dilatation an der isolierten Niere der Ratte hemmt, woraus sie schlossen, dass Mediatoren, die durch die Nervenenden im Gefäßendothel freigesetzt werden, an der ACh vermittelten Dilatation beteiligt sind (Ay et al. 2000). Allerdings handelt es sich dabei um einen Versuch mit einem vollständigen Organ, während in unseren Versuchen die isolierte A. uterina Versuchsobjekt war. In weiteren Versuchen wiesen sie nach, dass sowohl das Endothel, als auch die afferenten Nerven eine Rolle bei der ACh verursachten Vasodilatation der Niere spielen (Ay und Tuncer 2006). Tsybenko et al. (2007) vermuteten, dass die Vasokonstriktion durch ACh in der Portalvene entweder durch nikotinische cholinerge Rezeptoren auf der Membran der Endothelzellen oder durch adrenerge Endigungen der Lebervenen vermittelt wird. Diese Zellen und Nervenendigungen setzen Transmitter frei, die die Muskelschicht der Gefäßwand beeinflussen und ihre Kontraktion verursachen. Da jedoch durch den Einsatz von TTX die Konstriktion nur um 10 % gemindert werden konnte, ist davon auszugehen, dass der größte Teil der Vasokonstriktion non-neuronal vermittelt ist. Bei unseren Versuchen ist ein deutlicher Effekt des Endothels nachgewiesen worden, was zumindest gegen einen alleinigen Einfluss von neuronalen praeterminalen AChR spricht.

Diskussion

5.1.5. Weitere morphologische Versuche in der Zukunft

Die vorgestellten Versuche erbringen den funktionellen Hinweis für die Beteiligung von nAChR an der Konstriktion der A. uterina, allerdings müsste zur Vollständigkeit in weiteren Versuchen noch der morphologische Beweis durch den Nachweis von RNA und Proteinen erbracht werden.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

5.2.1. **Effekt von Nikotin** an der A. uterina

Diese Studie zeigt, dass Nikotin in der Gefäßwand der A. uterina zu einem dosisabhängigen Effekt führt, d.h. den Gefäßtonus verändert. So wird bei der Applikation von steigenden Nikotinkonzentrationen (1×10^{-7} M/L, 1×10^{-6} M/L, 1×10^{-5} M/L, 1×10^{-4} M/L, 1×10^{-3} M/L) an Gefäßen von nicht-trächtigen Ratten eine Vasokonstriktion beobachtet. Im Einklang mit den Ergebnissen dieser Studie wiesen Okamura et al. (1995) ebenfalls eine Kontraktion der A. uterina von Hunden als Folge einer Nikotinapplikation nach. Auch Xiao et al. zeigten in ihren Versuchen, dass Nikotin die Motorik der A. uterina von spätträchtigen Schafen beeinflusst, indem es zu einer Erhöhung des Gefäßwiderstandes und damit zu einer Abnahme der Perfusion des Uterus führt (Xiao et al. 2007).

5.2.2. Einfluss der **Hormonlage** auf die Kontraktion

Es stellt sich jedoch die Frage, ob die aktuelle Hormonlage des Organismus die Nikotinwirkung beeinflusst. Durch Bestimmung des Zyklusstandes wurde dieser Effekt kontrolliert, ein Einfluss konnte nicht nachgewiesen werden. Auch Dynarowicz und Dziegielewski (1987) konnten an der A. uterina des Schweins keinen Effekt des Zyklus auf die Reaktion nach Nikotinapplikation nachweisen.

5.2.3. Einfluss einer **Gravidität** auf die Kontraktion

Bei den endothelintakten Gefäßen kam es zu einer Konstriktion zwischen 2 und 27 % bei frühträchtigen und zwischen 3,2 und 30,8 % bei den spätträchtigen Tieren. Auch wenn anhand der Zahlen scheinbar ein Unterschied zwischen den verschiedenen Stadien der Gravidität und damit zwischen unterschiedlichen hormonellen Einflüssen besteht, konnte dieser in der Signifikanzprüfung nicht bestätigt werden.

Vor Prüfung der Signifikanz entsteht der Eindruck, dass die Gefäße in den unterschiedlichen Stadien der Gravidität eine abweichende Kontraktionsintensität aufweisen. Gefäße von

Diskussion

frühträchtigen Ratten reagieren scheinbar weniger stark, als Gefäße von nicht-trächtigen und solche von späträchtigen Tieren zeigen die stärkste Konstriktion. Rechnerisch ist jedoch kein signifikanter Einfluss der Gravidität nachweisbar ($p = 0,193$). Da auch die Zyklusphase keinen Einfluss auf die Veränderung des Gefäßdurchmessers hat, scheint die Nikotinreaktion nicht durch Hormone beeinflusst zu werden. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Jovanovic et al. (1994a) überein, hier konnte kein Unterschied in der Reaktion der A. uterina auf ACh abhängig vom Graviditätsstatus festgestellt werden.

5.2.4. funktionelle Beteiligung von nAChR

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen eine deutliche Vasokonstriktion durch die Applikation von Nikotin. Es stellt sich die Frage, wodurch diese Vasokonstriktion vermittelt ist. Wie oben geschildert ist zu vermuten, dass Nikotin als cholinerges Agonist an nAChR auf die Regulationssysteme der Gefäße wirkt. Verschiedene Versuche bestätigen, dass nAChR als Bestandteile des non-neuronalen cholinergen Systems in der Blutgefäßwand, genauer auf den EC, vorhanden sein müssen. So führt die Applikation von ACh an der isolierten thorakalen Kaninchenaorta zu einer Vasodilatation (Furchgott und Zawadzki 1980). Dieser Effekt wird durch eine endotheliale NO-Freisetzung vermittelt. Die Applikation von Nikotin an der isolierten, komplett denervierten A. femoralis des Hundes führt zu einer Vasokonstriktion, die durch Hexamethonium, einem Agonisten neuronaler nAChR komplett reversibel war (Diana et al. 1990). Auch an der isolierten Koronararterie der Ratte kommt es durch Nikotin zu einer endothelabhängigen Kontraktion (Kurahashi et al. 2001). Macklin et al. (1998) konnten nachweisen, dass ungefähr 900 Bindungsstellen von nAChR an Endothelzellen vorhanden sind. Endothelzellen von Blutgefäßen exprimieren funktionale nAChR, die denen auf ganglionären Neuronen stark ähneln. Dabei sind α_3 , α_5 , β_2 - und β_4 -Untereinheiten mitbeteiligt (Macklin et al. 1998). Dies bestätigte auch Brüggmann et al. (2002), die α_3 -, α_5 -, α_7 - und α_{10} -nAChR-Untereinheiten auf den Endothelzellen der Arterie der Ratte nachwies.

Ob neuronale nAChR funktionell beteiligt sind, soll über Versuche mit Blockern geklärt werden. Hexamethonium führt zu einer vollständigen, aber reversiblen Blockade der nikotininduzierten Vasokonstriktion. Dieser Effekt ist auch an endothelndenudierten Gefäßen nachweisbar, allerdings in abgeschwächter Form. Dies beweist die funktionelle Beteiligung von neuronalen nAChR an der Vasokonstriktion. Diese Blockade der Nikotin vermittelten Vasokonstriktion durch Hexamethonium wurde auch von Diana et al. (1990) an der A. femoralis des Hundes und von Okamura et al. (1995) an der A. uterina des Hundes nachgewiesen.

Diskussion

Auf der Grundlage dieser Tatsache konnten die weiteren Versuche zur Spezifizierung der funktionell beteiligten Untereinheiten erfolgen. Metylylcaconitin, das zur Blockade von α_7 -Untereinheiten eingesetzt wird, führt lediglich zu einer um ca. 50 % reduzierten Vasokonstriktion durch Nikotin. Dies führt zu dem Schluss, dass außer α_7 -nAChR-Untereinheiten noch andere Untereinheiten an der Konstriktion beteiligt sein müssen. Dihydro- β -Erythroidin führt genau wie Hexamethonium zu einer vollständigen aber reversiblen Blockade der nikotininduzierten Vasokonstriktion. Daraus folgt, dass $\alpha_4\beta_2$ -nAChR-Untereinheiten an der Vasokonstriktion beteiligt sind. Es stellt sich die Frage warum DH β E zu einer vollständigen Hemmung der Vasokonstriktion führt, wenn auch α_7 -Untereinheiten an der Konstriktion beteiligt sind. Bertrand et al (1992) zeigten in ihren Versuchen, dass DH β E auch ein kompetitiver Antagonist am α_7 -Rezeptor ist. Diese vollständige Blockade könnte andererseits auch durch die geringe Sensibilität der verbleibenden α_7 -Untereinheiten gegenüber dem Agonisten Nikotin zu erklären sein. Weitere Versuche müssten zeigen, ob außer den $\alpha_4\beta_2$ - und α_7 -nAChR-Untereinheiten noch weitere Untereinheiten an der nikotinvermittelten Vasokonstriktion beteiligt sind.

Da es durch Endotheldenuodierung der Gefäße zu einer Abschwächung des Effektes kommt, müssen nAChR als Angriffspunkte für Nikotin auf dem Endothel vorhanden sein. Die vorliegenden Ergebnisse erbringen den funktionellen Hinweis auf non-neuronale nAChR auf dem Endothel als Teil des intrinsischen cholinergen Systems. Dies ist im Einklang mit dem **morphologischen Nachweis** in der Literatur: Brüggmann et al. (2002) wiesen nAChR in zellulären Bestandteilen der Gefäßwand nach. Weitere morphologische Versuche müssten die funktionell nachgewiesenen non-neuronalen nAChR-Untereinheiten in der A. uterina der Ratte nachweisen.

Dabei gibt es eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten der Untereinheiten, die funktionelle Rezeptoren ausbilden und damit an der A. uterina vorhanden sein können. Die 11 neuronalen nAChR-Untereinheiten können in zwei Klassen unterteilt werden, abhängig davon, ob eine α/β -Kombination notwendig ist um einen funktionellen Rezeptor zu bilden (obligate Heteromere) oder ob sie homomere Rezeptoren bilden (Palma et al. 1999). Typischerweise setzt sich der heteromere Rezeptor aus 2α und 3β - Untereinheiten zusammen (Nelson und Edwardson 2003). Dabei führt die unterschiedliche Zusammensetzung der nAChR aus den verschiedenen Untereinheiten zu nAChR mit sich deutlich unterscheidenden funktionellen Eigenschaften (Barrera et al. 2008). Eine Umkehr von $3\alpha:2\beta$ in $2\alpha:3\beta$ ist z.B. mit einer Erhöhung der ACh-Sensitivität und einer Reduktion der Ca^{2+} -Permeabilität verbunden (Nelson und Edwardson 2003). Auch konnte in Versuchen mit Xenopus Oozyten

Diskussion

nachgewiesen werden, dass α_7 - und β_2 -Untereinheiten sich zusammensetzen um einen funktionellen nAChR zu bilden, der sich in seinen funktionellen und pharmakologischen Eigenschaften deutlich vom homomeren α_7 -nAChR unterscheidet (Khiroug et al. 2002). Die α_5 -Untereinheit hat die spezifische Eigenschaft, dass sie nur in Kombination mit einer weiteren α - und β -Untereinheit einen funktionellen Rezeptor bilden kann (Ramirez-Latorre et al. 1996, Fucile et al. 1997). An bestimmten Lokalisationen im Körper überwiegen Rezeptoren mit einer spezifischen Zusammensetzung der Untereinheiten. Im Säugetier-Gehirn finden sich z.B. vor allem $\alpha_4\beta_2$ -nAChR, die eine hohe Affinität für Nikotin aufweisen (Nelson et al. 2003, Wu et al. 2006). Die funktionellen Eigenschaften hängen meist von den einzelnen Untereinheiten ab, so sind α_4 -Heteromere durch die stärkste Nikotinaffinität aller Untereinheiten charakterisiert (Arneric und Holladay 2000), während Homo- und Heteromere mit α_7 -Untereinheiten stark Ca^{2+} -permeabel (Seguela et al. 1993) sind, jedoch nur eine relativ geringe Affinität gegenüber ACh und Nikotin besitzen (Arneric und Holladay 2000).

In dieser Studie wurde der funktionelle Nachweis für das Vorliegen von α_7 - und $\alpha_4\beta_2$ -nAChR-Untereinheiten erbracht, es ist jedoch davon auszugehen, dass weitere Untereinheiten an der A. uterina vorkommen. Zur genaueren Charakterisierung wären sowohl weitere funktionelle Versuche mit Blockern, als auch morphologische Studien zum Nachweis der RNA notwendig. Eine Übersicht über mögliche Kombinationen der Untereinheiten, die zu funktionellen Rezeptoren führen, ist in der Tabelle in Anhang 8.1 dargestellt.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurde der funktionelle Nachweis einer Beteiligung von α_4 - und α_7 -Untereinheiten erbracht, jedoch könnten auch noch andere Untereinheiten an der Konstriktion beteiligt sein. Wie oben beschrieben gibt es eine Vielzahl möglicher Kombinationen der Untereinheiten. Die Studien von Macklin et al. (1998) und Brüggmann et al. (2002) weisen diese Untereinheiten qualitativ nach, so dass wir von α_3 -, α_4 -, α_5 -, α_7 -, α_{10} -, β_2 - und β_4 -nAChR-Untereinheiten auf den Endothelzellen ausgehen können, jedoch sind weitere Experimente zum quantitativen Nachweis der Rezeptorzusammensetzung notwendig.

5.2.5. Lokale Wirkung von Nikotin im Gefäß

Angriffspunkt für den cholinergen Agonisten Nikotin sind die cholinergen Systeme der Arterienwand. Dabei wirkt Nikotin auf die verschiedenen cholinergen Systeme in der Arterienwand:

5.2.5.1. Nikotin als cholinerges Agonist beeinflusst cholinerge Systeme

Als cholinerges Agonist hat Nikotin einen Einfluss auf die cholinergen Regulationssysteme des Gefäßtonus der A. uterina:

Dieses Regulationssystem ist ein **Zusammenspiel von intrinsischem und extrinsischem System**. Das intrinsisch-intimale System dient als genereller Regulator des basalen vaskulären Tonus und der Wandstruktur und reagiert auf lokale Stimuli aus dem Lumen (Kummer und Haberberger 1999, Schneider et al. 2003). Die perivaskulären Nervenfasern reagieren auf systemische Stimuli mit einer entsprechenden ACh-Freisetzung. Auf diese Weise kommt es zur Feinabstimmung des Gefäßbasaltonus auf systemische Bedürfnisse (Kummer und Haberberger 1999).

Es existieren also zwei cholinerge Systeme mit verschiedenen Aufgaben hinsichtlich des Tonus:

- das **intrinsisch-intimale cholinerge** System, das sich in der Gefäßwand befindet und v.a. durch die Funktion der Endothelzellen repräsentiert wird und
- das **extrinsisch-adventitielle cholinerge** System, das durch autonome perivaskuläre cholinerge Nervenfasern repräsentiert wird (Schneider et al. 2003).

5.2.5.2. Nikotin wirkt an EC

Bei den endothelintakten Gefäßen kam es zu einer Konstriktion zwischen 4,2 und 29,25 % bei nicht-trächtigen Tieren, zwischen 2 und 27 % bei frühträchtigen und zwischen 3,2 und 30,8 % bei den späträchtigen Tieren. Währenddessen wiesen die endothelentnudierten Gefäße nur eine Konstriktion zwischen 0 und 9 % bei nicht-trächtigen, zwischen 0 und 11,6 % bei frühträchtigen und zwischen 0 und 10,2 % bei späträchtigen Ratten auf. Dies zeigt, dass bei Entfernung des Endothels eine um $\sim 2/3$ reduzierte Reaktion auf die Nikotinapplikation festgestellt werden konnte, wobei es sich um einen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) handelt.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass das Endothel eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Vasokonstriktion spielt. Da dieses nicht cholinerg neuronal innerviert wird, muss Nikotin am **intrinsisch-intimalen cholinergen** System wirken, das sich in der Gefäßwand befindet und **im Wesentlichen** die Funktion der **Endothelzellen** repräsentiert, weil bei den Gefäßen ohne Endothel eine Reduktion des vasokonstriktiven Effektes von Nikotin vorliegt.

Einer der ersten Hinweise, dass in Blutgefäßen ebenfalls ein **non-neurales cholinerges** System existieren muss, wurde 1980 von Furchgott und Zawadzki erbracht. Sie wiesen nach,

Diskussion

dass es an der Kaninchenaorta – einem nicht cholinerg innervierten Blutgefäß – durch ACh zu einer Relaxation kommt (Furchgott und Zawadzki 1980). Im Anschluss an diese Beobachtung wurden in verschiedenen Studien funktionelle Bestandteile des cholinergen Systems in vielen Geweben des Säugetierorganismus gefunden, wodurch die Existenz eines non-neuronalen cholinergen Systems bestätigt werden konnte. So konnte z.B. ChAT in der Plazenta (Pfeil et al. 2004, Bhuiyan et al. 2006), VACHT in Plazenta und Endothelzellen (Pfeil et al. 2004, Kirkpatrick et al. 2001) und OCTs in Plazenta, Leber, Niere, Dünndarm, Gehirn, Herz und anderen Geweben (Jonker et Schinkel 2004, Michel et al. 2006) nachgewiesen werden, woraufhin Wessler et al. (1998) das „non-neuronale cholinerge System“ beschrieben. Es konnten in verschiedenen Geweben auch nAChR und ihre Untereinheiten nachgewiesen werden, wodurch die Nikotinwirkung erklärt werden könnte. So wurden gezeigt, dass im Urothel der Maus α_2 -, α_4 -, α_5 -, α_6 -, α_7 -, α_9 - und α_{10} -nAChR-Untereinheiten (Zarghooni et al. 2007) und in der Plazenta des Menschen und der Ratte sämtliche α -Untereinheiten des nAChR (Lips et al 2005) vorkommen.

Auch im Gefäßsystem gibt es ein non-neuronales cholinerges System. Die vorliegende Studie zeigt Hinweise auf ein non-neuronales cholinerges System in der Wand der A. uterina. Also ist anzunehmen, dass die nachgewiesenen nAChR Teil eines ganzen Systems sind:

ACh wird durch die Cholinazetyltransferase (ChAT) synthetisiert. ChAT-Immunreaktivität konnte in koronar- (Milner et al. 1989) und in pulmonalarteriellen (Haberberger et al. 2000) und in zerebralkortikalen EC (Parnavelas et al. 1985, Arneric et al. 1988) nachgewiesen werden. In humanen zerebralen Mikrogefäßen erfolgte der Nachweis von CarAT – einem weiteren Enzym der ACh-Synthese (Kalaria und Harik 1992). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die vaskulären Endothelzellen ACh auch tatsächlich produzieren (Kirkpatrick et al. 2001) und freisetzen (Kawashima et al. 1990).

In den synthetisierenden Zellen wird ACh durch den vesikulären ACh-Transporter (VACHT) in Vesikeln gespeichert. In pulmonalarteriellen Endothelzellen von Ratte, Mensch und Schwein konnte VACHT durch RT-PCR und Immunhistochemie nachgewiesen werden (Haberberger et al. 2000). VACHT Epitope konnten ebenfalls in intrazellulären Vesikeln in den Endothelzellen durch Immunelektronenmikroskopie nachgewiesen werden (Kirkpatrick et al. 2001). Nach seiner Bildung durch Endothelzellen wird ACh zügig freigesetzt, wie an kultivierten EC der A. carotis des Rindes mittels Radioimmunoassay und Hochauflösungschromatographie gezeigt werden konnte (Kawashima et al. 1990). Milner et al. (1990) wiesen nach, dass eine ACh-Sekretion aus kultivierten humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) durch Scherstress hervorgerufen werden kann.

Diskussion

Polyspezifische OCT bieten eine Möglichkeit ACh über die Plasmamembran der Synthesezelle in den Extrazellulärraum auszuschütten (Gründemann et al. 1998). In den EC von zerebralen Mikrogefäßen der Ratte konnte OCT1 nachgewiesen werden (Friedrich et al. 2001). Die Spaltung von ACh und damit der Abbau erfolgt durch Azetylcholinesterasen in Erythrozyten und durch unspezifische Cholinesterasen im Blut (Wessler et al. 1998). AChE konnte in den Zellmembranen der EC aus der humanen Nabelschnur nachgewiesen werden (Carvalho et al. 2005). Lan et al. (1996) wiesen AChE auch in der Basallamina unter den EC in zerebralen Gefäßen nach.

Essentiell für eine weitere ACh-Synthese ist die Wiederaufnahme von Cholin in die Synthesezelle, die durch einen Cholintransporter erfolgt. Hamel et al. (1987) wiesen nach, dass die Cholinwiederaufnahme signifikant reduziert wurde, wenn sie das Endothel in zerebralen Arterien entfernten. In den Endothelzellen der Arterie von Ratten und Menschen gelang der Nachweis des hochaffinen Cholintransporters (ChT1), der die Wiederaufnahme von Cholin in die Zelle sicherstellt (Lips et al. 2003).

5.2.5.3. Nikotin wirkt an VSMC

Durch die Entfernung des Endothels kommt es zu einer Abschwächung, jedoch nicht zu einer vollständigen Verhinderung der Vasokonstriktion. Da bei diesen Versuchen die Rezeptoren auf den Endothelzellen jedoch nicht mehr vorhanden sind, müssen andere nAChR den Angriffspunkt für das Nikotin darstellen und die Konstriktion vermitteln. Es ist davon auszugehen, dass vaskuläre glattmuskuläre Zellen (**VSMC**) diese Kontraktion vermitteln. Auch in anderen Studien konnte an **endothelndenudierten** Gefäßen eine Wirkung von nAChR-Agonisten nachgewiesen werden. An der Kaninchenaorta, einem nicht cholinerg innervierten Blutgefäß, führt ACh nach Entfernung des Endothels weiterhin zu einer Kontraktion (Furchgott und Zawadzki 1980). Bei Applikation von ACh kommt es an der A. uterina von Mensch und Meerschweinchen zu einer **endothelabhängigen** Relaxation (Jovanovic et al. 1994b, Jovanovic et al. 1997). Dahingegen zeigten Leung et al. (2006), dass steigende Konzentrationen von ACh zu einer steigenden Relaxation der zuvor mit Phenylephrin vorkontrahierten endothelintakten A. femoralis der Ratte führen, sie konnten aber an endothelndenudierten Arterien diese Relaxation nicht mehr nachweisen. Im Gegensatz dazu konnten auch weitere Studien eine Endothelabhängigkeit der Nikotinwirkung an der A. carotis und den Koronararterien von Schweinen und von Ratten (Conklin et al. 2001, Kurahashie et al. 2001), sowie an der A. uterina von nicht-trächtigen Meerschweinchen (Jovanovic et al. 1995) und Hunden (Péšic et al. 2003) nachweisen. Bei den vorliegenden

Diskussion

Ergebnissen stellt sich die Frage, ob durch die Entfernung des Endothels evtl. die Muskelschicht so weit zerstört wird, dass keine vollständige Konstriktion mehr möglich ist und somit die nachgewiesenen Effekte nicht aufgrund des fehlenden Endothels, sondern durch die Zerstörung tieferer Schichten zustande kommen. Wie aber bereits beschrieben kann dies in der vorliegenden Studie ausgeschlossen werden (Hermsteiner et al. 1999).

Die isolierte endothelfreie Arterie kann auch durch Nikotin dilatiert werden. Li und Duckles (1993) zeigten einen vasorelaxierenden Effekt von Nikotin an der A. mesenterica und der Schwanzarterie der Ratte. Da dieser Effekt durch Hexamethonium, einem Blocker neuronaler nikotinischer Rezeptoren, aufgehoben werden konnte, müssen glattmuskuläre nAChR diese Vasodilatation vermitteln. Sekhorn et al. (1999) konnten die vermuteten nAChR nachweisen: Sie wiesen nAChR mit α_7 -Untereinheiten in VSMC und Fibroblasten von intrapulmonalen Arterien von fetalen Affenlungen nach. Durch die Untersuchung von Rattenarterien gelang auch der Nachweis einer arterienspezifischen Verteilung der **glattmuskulären** nAChR-Untereinheiten (Brüggmann et al. 2002): nAChR mit α_3 -, α_5 -, α_7 - und α_{10} -Untereinheiten konnten in den VSMC aller muskulären und elastischen extraparenchymatösen Arterien, die α_2 -Untereinheit in elastischen Gefäßen mit Ausnahme der Aorta abdominalis und α_4 - und α_6 -Untereinheiten in peripheren Abschnitten elastischer Gefäße und in muskulären Arterien nachgewiesen werden. In Koronararterien konnten α_3 -, α_4 -, α_5 -, α_7 - und α_{10} -Untereinheiten, auf den VSMC der Lungenparenchymgefäße allerdings nur α_7 -Untereinheiten nachgewiesen werden (Brüggmann et al. 2002).

Da die **vaskulär glattmuskulären** Zellen Teil des intrinsisch-intimalen cholinergen Systems der Blutgefäßwand sind, müssen sie auch weitere Bestandteile des cholinergen Systems außer den nachgewiesenen nAChR aufweisen. Ein Nachweis war bisher jedoch nur für den hochaffinen Cholintransporter CHT1 in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen von Mensch und Ratte möglich (Lips et al. 2003).

5.2.5.4. Nikotinwirkung an praeterminalen Nervenendigungen

Um auszuschließen, dass der Nikotineffekt über praeterminale Nervenendigungen vermittelt wird, müssten Versuche mit TTX durchgeführt werden, wie bereits beschrieben.

5.2.5.5. Weitere Auswirkungen von Nikotin am Gefäß

Außer den beschriebenen Auswirkungen auf die Vasomotorik können die nAChR auf den EC und VSMC noch weitere Effekte vermitteln. Durch Versuche mit Nikotin konnten einige dieser Effekte nachgewiesen werden:

Diskussion

Wird Nikotin an Endothelzellen von menschlichen Nabelschnurvenen appliziert, so kommt es je nach Dosis zu unterschiedlichen Effekten. Nikotinkonzentrationen, die denen von Rauchern entsprechen, führen zu **morphologischen Veränderungen** der Zellen, wie Vakuolisierung in den Zellen und Veränderungen der Form der Zellen, während Nikotinkonzentrationen, die denen von gelegentlichen Rauchern entsprechen nur die zelluläre Proliferation, die Migration und Angiogenese verhindern (Park et al. 2008). Dahingegen zeigte Villablanca (1998), dass es in Abhängigkeit von der Nikotinkonzentration sogar zu einer **Zellproliferation** der vaskulären Endothelzellen kommen kann, jedoch zeigt sich auch hier eine Zytotoxizität bei höheren Konzentrationen. Diese Zytotoxizität steht im Zusammenhang mit einer Verhinderung der DNA-Synthese. Die Unterschiede zwischen den Effekten von Nikotin auf das Wachstum von Endothelzellen erklären sich vermutlich sowohl durch die Nikotinkonzentration, als auch durch die zelluläre Umgebung und scheinen durch nikotinische Rezeptoren auf den Endothelzellen vermittelt zu sein (Villablanca 1998).

Des Weiteren reguliert Nikotin die **Angiogenese** durch Stimulation der endogenen cholinergen Kaskade (Cooke 2007) und steigert die Angio- und Arteriogenese nach Unterbrechung der Perfusion in der A. femoralis der Ratte (Heeschen et al. 2003). Da es durch Hexamethonium zu einer Hemmung der proangiogenetischen Effekte von Nikotin kommt, wird die Neuvaskularisation vermutlich über α_7 -nAChRs vermittelt. Auch Heeschen et al. (2002) wiesen nach, dass eine Hemmung von nAChRs zu einer signifikanten und reversiblen Reduktion der Gefäßsystembildung von kultivierten Endothelzellen führt. Interessant ist auch die Feststellung, dass es durch Applikation von Nikotin auf Endothelzellen zu einer gesteigerten Endotheldenudation kommt (Conklin et al. 2001). Im Blut von Rauchern konnte eine erhöhte Anzahl von frei zirkulierenden Endothelzellen festgestellt werden.

5.2.6. Einfluss von Ca^{2+} auf die Nikotin induzierte Vasokonstriktion

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen ebenfalls einen signifikanten Einfluss von Ca^{2+} im Medium auf die Konstriktion der A. uterina ($p < 0,001$). Im Ca^{2+} -freien Medium ist die Gefäßkonstriktion um etwa ein Drittel vermindert. Dies gibt einen weiteren Hinweis auf das Vorliegen von nAChR in der Blutgefäßwand. Homo- und Heteromere mit α_7 -Untereinheiten sind stark Ca^{2+} -permeabel (Seguela et al. 1993), sie besitzen eine relativ geringe Affinität gegenüber ACh und Nikotin und Cholin wirkt an ihnen als voller Agonist (Armeric und Holladay 2000), desweiteren desensibilisieren sie sehr rasch (Olale et al. 1997). Auch die unterschiedliche Zusammensetzung der Rezeptoren aus den einzelnen Untereinheiten führt zu

Diskussion

veränderten Reaktionen auf Ca^{2+} , so ist z.B. eine Umkehr der Untereinheiten von $3\alpha:2\beta$ in $2\alpha:3\beta$ mit einer Reduktion der Ca^{2+} -Permeabilität verbunden (Nelson und Edwardson 2003). Fehlt Ca^{2+} im Extrazellulärraum, so kann es nicht durch Öffnung der nAChR ins Zellinnere gelangen und steht so nicht für Signaltransduktionsvorgänge zur Verfügung bzw. kann sich nicht an der Kontraktion glatter Muskelzellen beteiligen. Da sich durch das Ca^{2+} -freie Medium jedoch nur eine Abschwächung, nicht jedoch eine komplette Aufhebung des Effektes ergibt, müssen noch andere Mechanismen an der Konstriktion beteiligt sein.

5.3. Klinische Bedeutung der Ergebnisse

Sowohl im intrinsisch-intimalen cholinergen System, als auch im extrinsisch-adventitiellen cholinergen System spielen nikotinsche Azetylcholinrezeptoren eine wichtige Rolle. In dieser Studie wurde gezeigt, dass Nikotin an nAChR in der Gefäßwand binden kann und ihre Aufgaben bei der Regulation des Gefäßtonus stört. Durch die nicht mehr korrekt verlaufende Regulation des Gefäßtonus, die sich v.a. in einer Vasokonstriktion äußert, könnte dies zu einer Verminderung der uterinen Perfusion beitragen, was in der Gravidität langfristig zu einer Unterversorgung des Fetus führen könnte.

Rauchen während der Schwangerschaft steht im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für Fehlgeburten (Windham et al. 1999), einem verminderten Geburtsgewicht (Mitchell et al. 2002), einem verminderten Wachstum (Figueras 2007) und weiteren negativen Effekten auf die Schwangerschaft und das Ungeborene. Obwohl die negativen Effekte des Rauchens in der Schwangerschaft weitreichend bekannt sind, verzichten 2/3 der Raucherinnen auch während der Gravidität nicht auf das Rauchen (Studie in Großbritannien, Ward et al. 2007). In Deutschland rauchen 22 % der Frauen, mit einem leichten Anstieg der Anzahl in den letzten 10 Jahren (Statistisches Bundesamt 2008). Auch in Nordamerika rauchen 12 % der Frauen während der Schwangerschaft weiter (Shea und Steiner 2008).

Gupta und Sreevidya (2004) konnten nachweisen, dass es bei neugeborenen Kindern in Indien, deren Mütter Tabak kauten, zu einer Reduktion des Geburtsgewichts kam und auch eine schwedische Studie, zeigt ein vermindertes Geburtsgewicht, wenn die Mütter rauchlosen Tabak konsumierten. Allerdings ist die Reduktion des Geburtsgewichts deutlich niedriger als bei rauchenden Müttern, das Risiko einer Frühgeburt bleibt jedoch gleich hoch, egal auf welche Art und Weise der Tabak aufgenommen wird (England et al. 2003). Beim Menschen gibt es keine Studien, die die schädliche Wirkung von **alleinigem** Nikotinkonsum zeigen, man geht jedoch davon aus, dass Nikotin die Hauptursache der Schädigungen darstellt. Am Tiermodell (Ratten und Rhesusaffen) konnte gezeigt werden, dass es bei alleiniger

Nikotinapplikation zu einem reduzierten Geburtsgewicht im Vergleich zu Kontrolltieren kommt (Gauda et al. 2001, Grove et al. 2001). Wird Nikotin trächtigen Ratten im dritten Trimester der Gravidität appliziert, führt dies zu einer Verminderung des uterinen Blutflusses (Birnbaum et al. 1994). Daher ist zu vermuten, dass die Effekte durch Nikotin beim Menschen ähnlich sind.

Als Alternative zum Rauchen sind so genannte Nikotinersatzpräparate (wie z.B. Nikotinpflaster, Nikotinkaugummi, etc.) auf dem Markt (Ginzel et al. 2007). Diese Produkte werden auch in der Schwangerschaft angewandt. Die einzige hierzu durchgeführte Studie zeigt bei der Nikotinersatzpräparat-Gruppe jedoch keinen größeren Effekt mit dem Rauchen aufzuhören, als bei der Plazebo-Gruppe (Coleman et al. 2004). Wenn trotz Ersatzpräparaten weiter geraucht wird, kommt es sogar zu höheren Nikotinkonzentrationen im Blut. Gemeinsam mit den vorher erwähnten Wirkungen durch alleinigen Nikotinkonsum ist davon auszugehen, dass diese Ersatzpräparate ebenfalls schädlich für das Ungeborene sind und sie sind daher mit äußerster Vorsicht anzuwenden.

Ein weiterer Diskussionspunkt ist die Beeinflussung der Gravidität und des Ungeborenen durch Passivrauchen und Rauchen bis zum Zeitpunkt, an dem die werdenden Mütter von ihrer Schwangerschaft erfahren. Kinder von Müttern, die bis zur 32. Schwangerschaftswoche aufhören zu rauchen, zeigen keine Verminderung des Geburtsgewichts, Kopfumfangs und der Körper:Gehirn-Relation, sie weisen jedoch eine verminderte Scheitel-Steißlänge auf (Lindley et al. 2000). Birnbaum (1994) zeigte, dass eine Applikation von Nikotin an trächtige Ratten im dritten Trimester der Gravidität zwar zu einer Verminderung des uterinen Blutflusses führt, nicht jedoch zu einem verminderten fetalen Wachstum. Es ist davon auszugehen, dass es auf den Zeitpunkt der Nikotinapplikation ankommt, ob und auf welche Art der Fetus geschädigt wird. Im Vergleich zu nicht Tabakrauch ausgesetzten Ungeborenen führte Passivrauchen zu einem um 36 g und aktives Rauchen der Schwangeren zu einem um 146 g durchschnittlich reduzierten Geburtsgewicht (Ward et al. 2007). Dagegen konnten Steyn et al. (2006) in ihrer Studie keinen signifikanten Unterschied im Geburtsgewicht von Passivrauch ausgesetzten und nicht ausgesetzten Ungeborenen feststellen, jedoch wiesen sie ein um 165 g reduziertes Geburtsgewicht bei Kindern von rauchenden Schwangeren nach. Auch Maturba et al. wiesen in ihrer Studie nur einen sehr geringen Einfluss von Passivrauchen auf das fetale Wachstum nach (Maturba et al. 2000), wobei jedoch bedacht werden muss, dass das Passivrauchen nicht quantifiziert werden kann und daher die Vergleichbarkeit sehr schwierig ist.

Diskussion

Auch in Bezug auf die neurologische Entwicklung des Kindes konnten inzwischen einige negative Folgen des Rauchens in der Schwangerschaft nachgewiesen werden: Intrauterin kommt es zu einer Störung der neurophysiologischen Entwicklung des Kindes. Kinder rauchender Mütter zeigen häufiger Verhaltensstörungen und weisen einen niedrigeren Intelligenzquotienten auf (Shea und Steiner 2008). Es kann eine inverse Beziehung zwischen mütterlichem Rauchen während der Schwangerschaft und dem Intelligenzquotienten des Kindes festgestellt werden. Dieser Einfluss ist jedoch nicht signifikant (Batty et al. 2006). Kinder mit einem niedrigeren Geburtsgewicht haben ein höheres Risiko Verhaltensprobleme aufzuweisen, bei Jungen ist dies oft Hyperaktivität, bei Mädchen Probleme Beziehungen zu Gleichaltrigen aufzubauen (Kelly et al. 2001). Allerdings spielen hier auch andere Faktoren, wie sozialer Status etc. eine Rolle. Der Nikotinkonsum wird also nicht alleine für Verhaltensprobleme verantwortlich sein, er führt jedoch zu einer Beeinflussung der Gehirnentwicklung während der Schwangerschaft. Bereits ab der 4.-5. Woche der Gravidität finden sich nAChR-Proteine im menschlichen Gehirn. Dies zeigt, dass bereits in dieser frühen Phase ein Risiko für eine Störung der fetalen Gehirnentwicklung durch Nikotinkonsum der Mutter besteht (Hellstrom-Lindahl et al. 2001). Källén (2000) wies in ihrer Studie nach, dass Rauchen während der Schwangerschaft zu einem reduzierten Kopfumfang bei Neugeborenen führt und schloss daraus, dass auch die Gehirnentwicklung negativ beeinflusst wird. Auch wenn einige der negativen Effekte des Rauchens durch eine Reduzierung der gerauchten Zigaretten pro Tag auf unter fünf Stück gemindert werden können, liegt das Risiko für Schädigungen bei schwach rauchenden Schwangeren näher an dem von normalen Rauchern, als an dem von Nichtrauchern (Raatikainen et al. 2007). Ein Grund für die Schädigungen des Fetus könnte die Anreicherung von Nikotin im Fetus sein. Messungen von Nikotin und Cotinin, dem Hauptmetabolit des Nikotins, im fetalen Blut und in amniotischer Flüssigkeit, ergeben eine höhere Konzentration als die Serumkonzentration der rauchenden Mutter (Luck et al. 1985). Lambers und Clark (1996) wiesen nach, dass Nikotin auf der fetalen Seite ein ca. 15 % höheres Level als auf der maternalen Seite der Plazenta erreicht und damit die fetale Gehirnentwicklung beeinflusst.

5.4. Ausblick

Durch die Versuche konnte die durch Nikotin ausgelöste Vasokonstriktion der A. uterina der Ratte quantifiziert werden und die Rolle von nAChR bei der Vermittlung der Gefäßreaktion gezeigt werden. Diese Studie bringt uns einen Schritt weiter in der Erforschung der genauen Mechanismen der schädlichen Wirkung von Nikotin auf das Ungeborene. Hierbei lag der

Diskussion

Fokus der Untersuchungen auf der funktionellen Analyse der nAChR, die einen Teil des intrinsisch-non-cholinergen Systems in der Gefäßwand darstellen. Die Beteiligung präterminaler und somit neuronaler nAChR auf perivaskulären Nervenendigungen bei der nikotininduzierten Vasokonstriktion kann dabei nicht ausgeschlossen werden und müsste durch weitere Untersuchungen im Arteriographensystem analysiert werden. Als Schlussfolgerung aus den Beobachtungen ist zu sagen, dass die nAChR der Gefäßwand eine wichtige Rolle für die adäquate Perfusion des Uterus und somit einen nicht zu vernachlässigenden Faktor in der fetalen Entwicklung darstellen.

6. Zusammenfassung

Nikotinische AChR spielen in der Vasomotorik der A. uterina eine wichtige Rolle. In der vorliegenden Studie wurde die Wirkung von Nikotin und Nikotin mit Blockern an den AChR der endothelintakten und endothelenuierten A. uterina von nicht trächtigen, frühträchtigen und späträchtigen Ratten im Ca^{2+} -haltigen und Ca^{2+} -freien Medium untersucht.

Durch Nikotin kam es zu einer Vasokonstriktion. Es konnte eine signifikant ($p < 0,001$) reduzierte Reaktion auf die Nikotinapplikation bei den endothelenuierten Gefäßen um $\sim 2/3$ festgestellt werden. Obwohl auch ein Trend erkennbar scheint, dass die Gefäße in den unterschiedlichen Stadien der Gravidität eine abweichende Kontraktionsintensität aufweisen, zeigt sich hier kein signifikanter Unterschied ($p = 0,193$). Die Ergebnisse zeigen einen signifikanten Einfluss von Ca^{2+} im Medium auf die Konstriktion der A. uterina ($p < 0,001$). Im Ca^{2+} -freien Medium ist die Gefäßkonstriktion vermindert. Versuche mit den Blockern Hexamethonium, Metylycaconitin und Dihydro- β -Erythroidin zeigten, dass neuronale nAChR, unter anderem α_7 - und $\alpha_4\beta_2$ -nAChR Untereinheiten einen Beitrag zur Konstriktion leisten.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen uns folgern, dass sowohl das Endothel als auch Ca^{2+} maßgeblich an der Vasokonstriktion durch Nikotin beteiligt sind, in der Gravidität jedoch kein anderes Verhalten des Gefäßes gegenüber Nikotin auftritt. Dies lässt den Schluss zu, dass die nAChR, die an der Vasokonstriktion beteiligt sind, v.a. auf dem Endothel als Teil des intrinsischen-non-cholinergen Systems lokalisiert sind. Es müssen jedoch auch an anderen Stellen z.B. auf den VSMC oder auf perivaskulären Nervenendigungen als Teil des extrinsisch-adventitiellen cholinergen Systems nAChR noch einen Teil der Vasokonstriktion bewirken.

Diese Studie erbringt den Beweis der funktionellen Beteiligung von nAChR unter anderem von α_7 - und $\alpha_4\beta_2$ -nAChR-Untereinheiten an der nikotininduzierten Vasokonstriktion der A. uterina. Weitere Studien müssten sowohl über den Nachweis von RNA und Protein einen morphologischen Beweis für das Vorhandensein von nAChR auf der A. uterina, als auch den funktionellen Nachweis weiterer nAChR-Untereinheiten erbringen.

Ziel dieser Untersuchungen ist weiterhin die Erforschung der negativen Effekte des Rauchens während der Schwangerschaft auf das Ungeborene.

Summary

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) play an important role in the vasomotoric system of the uterine artery. The present study examines the effect of nicotine and nicotine together with antagonists at the AChR of the uterine artery with and without endothelium from non-pregnant, early pregnant and late pregnant rats in a medium with and without Ca^{2+} .

Nicotine causes a vasoconstriction. A significant reduction of the reaction of the artery without endothelium of about 2/3 was found. Although there seems to be a difference between the different stages of gravidity, this difference is not significant ($p=0.193$). The results show that Ca^{2+} in the medium has a significant influence on the constriction of the uterine artery ($p<0.001$). Without Ca^{2+} the constriction is diminished. Our results with the antagonists Hexamethonium, Metylycaconitin and Dihydro- β -Erythroidine show that neuronal AChR, especially the subunits α_7 and $\alpha_2\beta_4$, contribute to the constriction.

Because of the present results we conclude, that the endothelium as well as Ca^{2+} , have a major contribution on the nicotine induced vasoconstriction, though pregnancy doesn't influence the reaction of the blood vessel. The implication is that the nAChR, which are participating in the constriction of the blood vessel, are localized mainly on the endothelium as part of the intrinsic non cholinergic system. However there must be nAChR at other localizations, like the vascular smooth muscle cells or in the perivascular nerve endings as part of the extrinsic adventitial cholinergic system.

This study shows the functional involvement of nAChR, especially the subunits α_7 and $\alpha_2\beta_4$, in the nicotine induced vasoconstriction of the uterine artery. Further studies need to reveal by detection of RNA and protein the morphological existence of nAChR in the uterine artery as well as the functional confirmation of more nAChR subunits.

A further intention of this study is the investigation of negative effects on the unborn child of smoking during pregnancy.

7. Literatur

Albuquerque EX, Pereira EF, Braga MF, Alkondon M (1998)

Contribution of nicotinic receptors to the function of synapses in the central nervous system: the action of choline as a selective agonist of alpha 7 receptors.

J Physiol Paris. 92(3-4):309-16

Albuquerque EX, Pereira EF, Mike A, Eisenberg HM, Maelicke A, Alkondon M (2000)

Neuronal nicotinic receptors in synaptic functions in humans and rats: physiological and clinical relevance.

Behav Brain Res. 113(1-2):131-41.

Albuquerque CA, Smith KR, Johnson C, Chao R, Harding R (2004)

Influence of maternal tobacco smoking during pregnancy on uterine, umbilical and fetal cerebral artery blood flows.

Early Hum Dev. 80(1):31-42

Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW (2009)

Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function.

Physiol Rev. 89(1):73-120

Amenta F, Porcelli F, Ferrante F, Cavallotti C (1979)

Cholinergic nerves in blood vessels of the female reproductive system.

Acta Histochem. 65(2):133-7

Amiri S, Tai K, Beckstein O, Biggin PC, Sansom MS (2005)

The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor: molecular modelling, electrostatics, and energetics.

Mol Membr Biol. 22(3):151-62

Arnerić SP, Honig MA, Milner TA, Greco S, Iadecola C, Reis DJ (1988)

Neuronal and endothelial sites of acetylcholine synthesis and release associated with microvessels in rat cerebral cortex: ultrastructural and neurochemical studies.

Brain Res. 454(1-2):11-30

Arneric SP, Holladay MW (2000)

Agonist and antagonist of the nicotinic acetylcholine receptor, in Neuronal Nicotinic Receptors (Clementi F, Gotti C, Fornasari D eds) pp. 419- 454, Springer, New York

Ay I, Emre S, Tuncer M (2000)

Factors responsible for acetylcholine-induced dilatation in the isolated perfused rat kidney. Gen Pharmacol. 34(3):175-81

Ay I, Tuncer M (2006)

Both endothelium and afferent nerve endings play a role in acetylcholine-induced renal vasodilation.

Life Sci. 79: 877-882

Ayala CA (1995)

Stimulation of choline acetyl transferase activity by l- and d-carnitine in brain areas of neonate rats.

J Neurosci Res. 41(3):403-8

Azuma H, Obayashi S, Hamasaki H, Koyama T, Aso T (1995)

Role of endothelium in the human uterine arteries during normal menstrual cycle.

Br J Pharmacol. 114(4):902-8

Barrera NP, Edwardson JM (2008)

The subunit arrangement and assembly of ionotropic receptors.

Trends Neurosci. 31(11):569-76

Batty GD, Der G, Deary IJ (2006)

Effect of maternal smoking during pregnancy on offspring's cognitive ability: empirical evidence for complete confounding in the US national longitudinal survey of youth.

Pediatrics. 118(3):943-50

Bell C (1968)

Dual vasoconstrictor and vasodilator innervation of the uterine arterial supply in the guinea pig.

Circulation Research. 23(2):279-89

Berlit (1999)

Neurophysiologie, in Klinische Neurologie, pp. 34-61, Springer Medizin Verlag, Heidelberg

Bertrand D, Bertrand S, Ballivet M (1992)

Pharmacological properties of the homomeric alpha 7 receptor.

Neurosci Lett. 146(1):87-90

Bhuiyan MB, Murad F, Fant ME (2006)

The placental cholinergic system: localization to the cytotrophoblast and modulation of nitric oxide.

Cell Commun Signal. 4:4

Birnbaum SC, Kien N, Martucci RW, Gelzleichter TR, Witschi H, Hendrickx AG, Last JA (1994)

Nicotine- or epinephrine-induced uteroplacental vasoconstriction and fetal growth in the rat.

Toxicology. 94(1-3):69-80

Boulter J, O'Shea-Greenfield A, Duvoisin RM, Connolly JG, Wada E, Jensen A, Gardner PD, Ballivet M, Deneris ES, McKinnon D, et al. (1990)

5. Alpha 3, alpha 5, and beta 4: three members of the rat neuronal nicotinic acetylcholine receptor-related gene family form a gene cluster.

J Biol Chem. 265(8):4472-82

Bravo DT, Kolmakova NG, Parsons SM (2004)

Choline is transported by vesicular acetylcholine transporter.

J Neurochem. 91(3):766-8

Brejč K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der Oost J, Smit AB, Sixma TK (2001)

Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors.

Nature 411(6835):269-76

Brody AL, Mandelkern MA, London ED, Olmstead RE, Farahi J, Scheibal D, Jou J, Allen V, Tiongson E, Chefer SI, Koren AO, Mukhin AG (2006)

Cigarette smoking saturates brain alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptors.

Arch Gen Psychiatry 63(8):907-15

Brügmann D, Lips KS, Pfeil U, Haberberger RV, Kummer W (2002)

Multiple nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits are expressed in the arterial system of the rat.

Histochem Cell Biol. 118(6):441-7

Burgis E (2008)

Beeinflussung der vegetativen Ganglien, in Intensivkurs allgemeine und spezielle Pharmakologie, pp. 87-89, Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München/Jena

Buisson B, Picard F, Bertrand D (2000)

Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: From biophysical properties to human diseases, in Neuronal Nicotinic Receptors (Clementi F, Gotti C, Fornasari D eds), pp. 272-299, Springer, New York

Carvalho FA, Graça LM, Martins-Silva J, Saldanha C (2005)

Biochemical characterization of human umbilical vein endothelial cell membrane bound acetylcholinesterase.

FEBS J 272(21):5584-94

Changeux JP, Edelstein SJ. (2006)

Nicotinic Acetylcholine Receptors. From molecular biology to cognition
Odile Jacob.

Changeux JP, Taly A (2008)

Nicotinic receptors, allosteric proteins and medicine.

Trends Mol Med. 14(3):93-102

Ciani F, Franceschini V (1984)

Ultrastructural study and cholinesterase activity of paired capillaries in the newt brain.

J Hirnforsch. 25(1):11-20

Clarke PB (1993)

Nicotinic receptors in mammalian brain: localization and relation to cholinergic innervation.

Prog Brain Res. 98:77-83

Clark KE, Irion GL (1992)

Fetal hemodynamic response to maternal intravenous nicotine administration.

Am J Obstet Gynecol. 167(6):1624-31

Coleman T, Antoniak M, Britton J, Thornton J, Lewis S, Watts K (2004)

Recruiting pregnant smokers for a placebo-randomised controlled trial of nicotine replacement therapy.

BMC Health Serv Res. 4(1):29

Conklin BS, Surowiec SM, Ren Z, Li JS, Zhong DS, Lumsden AB, Chen C (2001)

Effects of nicotine and cotinine on porcine arterial endothelial cell function.

J Surg Res. 95(1):23-31

Cooke JP (2007)

Angiogenesis and the role of the endothelial nicotinic acetylcholine receptor.

Life Sci. 80(24-25):2347-51

Corringer PJ, Le Novère N, Changeux JP (2000)

Nicotinic receptors at the amino acid level.

Annu Rev Pharmacol Toxicol. 40:431-58

Couteaux R (1958)

Morphological and cytochemical observations on the post-synaptic membrane at motor endplates and ganglionic synapses

Exp. Cell Res. 5:294-322

Dale (1914)

The action of certain esters and ethers of choline and their reaction to muscarine.

J Pharmacol Exp Ther. 6:147-160

Dani JA, Bertrand D (2007)

Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system.

Annu Rev Pharmacol Toxicol. 47:699-729

Derkach VA, Kurenyy DE, Melishchuk AI, Selyanko AA, Skok VI (1991)

Role of disulphide bonds in burst-like activity of nicotinic acetylcholine receptor channels in rat sympathetic neurones.

J Physiol. 440:1-15

Diana JN, Qian SF, Heesch CM, Barron KW, Chien CY (1990)

Nicotine-induced skeletal muscle vasodilation is mediated by release of epinephrine from nerve terminals.

Am J Physiol. 259(6 Pt 2):H1718-29

Dudel J (2006)

Synaptische Übertragung, in Neuro- und Sinnesphysiologie (Birnbaum N, Schmidt RF, Schaible HG eds), pp. 43-64, Springer Medizin Verlag, Heidelberg

Dynarowicz I, Dziegielewski M (1987)

The role of the cholinergic system in the regulation of blood flow through the reproductive organs of swine during the estrous cycle

Pol Arch Weter. 27(4):69-83.

Eliot L, Schaden B (2003)

Was geht da drinnen vor? Die Gehirnentwicklung in den ersten fünf Lebensjahren, 4. Aufl., Berlin Verl., Berlin

Elgoyhen AB, Johnson DS, Boutter J, Vetter DE, Heinemann S (1994)

$\alpha 9$: An Acetylcholine Receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells.

Cell 79:705-715

England LJ, Levine RJ, Mills JL, Klebanoff MA, Yu KF, Cnattingius S (2003)

Adverse pregnancy outcomes in snuff users.

Am J Obstet Gynecol. 189(4):939-43

Esposito ER, Horn KH, Greene RM, Pisano MM (2008)

An animal model of cigarette smoke-induced in utero growth retardation.

Toxicology. 246(2-3):193-202

Falk-Vairant J, Corrèges P, Eder-Colli L, Salem N, Roulet E, Bloc A, Meunier F, Lesbats B, Loctin F, Synguelakis M, Israel M, Dunant Y (1996)

Quantal acetylcholine release induced by mediatophore transfection.

Proc Natl Acad Sci USA. 93(11):5203-7

Figueras F, Meler E, Eixarch E, Francis A, Coll O, Gratacos E, Gardosi J (2007)

Association of smoking during pregnancy and fetal growth restriction: Subgroups of higher susceptibility.

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 138(2):171-5

Forsayeth JR, Kobrin E (1997)

Formation of oligomers containing the beta3 and beta4 subunits of the rat nicotinic receptor.

J Neurosci. 17(5):1531-8

Friedrich A, George RL, Bridges CC, Prasad PD, Ganapathy V (2001)

Transport of choline and its relationship to the expression of the organic cation transporters in a rat brain microvessel endothelial cell line (RBE4).

Biochim Biophys Acta 1512(2):299-307

Fucile S, Barabino B, Palma E, Grassi F, Limatola C, Mileo AM, Alemà S, Ballivet M, Eusebi F (1997)

Alpha 5 subunit forms functional alpha 3 beta 4 alpha 5 nAChRs in transfected human cells. Neuroreport. 8(11):2433-6

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980)

The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.

Nature. 288(5789):373-6

García-Villalón AL, Amezcua YM, Monge L, Fernández N, Climent B, Sánchez A, Diéguez G (2005)

Effect of ischemia duration and nitric oxide on coronary vasoconstriction after –ischemia-reperfusion.

Eur J Pharmacol. 509:165-170

Gauda EB, Cooper R, Akins PK, Wu G (2001)

Prenatal nicotine affects catecholamine gene expression in newborn rat carotid body and petrosal ganglion.

J Appl Physiol. 91(5):2157-65

Gay EA, Yakel JL (2007)

Gating of nicotinic ACh receptors; new insights into structural transitions triggered by agonist binding that induce channel opening.

J Physiol. 584(Pt 3):727-33

Gerzanich V, Kuryatov A, Anand R, Lindstrom J (1997)

"Orphan" alpha6 nicotinic AChR subunit can form a functional heteromeric acetylcholine receptor.

Mol Pharmacol. 51(2):320-7

Ginzel KH, Maritz GS, Marks DF, Neuberger M, Pauly JR, Polito JR, Schulte-Hermann R, Slotkin TA (2007)

Critical review: nicotine for the fetus, the infant and the adolescent?
J Health Psychol. 12(2):215-24

Gotti C, Clementi F (2004)

Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology.
Prog Neurobiol. 74(6):363-96

Grando SA, Kist DA, Qi M, Dahl MV (1993)

Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine.
J Invest Dermatol. 101(1):32-6.

Grando SA, Horton RM, Pereira EFR, Diethelm-Okia BM, George PM, Albuquerque EX, Conti-Fine BM (1995)

A nicotinic acetylcholine receptor regulating cell adhesion and motility is expressed in human keratinocytes.
J Invest Dermatol. 105:774-781

Grando SA, Kawashima K, Wessler I (2003)

Introduction: the non-neuronal cholinergic system in humans.
Life Sci. 72(18-19):2009-12

Grando SA, Kawashima K, Kirkpatrick CJ, Wessler I (2007)

Recent progress in understanding the neuronal cholinergic system in humans.
Life Sci. 80:2182-2185

Grando SA, Kawashima K, Kirkpatrick CJ, Wessler I (2007)

The non-neuronal cholinergic system in humans
Life Sci. 72:2009-2012

Grove KL, Sekhon HS, Brogan RS, Keller JA, Smith MS, Spindel ER (2001)

Chronic maternal nicotine exposure alters neuronal systems in the arcuate nucleus that regulate feeding behavior in the newborn rhesus macaque.

J Clin Endocrinol Metab. 86(11):5420-6

Gründemann D, Köster S, Kiefer N, Breidert T, Engelhardt M, Spitzenberger F, Obermüller N, Schömig E (1998)

Transport of monoamine transmitters by the organic cation transporter type 2, OCT2.
J Biol Chem. 273(47):30915-20

Gupta PC, Sreevidya S (2004)

Smokeless tobacco use, birth weight, and gestational age: population based, prospective cohort study of 1217 women in Mumbai, India.
BMJ. 328(7455):1538

Haberberger R, Schemann M, Sann H, Kummer W (1997)

Innervation pattern of guinea pig pulmonary vasculature depends on vascular diameter.
J Appl Physiol. 82(2):426-34

Haberberger RV, Bodenbenner M, Kummer W (2000)

Expression of the cholinergic gene locus in pulmonary arterial endothelial cells.
Histochem Cell Biol. 113(5):379-87

Halpern W, Osol G, Coy GS (1984)

Mechanical behaviour of pressurized in vitro prearteriolar vessels determined with a video system.
Ann Biomed Eng. 12(5):463-79

Hamel E, Assumel-Luridin C, Edvinsson L, Fage D, MacKenzie ET (1987)

Neuronal versus endothelial origin of vasoactive acetylcholine in pial vessels.
Brain Res 420(2):391-6

Heeschen C, Weis M, Aicher A, Dimmeler S, Cooke JP (2002)

A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors.
J Clin Invest. 110(4):527-36

Heeschen C, Weis M, Cooke JP (2003)

Nicotine promotes arteriogenesis.

J Am Coll Cardiol. 41(3):489-96

Hellström-Lindahl E, Seiger A, Kjaeldgaard A, Nordberg A (2001)

Nicotine-induced alterations in the expression of nicotinic receptors in primary cultures from human prenatal brain.

Neuroscience. 105(3):527-34

Henrich M, Haberberger RV, Hempelmann G, Kummer W (2003)

Quantitative immunohistochemical investigation of the intrinsic vasodilator innervation of the guinea pig lingual artery.

Auton Neurosci. 103(1-2):72-82

Hermsteiner M, Zoltan DR, Doetsch J, Rascher W, Kuenzel W (1999)

Human chorionic gonadotropin dilates uterine and mesenteric resistance arteries in pregnant and nonpregnant rats.

Pflugers Arch.. 439(1-2):186-94

Hermsteiner M, Zoltan DR, Künzel W (2001)

The vasoconstrictor response of uterine and mesenteric resistance arteries is differentially altered in the course of pregnancy.

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 100(1):29-35.

Hermsteiner M, Zoltan DR, Künzel W (2002)

Human chorionic gonadotropin attenuates the vascular response to angiotensin II.

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 102(2):148-54.

Horiuchi Y, Kimura R, Kato N, Fujii T, Seki M, Endo T, Kato T, Kawashima K (2003)

Evolutional study on acetylcholine expression.

Life Sci. 72(15):1745-56

Itier V, Bertrand D (2001)

Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function

FEBS Lett. 504(3):118-25

Jonker JW, Schinkel AH (2004)

Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3).

J Pharmacol Exp Ther. 308(1):2-9

Jovanović A, Grbović L, Drekić D, Novaković S (1994a)

Muscarinic receptor function in the guinea-pig uterine artery is not altered during pregnancy.

Eur J Pharmacol. 258(3):185-94

Jovanović A, Grbović L, Tulić I (1994b)

Endothelium-dependent relaxation in response to acetylcholine in the human uterine artery.

Eur J Pharmacol. 256(2):131-9

Jovanović A, Grbović L, Jovanović S (1995)

K⁺ channel blockers do not modify relaxation of guinea-pig uterine artery evoked by acetylcholine.

Eur J Pharmacol. 280(1):95-100.

Jovanović A, Jovanović S, Grbović L (1997)

Endothelium-dependent relaxation in response to acetylcholine in pregnant guinea-pig uterine artery.

Hum Reprod. 12 (8):1805-1809

Kalamida D, Poulas K, Avramopoulou V, Fostieri E, Lagoumintzis G, Lazaridis K, Sideri A, Zouridakis M, Tzartos SJ (2007)

Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity.

FEBS Journal 274: 3799-3845

Kalaria RN, Harik SI (1992)

Carnitine acetyltransferase activity in the human brain and its microvessels is decreased in Alzheimer's disease.

Ann Neurol. 32(4):583-6

Källén K (2000)

Maternal smoking during pregnancy and infant head circumference at birth.

Early Hum Dev. 58(3):197-204

Kawashima K, Watanabe N, Oohata H, Fujimoto K, Suzuki T, Ishizaki Y, Morita I, Murota S (1990)

Synthesis and release of acetylcholine by cultured bovine arterial endothelial cells.

Neurosci Lett. 119(2):156-8

Kawashima K, Misawa H, Moriwaki Y, Fujii YX, Fujii T, Horiuchi Y, Yamada T, Imanaka T, Kamekura M (2007)

Ubiquitous expression of acetylcholine and its biological functions in life forms without nervous systems.

Life Sci. 80(24-25):2206-9

Kelly YJ, Nazroo JY, McMunn A, Boreham R, Marmot M. (2001)

Birthweight and behavioural problems in children: a modifiable effect?

Int J Epidemiol. 30(1):88-94

Khiroug SS, Harkness PC, Lamb PW, Sudweeks SN, Khiroug L, Millar NS, Yakel JL (2002)

Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels.

J Physiol. 540(Pt 2):425-34

Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Unger RE, Kriegsmann J, Kilbinger H, Wessler I (2001)

The non-neuronal cholinergic system in the endothelium: evidence and possible pathobiological significance.

Jpn J Pharmacol. 85(1):24-8

Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Nozadze K, Wessler I (2003)

Expression and function of the non-neuronal cholinergic system in endothelial cells.

Life Sciences 72:2111-2116

Klapproth H, Reinheimer T, Metzen J, Münch M, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Höhle KD, Schemann M, Racké K, Wessler I (1997)

Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 355(4):515-23

Krishna (1978)

Tabacco chewing in pregnancy

Br J Obstet Gynaecol 85:726-728

Koepsell H, Lips K, Volk C (2007)

Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications.

Pharm Res. 24(7):1227-51

Koolmann, Röhm (2003)

Gehirn und Sinnesorgane, in Taschenatlas der Biochemie, pp. 348-359, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Kummer W, Haberberger R (1999)

Extrinsic and intrinsic cholinergic systems of the vascular wall.

Eur J Morphol. 37(4-5):223-6

Kummer W, Wiegand S, Akinci S, Wessler I, Schinkel AH, Wess J, Koepsell H, Haberberger RV, Lips KS (2006)

Role of acetylcholine and polyspecific cation transporters in serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse.

Respir Res. 12;7:65

Kummer W, Lips KS, Pfeil U (2008)

The epithelial cholinergic system of the airways.

Histochem Cell Biol 130(2):219-34

Kurahashi K, Shirahase H, Nakamura S, Tarumi T, Koshino Y, Wang AM, Nishihashi T, Shimizu Y (2001)

Nicotine-induced contraction in the rat coronary artery: possible involvement of the endothelium, reactive oxygen species and COX-1 metabolites.

J Cardiovasc Pharmacol. 38 Suppl 1:S21-5

Kuryatov A, Olale F, Cooper J, Choi C, Lindstrom J (2000)

Human alpha6 AChR subtypes: subunit composition, assembly, and pharmacological responses.

Neuropharmacology. 39(13):2570-90

Lambers DS, Clark KE (1996)

The maternal and fetal physiologic effects of nicotine.

Seminars in Perinatology 20 (2): 115-126

Lan CT, Shieh JY, Wen CY, Tan CK, Ling EA (1996)

Ultrastructural localization of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in oligodendrocytes, glioblasts and vascular endothelial cells in the external cuneate nucleus of the gerbil.

Anat Embryol (Berl) 194(2):177-85

Le Novère N, Changeux JP (1995)

Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells.

J Mol Evol. 40(2):155-72

Leung HS, Leung FP, Yao X, Ko WH, Chen ZY, Vanhoutte PM, Huang Y (2006)

Endothelial mediators of the acetylcholine-induced relaxation of the rat femoral artery.

Vascul Pharmacol. 44(5):299-308

Li Z, Duckles SP (1993)

Acute effects of nicotine on rat mesenteric vasculature and tail artery.

J Pharmacol Exp Ther. 264(3):1305-10

Lindley AA, Becker S, Gray RH, Herman AA (2000)

Effect of continuing or stopping smoking during pregnancy on infant birth weight, crown-heel length, head circumference, ponderal index, and brain:body weight ratio.

Am J Epidemiol. 152(3):219-25

Lindstrom J (2000)

The structures of neuronal nicotinic receptors, in Neuronal Nicotinic Receptors (Clementi F, Gotti C, Fornasari D eds) pp. 101-162, Springer, New York.

Lips KS, Pfeil U, Reiners K, Rimasch C, Kuchelmeister K, Braun-Dullaeus RC, Haberberger RV, Schmidt R, Kummer W (2003)

Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in rat and human arteries.

J Histochem Cytochem 51(12):1645-54

Lips KS, Brüggmann D, Pfeil U, Vollerthun R, Grando SA, Kummer W (2004)

Nicotinic acetylcholine receptors in rat and human placenta.

Placenta 26:735-746

Lips KS, Brüggmann D, Pfeil U, Vollerthun R, Grando SA, Kummer W (2005)

Nicotinic acetylcholine receptors in rat and human placenta.

Placenta. 26(10):735-46

Lips KS, Wunsch J, Zarghooni S, Bschleipfer T, Schukowski K, Weidner W, Wessler I, Schwantes U, Koepsell H, Kummer W (2007)

Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium.

Eur Urol. 51(4):1042-53

Ljung B, Kjellstedt A, Orebäck B (1987)

Vascular versus myocardial selectivity of calcium antagonists studied by concentration-time-effect relations.

J Cardiovascular Pharmacology 10 (Suppl.1):34-39

Luck W, Nau H, Hansen R, Steldinger R (1985)

Extent of nicotine and cotinine transfer to the human fetus, placenta and amniotic fluid of smoking mothers.

Dev Pharmacol Ther. 8(6):384-95

Lüllmann, Wehling, Mohr (2006)

Pharmakodynamik, in Pharmakologie und Toxikologie, pp. 4-18, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Lundberg JM, Anggård A, Fahrenkrug J (1981)

Complementary role of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and acetylcholine for cat submandibular gland blood flow and secretion. I. VIP release.

Acta Physiol Scand. 113(3):317-27

Macklin KD, Maus AD, Pereira EF, Albuquerque EX, Conti-Fine BM (1998)

Human vascular endothelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors.

J Pharmacol Exp Ther. 287(1):435-9

Matsubara F, Kida M, Tamakoshi A, Wakai K, Kawamura T, Ohno Y (2000)

Maternal active and passive smoking and fetal growth: A prospective study in Nagoya, Japan.

J epidemiol 10(5):335-43

Matsubayashi H, Amano T, Seki T, Sasa M, Sakai N (2004)

Postsynaptic alpha 4 beta 2 and alpha 7 type nicotinic acetylcholine receptors contribute to the local and endogenous acetylcholine-mediated synaptic transmissions in nigral dopaminergic neurons.

Brain Res. 1005(1-2):1-8

Matsuo A, Bellier JP, Hisano T, Aimi Y, Yasuhara O, Tooyama I, Saito N, Kimura H (2005)

Rat choline acetyltransferase of the peripheral type differs from that of the common type in intracellular translocation.

Neurochem Int. 46(5):423-33

Maus AD, Pereira EF, Karachunski PI, Horton RM, Navaneetham D, Macklin K, Cortes WS, Albuquerque EX, Conti-Fine BM (1998)

Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors.

Mol Pharmacol. 54(5):779-88

McCallum SE, Parameswaran N, Bordia T, Fan H, McIntosh JM, Quik M (2006)

Differential regulation of mesolimbic alpha 3/alpha 6 beta 2 and alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptor sites and function after long-term oral nicotine to monkeys.

J Pharmacol Exp Ther. 318(1):381-8

McKay BE, Placzek AN, Dani JA (2007)

Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors.

Biochem Pharmacol. 74(8):1120-33

Michel V, Yuan Z, Ramsbir S, Bakovic M (2006)

Choline transport for phospholipid synthesis.

Exp Biol Med (Maywood). 231(5):490-504

Millar NS (2003)

Assembly and subunit diversity of nicotinic acetylcholine receptors.

Biochem Soc Trans. 31(Pt 4):869-74.

Milner P, Ralevic V, Hopwood AM, Fehér E, Lincoln J, Kirkpatrick KA, Burnstock G (1989)

Ultrastructural localisation of substance P and choline acetyltransferase in endothelial cells of rat coronary artery and release of substance P and acetylcholine during hypoxia.

Experientia. 45(2):121-5

Milner P, Kirkpatrick KA, Ralevic V, Toothill V, Pearson J, Burnstock G (1990)

Endothelial cells cultured from human umbilical vein release ATP, substance P and acetylcholine in response to increased flow.

Proc Biol Sci. 241(1302):245-8

Mitchell EA, Thompson JM, Robinson E, Wild CJ, Becroft DM, Clark PM, Glavish N, Pattison NS, Pryor JE (2002)

Smoking, nicotine and tar and risk of small for gestational age babies.

Acta Paediatr. 91(3):323-8

Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Stowell M, Unwin N (1999)

Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall.

J Mol Biol 288:765-786

Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N (2003)

Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore.

Nature 423(6943):949-55

Moccia F, Frost C, Berra-Romani R, Tanzi F, Adams DJ (2004)

Expression and function of neuronal nicotinic ACh receptors in rat microvascular endothelial cells.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 286(2):H486-91

Nelson ME, Kuryatov A, Choi CH, Zhou Y, Lindstrom J (2003)

Alternate stoichiometries of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors.

Mol Pharmacol. 63(2):332-41

Nelson D, Cox M, Lehninger AL, Beginnen K (2005)

Biologische Signale, in Lehninger Biochemie Ed. 3, pp. 465-524, Springer Medizin Verlag, Heidelberg

Oda Y (1999)

Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system.

Pathol Int. 49(11):921-37

Okamura T, Kimura T, Toda N (1995)

Neurogenic vasodilation in canine uterine and iliac arteries.

J Hypertens. 13(10):1163-8

Okamura T, Ghoneim HA, Ayajiki K, Ammar ES, Toda N (2000)

Mechanisms underlying contraction and relaxation induced by nerve stimulation in monkey uterine arteries.

Pharmacology. 61(4):251-6

Okuda T, Haga T (2000)

Functional characterization of the human high-affinity choline transporter.

FEBS Lett. 484(2):92-7

Olale F, Gerzanich V, Kuryatov A, Wang F, Lindstrom J (1997)

Chronic nicotine exposure differentially affects the function of human $\alpha 3$, $\alpha 4$ and $\alpha 7$ neuronal nicotinic receptor subtypes.

J Pharmacol Exp Ther. 283(2):675-683

O'Regan S, Traiffort E, Ruat M, Cha N, Compaore D, Meunier FM (2000)

An electric lobe suppressor for a yeast choline transport mutation belongs to a new family of transporter-like proteins.

Proc Natl Acad Sci U S A. 97(4):1835-40

Osol G, Cipolla M, Knutson S (1989)

A new method for mechanically denuding the endothelium of small (50-150 microns) arteries with a human hair.

Blood Vessels. 26(5):320-4

Palma E, Maggi L, Barabino B, Eusebi F, Ballivet M (1999)

Nicotinic acetylcholine receptors assembled from the $\alpha 7$ and $\beta 3$ subunits.

J Biol Chem. 274(26):18335-40

Papke RL, Wecker L, Stitzel JA (2010)

Activation and inhibition of mouse muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes.

J Pharmacol Exp Ther. 2010 Jan 25. [Epub ahead of print]

Park YJ, Lee T, Ha J, Jung IM, Chung JK, Kim SJ (2008)

Effect of nicotine on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) migration and angiogenesis.

Vascul Pharmacol. 49(1):32-6

Parnavelas JG, Kelly W, Burnstock G (1985)

Ultrastructural localization of choline acetyltransferase in vascular endothelial cells in rat brain.

Nature. 316(6030):724-5.

Pesić S, Grbović L, Jovanovic A, Radenković M, Stojić D, Cvetković Z, Ilic I (2003)

Endothelium-dependent relaxation of canine uterine artery in response to acetylcholine: the possible involvement of alternative pathways

J Vet Med 50:391-396

Pfeil U, Haberberger RV, Lips KS, Eberling L, Grau V, Kummer W (2003)

Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in epithelia.

Life Sci. 72(18-19):2087-2090

Pfeil U, Vollerthun R, Kummer W, Lips KS (2004)

Expression of the cholinergic gene locus in the rat placenta.

Histochem Cell Biol. 122(2):121-30

Quick MW, Lester RA (2002)

Desensitization of neuronal nicotinic receptors.

J Neurobiol. 53(4):457-78

Racké K, Juergens UR, Matthiesen S (2006)

Control by cholinergic mechanisms.

Eur J Pharmacol. 533(1-3):57-68

Raatikainen K, Huurinainen P, Heinonen S (2007)

Smoking in early gestation or through pregnancy: a decision crucial to pregnancy outcome.

Prev Med. 44(1):59-63

Ramirez-Latorre J, Yu CR, Qu X, Perin F, Karlin A, Role L (1996)

Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels.
Nature. 380(6572):347-51

Rowell PP, Sastry BV (1981)

Human placental cholinergic system: depression of the uptake of alpha-aminoisobutyric acid in isolated human placental villi by choline acetyltransferase inhibitors.
J Pharmacol Exp Ther. 216(2):232-8.

Salaices M, Marin J, Rico ML, Gonzalez C (1983)

Effects of verapamil and manganese on the vasoconstrictor responses to noradrenaline, serotonin and potassium in human and goat cerebral arteries.
Biochem Pharmacol 32(18):2711-2714

Sato Y, Hotta H, Nakayama H, Suzuk H (1996)

Sympathetic and parasympathetic regulation of the uterine blood flow and contraction in the rat.
J Auton Nerv Syst 59(3):151-8

Schäfer MK, Eiden LE, Weihe E (1998)

Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. II. The peripheral nervous system.
Neuroscience. 84(2):361-76

Schlereth T, Birklein F, an Haack K, Schiffmann S, Kilbinger H, Kirkpatrick CJ, Wessler I (2006)

In vivo release of non-neuronal acetylcholine from the human skin as measured by dermal microdialysis: effect of botulinum toxin.
Br J Pharmacol. 147(2):183-7

Schneider AF, Siska IR, Avram JA (2003)

Regulation of the venous tone, in Clinical Physiology of the Venous System, pp. 77-170,
Springer Medizin Verlag, Heidelberg

Séguéla P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW (1993)

Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain $\alpha 7$: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium.

J Neurosci. 13(2):596-604

Sekhorn HS, Jia Y, Raab R, Kuryatov A, Pankow JF, Whitsett JA, Lindstrom J, Spindel ER (1999)

Prenatal nicotine increases pulmonary $\alpha 7$ nicotinic receptor expression and alters fetal lung development in monkeys.

J Clin Invest. 103: 637-647

Sequeira IM, Haberberger RV, Kummer W (2005)

Atrial and ventricular rat coronary arteries are differently supplied by noradrenergic, cholinergic and nitrenergic, but not sensory nerve fibres.

Ann Anat. 187(4):345-55

Shea AK, Steiner M (2008)

Cigarette smoking during pregnancy.

Nicotine Tob Res. 10(2):267-78

Shoaib M, Zubaran C, Stolerman IP (2000)

Antagonism of stimulus properties of nicotine by dihydro-beta-erythroidine (DH β E) in rats.

Psychopharmacology. 149(2):140-6

Sorajja P, Cable DG, Hamner CE, Schaff HV (2005)

Prolonged exposure of canine coronary arteries to a nitric oxide donor desensitizes soluble guanylate cyclase.

J Surgical Research 123:82-88

Statistisches Bundesamt (2008)

Nachhaltige Entwicklung in Deutschland, Indikatorenbericht 2008, pp. 44-45, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden

Steyn K, de Wet T, Saloojee Y, Nel H, Yach D (2006)

The influence of maternal cigarette smoking, snuff use and passive smoking on pregnancy outcomes: the Birth To Ten Study.

Paediatr Perinat Epidemiol. 20(2):90-9

Suzuki K, Minei LJ, Johnson EE (1980)

Effect of nicotine upon uterine blood flow in the pregnant rhesus monkey.

Am J Obstet Gynecol. 136(8):1009-13

Sweiry JH, Yudilevich DL (1985)

Characterization of choline transport at maternal and fetal interfaces of the perfused guinea-pig placenta.

J Physiol. 366:251-66.

Tapia L, Kuryatov A, Lindstrom J (2007)

Ca²⁺ permeability of the (α4)₃(β2)₂ stoichiometry greatly exceeds that of (α4)₂(β2)₃ human acetylcholine receptors.

Mol Pharmacol. 71(3):769-76

Toda N, Okamura T (1991)

Role of nitric oxide in neurally induced cerebroarterial relaxation.

J Pharmacol Exp Ther. 258(3):1027-32

Toda N, Okamura T (2003)

The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels.

Pharmacol Rev. 55(2):271-324

Tsybenko VA, Yanchuk PI, Pasichnichenko OM, Komarenko VI, Prikhod'ko TP (2007)

Vasoconstrictor effect of acetylcholine in veins of the liver.

Bull Exp Biol Med. 143(3):291-4

Unwin N (1993)

Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution.

J Mol Biol. 229(4):1101-24

Unwin N (2005)

Refined Structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution.

J Mol Biol. 346(4):967-89

Villablanca AC (1998)

Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells in vitro.

J Appl Physiol. 84(6):2089-98

Wang F, Gerzanich V, Wells GB, Anand R, Peng X, Keyser K, Lindstrom J (1996)

Assembly of human neuronal nicotinic receptor alpha5 subunits with alpha3, beta2, and beta4 subunits.

J Biol Chem. 271(30):17656-65

Ward C, Lewis S, Coleman T (2007)

Prevalence of maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure during pregnancy and impact on birth weight: retrospective study using Millenium Cohort.

BMC Public Health 7:81

Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K (1998)

Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans.

Pharmacol. Ther. 77(1):59-79

Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racké K (1999)

The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans.

Clin Exp Pharmacol Physiol. 26(3):198-205

Wessler I, Roth E, Deutsch C, Brockerhoff P, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Kilbinger H (2001)

Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters.

Br J Pharmacol. 134(5): 951–956.

Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Unger R, Kirkpatrick CJ (2003)

The non-neuronal cholinergic system in humans: Expression, function and pathophysiology.
Life Sci. 72(18-19):2055-61.

Wharton J, Gulbenkian S (1987)

Peptides in the mammalian cardiovascular system.
Experientia. 43(7):821-32

Whiting PJ, Lindstrom JM (1988)

Characterization of bovine and human neuronal nicotinic acetylcholine receptors using monoclonal antibodies.
J Neurosci. 8(9):3395-404

Williams BM, Krishna Remburi M, Schwartz Levey M, Bertrand S, Bertrand D, Jacob MH (1998)

The long cytoplasmic loop of the $\alpha 3$ subunit targets specific nAChR subtypes to microdomains within individual synapses on neurons in vivo.
Nat. Neurosci. 1:557-562

Windham GC, Von Behren J, Waller K, Fenster L (1999)

Exposure to environmental and mainstream tobacco smoke and risk of spontaneous abortion.
Am J Epidemiol. 149(3):243-7

Witzemann V, Barg B, Criado M, Stein E, Sakmann B (1989)

Developmental regulation of five subunit specific mRNAs encoding acetylcholine receptor subtypes in rat muscle.
FEBS Lett. 242(2):419-24

Wonnacott S (1997)

Presynaptic nicotinic ACh receptors.
Trends Neurosci. 20:92-98

Wu J, Liu Q, Yu K, Hu J, Kuo YP, Segerberg M, St John PA, Lukas RJ (2006)

Roles of nicotinic acetylcholine receptor beta subunits in function of human alpha4-containing nicotinic receptors.

J Physiol. 576(1):103-18

Xiao D, Huang X, Yang S, Zhang L (2007)

Direct effects of nicotine on contractility of the uterine artery in pregnancy.

J Pharmacol Exp Ther. 322(1):180-5

Yampolsky P, Gensler S, McArdle J, Witzemann V (2008)

AChR channel conversion and AChR-adjusted neuronal survival during embryonic development.

Mol Cell Neurosci. 37(3) 634-645

Yoshida K, Toda N (1997)

Colocalization of acetylcholinesterase and vasoactive intestinal peptide (VIP) in nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH-d) positive neurons in the intralingual ganglia and perivascular nerve fibers around lingual arteries in the porcine, monkey and canine tongue.

Neurosci Lett. 222(3):147-50

Zarghooni S, Wunsch J, Bodenbenner M, Brüggmann D, Grando SA, Schwantes U, Wess J, Kummer W, Lips KS (2007)

Expression of muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the mouse urothelium.

Life Sci. 80(24-25):2308-13

8. Anhang

8.1 weiterführende Tabellen

Durch Xenopus-Oozyten-Experimente konnte eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten der Untereinheiten zur Formation von funktionellen Rezeptoren gefunden werden:

α_2	$\alpha_2\beta_2$	Millar 2003
	$\alpha_2\beta_4$	Millar 2003
α_3	$\alpha_3\beta_4$	Wang et al. 1996, Fucile et al. 1997, Papke et al. 2010
	$\alpha_3\beta_4\alpha_5$	Wang et al. 1996, Fucile et al. 1997
	$\alpha_3\beta_2$	Wang et al. 1996, Fucile et al. 1997, Kuryatov et al. 2000
	$\alpha_3\beta_2\alpha_5$	Wange et al. 1996, Fucile et al. 1997
	$\alpha_3\alpha_6\beta_2$	Kuryatov et al. 2000
	$\alpha_3\alpha_6\beta_4$	Kuryatov et al. 2000
	$\alpha_3\beta_3\beta_4$	Forsayeth und Kobrin 1997, Kuryatov et al. 2000
α_4	$\alpha_4\beta_2\beta_3$	Nelson und Edwardson 2003
	$\alpha_4\beta_2\alpha_5$	Fucile et al. 1997, Nelson und Edwardson 2008
	$\alpha_4\beta_2$	Fucile et al. 1997, Kuryatov et al. 2000, Papke et al. 2010
	$\alpha_4\beta_4$	Fucile et al. 1997
	$\alpha_4\beta_4\alpha_5$	Fucile et al. 1997
	$\alpha_4\beta_3$	Forsayeth und Kobrin 1997
α_5	$\alpha_5\alpha_4\beta_2$	Ramirez-Latorre et al. 1996, Fucile et al. 1997, Nelson u. Edwardson 2008
	$\alpha_5\alpha_4\beta_4$	Fucile et al. 1997
	$\alpha_5\alpha_3\beta_2$	Wang et al. 1996, Fucile et al 1997
	$\alpha_5\alpha_3\beta_4$	Wang et al. 1996, Fucile et al 1997
	$\alpha_5\alpha_6\beta_2$	Kuryatov et al. 2000
α_6	$\alpha_6\beta_2$	Palma et al. 1999, Kuryatov et al. 2000
	$\alpha_6\beta_4$	Gerzanich et al. 1997
	$\alpha_6\alpha_3\beta_2$	Kuryatov et al. 2000
	$\alpha_6\alpha_3\beta_4$	Kuryatov et al. 2000
	$\alpha_6\beta_3\beta_4$	Kuryatov et al. 2000
	$\alpha_6\alpha_4\beta_2$	Kuryatov et al. 2000

Anhang

	$\alpha_6\beta_2\alpha_5$	Kuryatov et al. 2000
α_7	α_7 $\alpha_7\beta_2$ $\alpha_7\beta_3$ $\alpha_7\alpha_5\beta_2$ $\alpha_7\alpha_5\beta_4$	Palma et al. 1999, Kuryatov et al. 2000, Papke et al. 2010 Millar 2003 Palma et al. 1999 Milnar 2003 Palma et al. 1999
α_8	α_8	Wang et al. 1996, Millar 2003
α_9	α_9	Wang et al. 1996, Palma et al. 1999
β	$\beta_2\beta_3$ $\beta_3\beta_4$	Forsayeth und Kobrin 1997 Forsayeth und Kobrin 1997

Tabelle 2: Mögliche Kombination der AChR-Untereinheiten

8.2 Versuchsdaten:

Konstriktion bei Applikation der aufgeführten Nikotin-Konzentrationen c_1 - c_6 an der :

Tab.3: endothelintakten A. uterina von nicht-trächtigen Ratten:

NS-UA- ME	$c_2=1 \times 10^{-7}$	$c_3=1 \times 10^{-6}$	$c_4=1 \times 10^{-5}$	$c_5=1 \times 10^{-4}$	$c_6=1 \times 10^{-3}$
V 1	4	7	14	22	-
V 2	5	8	14	23	30
V 3	4	6	12	21	28
V 4	4	7	12	21	29
V 5	4	7	13	23	30
Ø	4,20	7,00	13,00	22,00	29,25

Tab. 4: endotheldenudierten A. uterina von nicht-trächtigen Ratten:

NS-UA- OE	$c_2=1 \times 10^{-7}$	$c_3=1 \times 10^{-6}$	$c_4=1 \times 10^{-5}$	$c_5=1 \times 10^{-4}$	$c_6=1 \times 10^{-3}$
V 6	0	3	5	7	10
V 7	0	3	4	6	8
V 8	0	3	5	7	9
V 9	0	2	4	6	9
V 10	0	2	4	7	9
V 11	0	3	5	7	9
Ø	0,00	2,67	4,50	6,67	9,00

Tab. 5: endothelintakten A. uterina von späträchtigen Ratten:

SS-UA- ME	$c_2=1 \times 10^{-7}$	$c_3=1 \times 10^{-6}$	$c_4=1 \times 10^{-5}$	$c_5=1 \times 10^{-4}$	$c_6=1 \times 10^{-3}$
V 12	5	8	13	23	31
V 13	3	6	12	22	31
V 14	2	6	10	20	30
V 15	3	5	13	20	31
V 16	3	6	12	21	31
Ø	3,20	6,20	12,00	21,20	30,80

Tab. 6: endotheldenudierten A. uterina von späträchtigen Ratten:

SS-UA- OE	$c_2=1 \times 10^{-7}$	$c_3=1 \times 10^{-6}$	$c_4=1 \times 10^{-5}$	$c_5=1 \times 10^{-4}$	$c_6=1 \times 10^{-3}$
V 17	0	3	5	7	10
V 18	0	3	6	8	11
V 19	0	2	4	7	10
V 20	0	3	5	8	11
V 21	0	2	4	7	9
Ø	0,00	2,60	4,80	7,40	10,20

Anhang

Tab. 7: endothelintakten A. uterina von frühträchtigen Ratten:

FS-UA- ME	$c_2=1 \times 10^{-7}$	$c_3=1 \times 10^{-6}$	$c_4=1 \times 10^{-5}$	$c_5=1 \times 10^{-4}$	$c_6=1 \times 10^{-3}$
V 134	2	5	10	19	27
V 135	2	6	12	20	28
V 136	2	4	9	18	26
V 137	2	5	11	19	27
V 138	2	6	11	20	27
Ø	2,00	5,20	10,60	19,20	27,00

Tab. 8: endotheldenudierten A. uterina von frühträchtigen Ratten:

FS-UA- OE	$c_2=1 \times 10^{-7}$	$c_3=1 \times 10^{-6}$	$c_4=1 \times 10^{-5}$	$c_5=1 \times 10^{-4}$	$c_6=1 \times 10^{-3}$
V 139	0	3	5	8	11
V 140	0	4	6	9	12
V 141	0	3	6	10	12
V 142	0	3	5	10	11
V 143	0	4	6	9	12
Ø	0,00	3,40	5,60	9,20	11,60

Tab. 9: endothelintakten A. uterina von nicht-trächtigen Ratten im Ca-freien Medium (PBS):

NS-UA- ME	$c_2=1 \times 10^{-7}$	$c_3=1 \times 10^{-6}$	$c_4=1 \times 10^{-5}$	$c_5=1 \times 10^{-4}$	$c_6=1 \times 10^{-3}$
V 124	0	3	8	13	21
V 125	0	3	7	12	20
V 126	0	3	6	13	20
V 127	0	4	6	14	21
V 128	0	4	7	13	20
Ø	0,00	3,40	6,80	13,00	25,50

Tab. 10: endotheldenudierten A. uterina von nicht-trächtigen Ratten im Ca-freien Medium (PBS):

NS-UA- OE	$c_2=1 \times 10^{-7}$	$c_3=1 \times 10^{-6}$	$c_4=1 \times 10^{-5}$	$c_5=1 \times 10^{-4}$	$c_6=1 \times 10^{-3}$
V 129	0	0	2	4	5
V 130	0	0	1	3	5
V 131	0	0	2	3	5
V 132	0	0	2	4	6
V 133	0	0	2	5	6
Ø	0,00	0,00	1,80	3,80	5,40

Anhang

Dilatation bei Applikation der aufgeführten Blocker-Konzentrationen c_1 - c_4 gemeinsam mit der errechneten EC50 Nikotin-Konzentration in Bezug auf die zuvor applizierten alleinigen EC50 Nikotin-Konzentration bei der nicht-trächtigen Ratte durch:

Tab. 11: Metylycaconitin an der endothelintakten A. uterina:

NS-UA- ME	$c_1=1 \times 10^{-7}$	$c_2=5 \times 10^{-7}$	$c_3=1 \times 10^{-6}$	$c_4=5 \times 10^{-6}$
V 22	1	2	5	8
V 23	1	3	5	9
V 24	1	4	7	8
V 25	1	3	5	7
V 26	2	3	5	9
Ø	1,20	3,00	5,40	8,20

Tab. 12: Metylycaconitin an der endotheldenudierten A. uterina:

NS-UA- OE	$c_1=1 \times 10^{-7}$	$c_2=5 \times 10^{-7}$	$c_3=1 \times 10^{-6}$	$c_4=5 \times 10^{-6}$
V 27	0	0	1	2
V 28	0	0	1	2
V 29	0	0	1	2
V 30	0	0	1	2
V 31	0	0	1	2
Ø	0,00	0,00	1,00	2,00

Tab. 13: Dihydro- β -Erythroidin an der endothelintakten A. uterina:

NS-UA- ME	$c_1=1 \times 10^{-7}$	$c_2=5 \times 10^{-7}$	$c_3=1 \times 10^{-6}$	$c_4=5 \times 10^{-6}$
V 36	2	6	10	37
V 37	3	7	9	31
V 38	5	7	10	33
V 39	6	9	12	33
V 40	3	6	9	30
Ø	3,80	7,00	10,00	32,80

Tab. 14: Dihydro- β -Erythroidin an der endotheldenudierten A. uterina:

NS-UA- OE	$c_1=1 \times 10^{-7}$	$c_2=5 \times 10^{-7}$	$c_3=1 \times 10^{-6}$	$c_4=5 \times 10^{-6}$
V 47	0	0	3	8

Anhang

Tab. 15: Hexamethonium an der endothelintakten A. uterina:

NS-UA- ME	$c_1=5 \times 10^{-6}$	$c_2=1 \times 10^{-5}$	$c_3=5 \times 10^{-5}$	$c_4=1 \times 10^{-4}$
V 41	9	11	15	20
V 42	10	12	17	20
V 43	9	12	16	21
V 44	9	11	16	20
V 45	10	13	18	20
Ø	9,40	11,80	16,40	20,20

Tab. 16: Hexamethonium an der endothelidenudierten A. uterina:

NS-UA- OE	$c_1=5 \times 10^{-6}$	$c_2=1 \times 10^{-5}$	$c_3=5 \times 10^{-5}$	$c_4=1 \times 10^{-4}$
V 46	1	1	3	8

Anhang

Konstriktion bei Applikation der aufgeführten Blocker-Konzentrationen c_1 - c_4 gemeinsam mit der errechneten EC50 Nikotin-Konzentration in Bezug auf die zuvor applizierten alleinigen EC50 Nikotin-Konzentration bei der nicht-trächtigen Ratte durch:

Tab. 17: Metylycaconitin an der endothelintakten A. uterina:

NS-UA- ME	$c_1=1 \times 10^{-7}$	$c_2=5 \times 10^{-7}$	$c_3=1 \times 10^{-6}$	$c_4=5 \times 10^{-6}$
V 22	13	12	10	7
V 23	12	10	8	6
V 24	13	10	8	7
V 25	13	11	9	8
V 26	13	12	10	7
Ø	12,8	11	9	7

Tab. 18: Metylycaconitin an der endotheldenudierten A. uterina:

NS-UA- OE	$c_1=1 \times 10^{-7}$	$c_2=5 \times 10^{-7}$	$c_3=1 \times 10^{-6}$	$c_4=5 \times 10^{-6}$
V 27	4	4	3	3
V 28	4	4	4	3
V 29	4	4	3	2
V 30	4	5	4	3
V 31	5	4	4	3
Ø	4,2	4,2	3,6	2,8

Tab. 19: Dihydro- β -Erythroidin an der endothelintakten A. uterina:

NS-UA- ME	$c_1=1 \times 10^{-7}$	$c_2=5 \times 10^{-7}$	$c_3=1 \times 10^{-6}$	$c_4=5 \times 10^{-6}$
V 36	12	9	5	-
V 37	12	9	7	-
V 38	11	10	7	-
V 39	11	9	6	-
V 40	11	9	6	-
Ø	11,4	9,2	6,2	-

Tab. 20: Dihydro- β -Erythroidin an der endotheldenudierten A. uterina:

NS-UA- OE	$c_1=1 \times 10^{-7}$	$c_2=5 \times 10^{-7}$	$c_3=1 \times 10^{-6}$	$c_4=5 \times 10^{-6}$
V 47	4	4	2	-

Anhang

Tab. 21: Hexamethonium an der endothelintakten A. uterina:

NS-UA- ME	$c_1=5 \times 10^{-6}$	$c_2=1 \times 10^{-5}$	$c_3=5 \times 10^{-5}$	$c_4=1 \times 10^{-4}$
V 41	7	5	2	-
V 42	8	6	2	-
V 43	7	4	1	-
V 44	7	5	2	-
V 45	8	5	1	-
Ø	7,4	5	1,6	-

Tab. 22: Hexamethonium an der endothelidenudierten A. uterina:

NS-UA- OE	$c_1=5 \times 10^{-6}$	$c_2=1 \times 10^{-5}$	$c_3=5 \times 10^{-5}$	$c_4=1 \times 10^{-4}$
V 46	3	3	1	-

8.3 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die ich wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen habe, 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.“

Christine Rettig

8.4 Danksagung:

Mein ganz besonderer Dank gilt Herr Prof. Tinneberg, der mir das Thema der Doktorarbeit bereitstellte und mich auch in schwierigen Phasen immer wieder ermutigte und unterstützte. Herr Prof. Wehrend möchte ich für die tiermedizinische Betreuung der Doktorarbeit herzlich danken.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Dr. Dörte Brüggmann für die gute Betreuung und die Hilfe bei den Versuchen, der Literatursuche und für die aufbauenden Worte. Außerdem möchte ich ihr für Ihre vielen Verbesserungsvorschläge und Korrekturen selbst aus dem fernen Amerika danken.

Frau Dorina Zoltan möchte für die Hilfestellung bei der Durchführung der Versuche ganz herzlich danken. Frau Ulrike Schulz danke ich für die Hilfe bei der Berechnung der Signifikanzen.

Vor allem danke ich auch meiner Familie. Meinen Eltern danke ich für die Finanzierung meines Studiums. Meinem Opa für den ersten Hinweis der zum Erstellen dieser Doktorarbeit geführt hat. Meiner Mama dafür, dass sie immer für uns da ist. Sarah danke ich für die Hilfe bei der Erstellung der Schaubilder und fürs Korrekturlesen.

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

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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5740-4



9 783835 1957404