

Aus dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. G. Isenberg)

**Der desynchronisierende Effekt des Endothels auf die Kinetik der
intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration glatter Gefäßmuskelzellen in
Mesenterialarterien der Ratte**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Michael Sell
geboren am 20. April 1971 in Querfurt

Betreuer: Prof. Dr. med. habil. F. Markwardt

Gutachter:

1. Prof. Dr. F. Markwardt
2. Prof. Dr. S. Dhein
3. PD Dr. R. Schubert

verteidigt am 05.11.2003

urn:nbn:de:gbv:3-000005737

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005737>]

Die als Vasomotion bezeichnete rhythmische Kontraktion von kleinen Arterien und Arteriolen spielt eine wichtige Rolle bei der Verteilung des Blutes im Gewebe. Sie wird hervorgerufen durch die koordinierte Kontraktion der einzelnen glatten Muskelzellen der Gefäßwand infolge oszillierender Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$).

Die Kinetik der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ einzelner glatter Muskelzellen innerhalb intakter Mesenterialarterien der Ratte wurde mit Hilfe eines konfokalen LASER-Scanning-Mikroskops unter Verwendung des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-3 AM untersucht. Noradrenalin (NA) ($1\ \mu\text{M}$) erzeugte transiente Anstiege der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in einzelnen Muskelzellen. Diese $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten wiesen nur eine geringe zeitliche Synchronizität auf. Höhere Konzentrationen von NA (3 und $10\ \mu\text{M}$) riefen synchrone Anstiege der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in den Gefäßmuskelzellen hervor. Bei intaktem Endothel wurde die Synchronisation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale durch Azetylcholin (ACh) unterdrückt und durch den NO-Synthase-Inhibitor L-NAME verstärkt. In Präparaten ohne intaktes Endothel desynchronisierte Natrium-Nitroprussid (SNP) reversibel die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale. Ebenso war Heptanol, eine gap-junction entkoppelnde Substanz, unabhängig von der Endothelfunktion in der Lage, die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale zu desynchronisieren. Die Wirkung von ACh, jedoch nicht die von SNP, ließ sich durch L-NAME unterdrücken.

Intrazelluläre $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Wellen hatten eine Ausbreitungsgeschwindigkeit von ca. $25\ \mu\text{m/s}$. Die Phasenverschiebung zwischen den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten einzelner Muskelzellen betrug maximal $2\ \text{s}$ und war unabhängig vom Abstand der Zellen (bis zu $90\ \mu\text{m}$). Dies bedeutet, daß die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Wellen zu langsam sind, um eine Synchronisation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten durch ihre interzelluläre Ausbreitung über gap-junctions zu ermöglichen.

Die Kopplung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale glatter Gefäßmuskelzellen wird durch NA und NO reguliert. Oszillierende Gefäßkontraktionen bei einem hohen Sympathikotonus könnten durch die Synchronisation von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten verschiedener glatter Gefäßmuskelzellen hervorgerufen werden, wogegen NO aus dem Endothel die Vasomotion über eine Desynchronisation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten hemmt.

Sell, Michael: Der desynchronisierende Effekt des Endothels auf die Kinetik der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration glatter Gefäßmuskelzellen in Mesenterialarterien der Ratte.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 50 Seiten, 2003

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	4
2.1. Versuchslösungen	4
2.1.1. Standardversuchslösung	4
2.1.2. Farbstofflösungen	4
2.1.3. Weitere Substanzen	4
2.2. Präparation der Rattenmesenterialarterien	6
2.3. Beladung der Mesenterialarterien mit Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen	7
2.4. Fluoreszenzmikroskopie und Datengewinnung	8
2.5. Statistik	11
3. Ergebnisse	12
3.1. Der Einfluß von Noradrenalin auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -abhängige Fluoreszenz in glatten Gefäßmuskelzellen	12
3.2. Der Einfluß der Noradrenalkonzentration auf die Korrelation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -abhängigen Fluoreszenzsignale glatter Gefäßmuskelzellen	15
3.3. Der Einfluß von NO auf die Korrelation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale	20
3.4. Der Einfluß von Heptanol auf die Synchronisation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale glatter Gefäßmuskelzellen	23
3.5. Die Bedeutung interzellulärer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Wellen für die Synchronisation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale	27
3.6. Der Einfluß der Amplitude der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale auf deren Synchronisation	30

4.	Diskussion	32
4.1.	Das experimentelle Modell	32
4.2.	Die Synchronisation der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale einzelner glatter Gefäß-muskelzellen wird durch NA kontrolliert	34
4.3.	NO desynchronisiert die $[Ca^{2+}]_i$ -Signale einzelner glatter Gefäß-muskelzellen	36
4.4.	Gap-junctions sind an der Synchronisation der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale glatter Gefäßmuskelzellen beteiligt	37
4.5.	Die Kopplung der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale entsteht nicht durch eine inter-zelluläre Ausbreitung von $[Ca^{2+}]_i$ -Wellen	39
5.	Zusammenfassung	41
6.	Literaturverzeichnis	43
7.	Thesen	49

Lebenslauf

Erklärungen

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

8-Br-cAMP	zyklisches 8-Brom-Adenosinmonophosphat
ACh	Azetylcholin
AM	Azetoxymethylester
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
$[Ca^{2+}]_e$	extrazelluläre Kalziumionenkonzentration
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Kalziumionenkonzentration
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cx	Connexin
DMSO	Dimethylsulfoxid
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
L-NAME	N ω -Nitro-L-argininmethylester
NA	Noradrenalin
NO	Stickstoffmonoxid
PKC	Proteinkinase C
SL	Standardversuchslösung
SNP	Natrium-Nitroprussid
w.E.	willkürliche Einheiten

1. Einleitung

Die oszillierende Änderung des Gefäßdurchmessers, Vasomotion genannt, ist eine Eigenschaft der kleinen Arterien und der Arteriolen [1]. Sie führt zu oszillierenden Änderungen des Gefäßwiderstandes und damit zu zeitlichen Änderungen des Blutflusses und des Druckabfalls im Gefäß. Die Vasomotion entsteht durch die Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen. Für die arterioläre Vasomotion wurden zwei verschiedene Frequenzen ermittelt. Die schnelle Vasomotion hat eine Frequenz von 10 bis 25 Zyklen pro Minute. Man findet sie v.a. in den terminalen Arteriolen. Die sogenannte langsame Vasomotion ($1\text{--}3\text{ min}^{-1}$) ist eher typisch für proximale Arteriolen [2]. Sie tritt zum Beispiel während eines hämorrhagischen Schocks auf oder wird durch diesen verstärkt. Unter diesen Bedingungen besteht gewöhnlich ein hoher Sympathikotonus. So scheint die langsame Vasomotion von einer intakten sympathischen Innervation des Gefäßes abhängig zu sein. Auch die sogenannten "Mayerschen Wellen", Oszillationen des Blutdruckes mit einer Frequenz von ca. 6 min^{-1} , wurden als ein Maß für den Sympathikotonus angesehen [3]. Verschiedene Experimente haben gezeigt, daß die Vasomotion auch in kleinen Arterien auftritt [4; 5]. Oszillationen des Durchmessers und der Wandspannung isolierter Gefäße konnten nach der Gabe von hohen Konzentrationen von Noradrenalin, Phenylephrin und anderen Stimulatoren arterieller Kontraktion sowie nach perivaskulärer Nervstimulation beobachtet werden [5; 6].

Modellberechnungen zur Abhängigkeit des mittleren Gefäßwiderstandes und des Blutflusses von den Oszillationen des Gefäßdurchmessers zeigten, daß, gemittelt über eine Oszillationsperiode, sowohl der Widerstand als auch der Blutfluß durch die Oszillationen erhöht werden. Dies bedeutet, daß in den Gefäßen Fluß und Widerstand unabhängig von einander über die Änderung des mittleren Durchmessers und/oder die Amplitude der Oszillationen kontrolliert werden können. Besonders bei einem hohen Sympathikotonus kann deshalb der arterielle Druck durch Vasomotion weiter erhöht werden unter gleichzeitiger Sicherstellung einer zumindest intermittierenden Perfusion des Kapillarbettes. Dieser unerwartete Effekt ist von der Amplitude der Oszillationen abhängig, jedoch nicht von deren Frequenz [7]. Weiterhin könnte die Vasomotion dazu dienen, den Arbeitspunkt für die Regulation der Widerstandsgefäßweite in einen weniger steilen Abschnitt der Durchmesser-Widerstandskurve zu verlagern [8].

Dadurch kann der hydraulische Widerstand ohne die Notwendigkeit einer äußerst präzisen Durchmesserkontrolle aufrecht erhalten werden [9]. Dies könnte erklären, warum die Vasomotion hauptsächlich in Gefäßen mit kleinem Durchmesser auftritt. In Arteriolen geschieht dies meist spontan, in kleinen Arterien als Antwort auf vasoaktive Stimuli [10].

Gleichzeitige Messungen der Wandspannung und der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) belegen, daß die rhythmischen Kontraktionen mit Oszillationen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verbunden sind. Da gezeigt wurde, daß die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Hauptregulator des vaskulären Tonus ist, besteht zwischen beiden Phänomenen wahrscheinlich ein ursächlicher Zusammenhang [3]. Oszillationen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurden vor allem an einzelnen glatten Gefäßmuskelzellen untersucht. In diesen Versuchen schwankte die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zwischen einem Minimum von ungefähr 100 nM und einem Maximum von 400 bis 800 nM [11]. Rhythmische IP_3 - und Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzungen aus den intrazellulären Speichern scheinen ebenso wie der Ca^{2+} -Einstrom durch Ca^{2+} -Kanäle der Plasmamembran an diesem Phänomen beteiligt zu sein [12].

Um eine Oszillation der Gefäßwandspannung zu erzeugen, ist eine Synchronisation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen und dadurch des Tonus der einzelnen glatten Gefäßmuskelzellen erforderlich. Dies wurde mit Hilfe der konfokalen LASER-Scanning-Methode an glatten Gefäßmuskelzellen von Rattenmesenterialarterien nachgewiesen [13]. Es wird angenommen, daß gap-junctions für die Übertragung des synchronisierenden Signals zwischen benachbarten Zellen verantwortlich sind [3]. So kann die Synchronisation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen mit Hilfe der gap-junctions entweder durch die Übertragung eines intrazellulären Botenstoffes, wie z.B. Ca^{2+} , oder über eine elektrische Kopplung der Zellmembranen erfolgen.

Es wurden unterschiedliche, z.T. gegensätzliche, Einflüsse des Endothels auf die Vasomotion beobachtet. So wurden in verschiedenen Präparaten sowohl endothelabhängige als auch –unabhängige Vasomotionen und Oszillationen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beschrieben [3].

Obwohl in großem Umfang Untersuchungen der Vasomotion und der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen in glatten Gefäßmuskelzellen erfolgten, sind die Mechanismen, die einer koordinierten Kontraktion der glatten Muskelzellen zugrunde liegen, noch nicht vollständig geklärt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluß einer adrenergen Stimulation einerseits sowie den des Endothels andererseits auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale einzelner glatter Gefäßmuskelzellen innerhalb intakter kleiner Arterien zu untersuchen.

Die $[Ca^{2+}]_i$ -Signale einzelner glatter Gefäßmuskelzellen in situ wurden mit Hilfe eines konfokalen LASER-Scanning-Mikroskops unter Verwendung des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-3 AM aufgezeichnet. Dies geschah unter dem Einfluß hoher NA-Konzentrationen, welche Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ und der Wandspannung in kleinen Arterien hervorrufen. Von besonderem Interesse war die Frage, wie sich die Synchronisation der einzelnen glatten Gefäßmuskelzellen während der Erzeugung bzw. Hemmung von $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen verändert.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchslösungen

Folgende Substanzen und Versuchslösungen wurden verwendet. Alle Angaben erfolgen in mmol/l, sofern nicht anders angegeben.

2.1.1. Standardversuchslösung (SL)

NaCl 119; KCl 4,7; MgSO₄ 1,2 (Serva, Heidelberg),
CaCl₂ 2,5; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 25 (Merck, Darmstadt),
EDTA 0,03; Glukose 5 (Sigma, Deisenhofen)

2.1.2. Farbstofflösungen

Die Farbstofflösungen enthielten 18 µmol/l Fluo-3 AM (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), in einigen Versuchen zusätzlich 20 µmol/l Fura-Red AM (Molecular Probes), in SL. Die Farbstoffe wurden zunächst in DMSO gelöst und dann in die SL gegeben. Der Lösung wurde Pluronic F-127 (Molecular Probes) in einer Dosierung von 1 µl einer 20 %igen Stammlösung in DMSO pro 10 nmol AM-Ester zugesetzt. Die DMSO-Endkonzentration der Farbstofflösungen betrug 0,58 % (0,96 % bei Verwendung beider Farbstoffe).

2.1.3. Weitere Substanzen

Azetylcholin (ACh) 10 µmol/l (Serva)
Ascorbinsäure 6; 1-Heptanol 2; Indomethacin 10 µmol/l; L-Arginin 0,125; Nω-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) 1; Nitroprussid-Natrium (SNP) 1 µmol/l; Noradrenalin (NA) 1, 3 oder 10 µmol/l (alles Sigma)

Die Lösungen wurden während der Präparation und der Versuche mit Carbogengas (5% CO₂, 20% O₂, 75% N₂) auf einen pH-Wert zwischen 7,40 und 7,42 äquillibriert. Die Unterdrückung des zyklooxygenaseabhängigen zellulären Signalweges erfolgte

durch Zugabe von 10 $\mu\text{mol/l}$ Indomethacin zur SL. Bei der Verwendung von NA wurde der Lösung 1 mg Ascorbinsäure je ml Lösung zur Vermeidung einer Oxidation des NA zugesetzt. Bei Versuchen mit intaktem Endothel enthielt die Standardlösung 0,125 mmol/l L-Arginin als Substrat der NO-Synthese des Gefäßendothels. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluoreszenzfarbstoffe wurden die Versuche in einem abgedunkelten Labor durchgeführt.

2.2. Präparation der Rattenmesenterialarterien

Für die Präparation der Mesenterialarterien wurden weibliche und männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 170 g und 330 g verwendet. Die Tiere wurden mit Äther betäubt und durch Ausbluten getötet. Nach Eröffnung des Bauchraumes wurde ein ca. 10 cm langer Dünndarmabschnitt mit zugehörigem Mesenterium entnommen und in vorgekühlte (5 °C) SL überführt. Die Präparation der Arterien erfolgte in einer mit Silikon-Elastomer (Sylgard 184, Dow Corning, Seneffe, Belgien) ausgegossenen Präparationsschale. Die Dünndarmschlinge wurde mit dem zugehörigen Mesenterium ringförmig aufgespannt. Unter einem Stereomikroskop (Hundt, Wetzlar) erfolgte die Auswahl von Arterienabschnitten mit einem Außendurchmesser von 150 bis 250 µm und einer Länge von 5 – 10 mm. Diese wurden mit mikrochirurgischen Instrumenten aus dem Mesenterium herausgelöst. Das anhaftende Gewebe sowie die begleitende Vene wurden entfernt. Die isolierte Arterie wurde am proximalen Ende auf eine Glaskapillare gezogen. Durch Spülung mit SL ließen sich Blutreste aus dem Lumen entfernen. In einem Teil der Experimente wurde mittels Luftperfusion über 1 min das Gefäßendothel zerstört. Den Erfolg dieser Methode haben Weidelt et al. in vorangegangenen Experimenten bestätigt [14]. Die relaxierende Wirkung von 10 µM ACh auf das Gefäß wurde durch die Luftpassage auf weniger als 10 % der maximalen Wirkung reduziert. Anschließend wurden die Arterien vollständig auf eine dem Gefäßdurchmesser entsprechende Glaskapillare gezogen (s. Abb. 1). So konnten Artefakte durch Eigenbewegungen während der Untersuchung mit dem konfokalen LASER-Scanning-Mikroskop weitgehend vermieden werden.

2.3. Beladung der Mesenterialarterien mit Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen

Die isolierten und kanülierten Arterien wurden in ein Eppendorf-Gefäß übertragen und mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 AM, sowie in einigen Experimenten gleichzeitig mit einem weiteren Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff, Fura-Red AM, beladen. Die Azetoxymethylester (AM) der Farbstoffe wurden verwendet, damit die Farbstoffe die Zellmembranen der Zellen passieren können. Durch Esterasen erfolgt intrazellulär die Spaltung der Esterverbindung und die Freisetzung des Farbstoffes. Dieser besitzt eine viel geringere Lipidlöslichkeit als die Esterverbindung und kann so kaum in den Extrazellularraum zurückdiffundieren. Zur Verbesserung der Löslichkeit der Farbstoffester in der wäßrigen Standardlösung wurden diese zunächst in DMSO gelöst und danach in die SL geben. Um das Ausmaß der Präzipitation der Farbstoff-AM-Ester zu vermindern, enthielt die Farbstofflösung zusätzlich Pluronic F-127. Die Beladung erfolgte bei 19 °C, um die Kompartimentalisierung der Farbstoffe in den Zellorganellen zu minimieren [16]. Die Beladungszeit betrug 12 bis 16 Stunden. Kürzere Zeiten führten zu keiner ausreichenden Beladung der Muskelzellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen.

2.4. Fluoreszenzmikroskopie und Datengewinnung

Die farbstoffbeladenen Präparate wurden in eine Meßkammer mit einem Volumen von 1 ml überführt. Mittels einer Metallfeder wurde die Glaskapillare mit dem aufgezogenen Gefäß am Boden (Objektträgerdeckglas mit einer Stärke von 160 μm) der Kammer fixiert (Abb. 1).

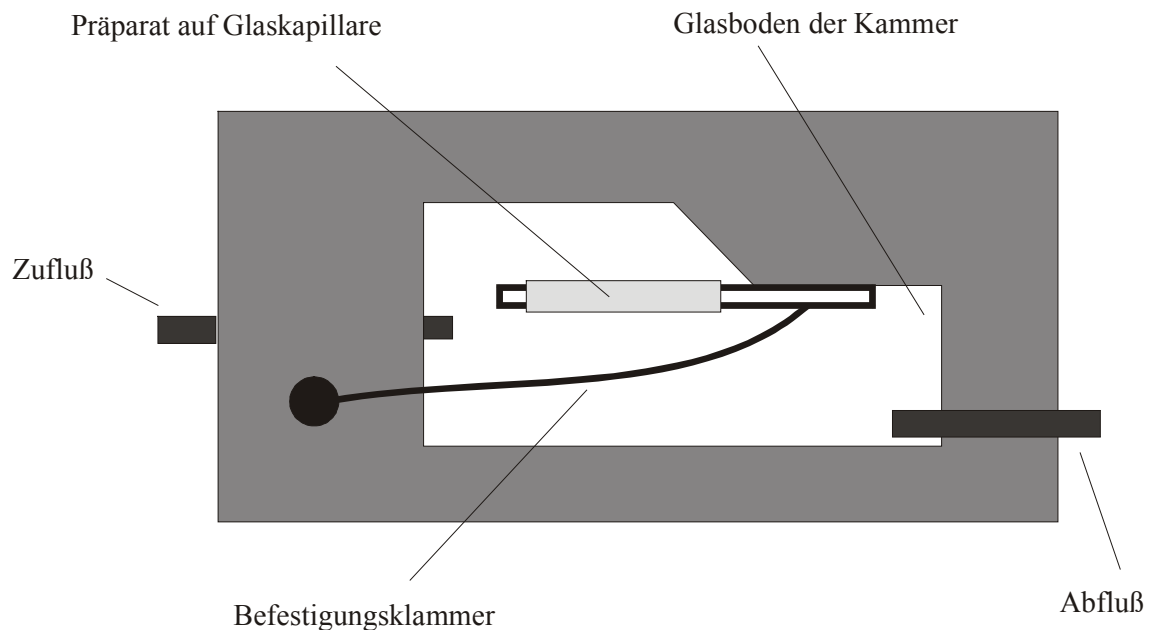


Abb. 1: Schematische Darstellung der Meßkammer

Vor Beginn eines jeden Versuches wurde das Präparat eine Stunde mit SL gespült, um extrazelluläre Farbstoffreste auszuwaschen. Der Zustrom der verschiedenen Lösungen wurde über ein Ventilsystem gesteuert. Am gegenüber liegenden Rand der Kammer wurde die Lösung mittels einer Pumpe abgesaugt. Ein Lösungwechsel in der Versuchskammer war innerhalb von 30 s möglich. Mit Hilfe eines Wärmeaustauschers im Zulauf und eines Temperaturfühlers wurden die Versuchslösungen auf 34 °C temperiert.

Das konfokale Mikroskop bestand aus einem Insight IQ imaging system (Meridian Instruments, Okemos, Michigan, USA) und einem Umkehrmikroskop (IMT-2, Olympus, Tokio, Japan). Das Scan-System enthielt einen Galvanometer-getriebenen bidirektionalen Spiegel [15]. Es wurde ein 100er Objektiv (DPlan x100, 1,25 Öl, 160/0,17, Olympus) mit Immersionsöl verwendet. Die Anregung der

Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte mit einem Argon-LASER (Model 532, Omnicrome, Chino, USA, wichtigste emittierte Wellenlänge 488 nm, max. verwendete Leistung 25 mW). Die von den Farbstoffen emittierten Fluoreszenz wurde mit einer CCD-Kamera (CCD72E, Dage-MIT Inc., Michigan, USA) registriert und auf Videoband (S-VHS) aufgezeichnet (Abb. 2).

Für die Auswertung wurden mit einem Frame-Grabber Bildfolgen (Einzelbilder mit max. 512 x 480 Pixel) des Fluoreszenzverlaufes (Zeitfolgen) mit einer Frequenz von max. 6 s⁻¹ in den Rechner eingelesen. Bei der Verwendung von zwei Farbstoffen wurden für Fluo-3 ein Bandpaßfilter 530/30 nm und für Fura-Red ein Hochpaßfilter 630 nm LP verwendet. Durch die Verwendung zweier Filter war aufgrund des Filterwechsels bei jedem Bild der Bildfolge eine Aufzeichnung auf Video nicht möglich. Hier wurden die Bildfolgen mit einer Frequenz von 1 s⁻¹ direkt im Rechner gespeichert.

Der Z-Trieb ermöglichte das vertikale Verschieben der optischen Schnittebene in Schritten von minimal 0,5 µm, so daß Folgen von longitudinalen Schnittbildern der untersuchten Gefäßabschnitte in unterschiedlichen Ebenen erstellt werden konnten (Z-Serie).

Entsprechend der vermuteten einzelnen glatten Gefäßmuskelzellen wurden für die Analyse der zeitlichen Fluoreszenzänderungen einzelner glatter Gefäßmuskelzellen Areale quer zur Gefäßlängsachse ausgewählt. Die zeitabhängige mittlere Fluoreszenz dieser Areale wurde mit Hilfe der Software des Systems Insight IQ errechnet [17].

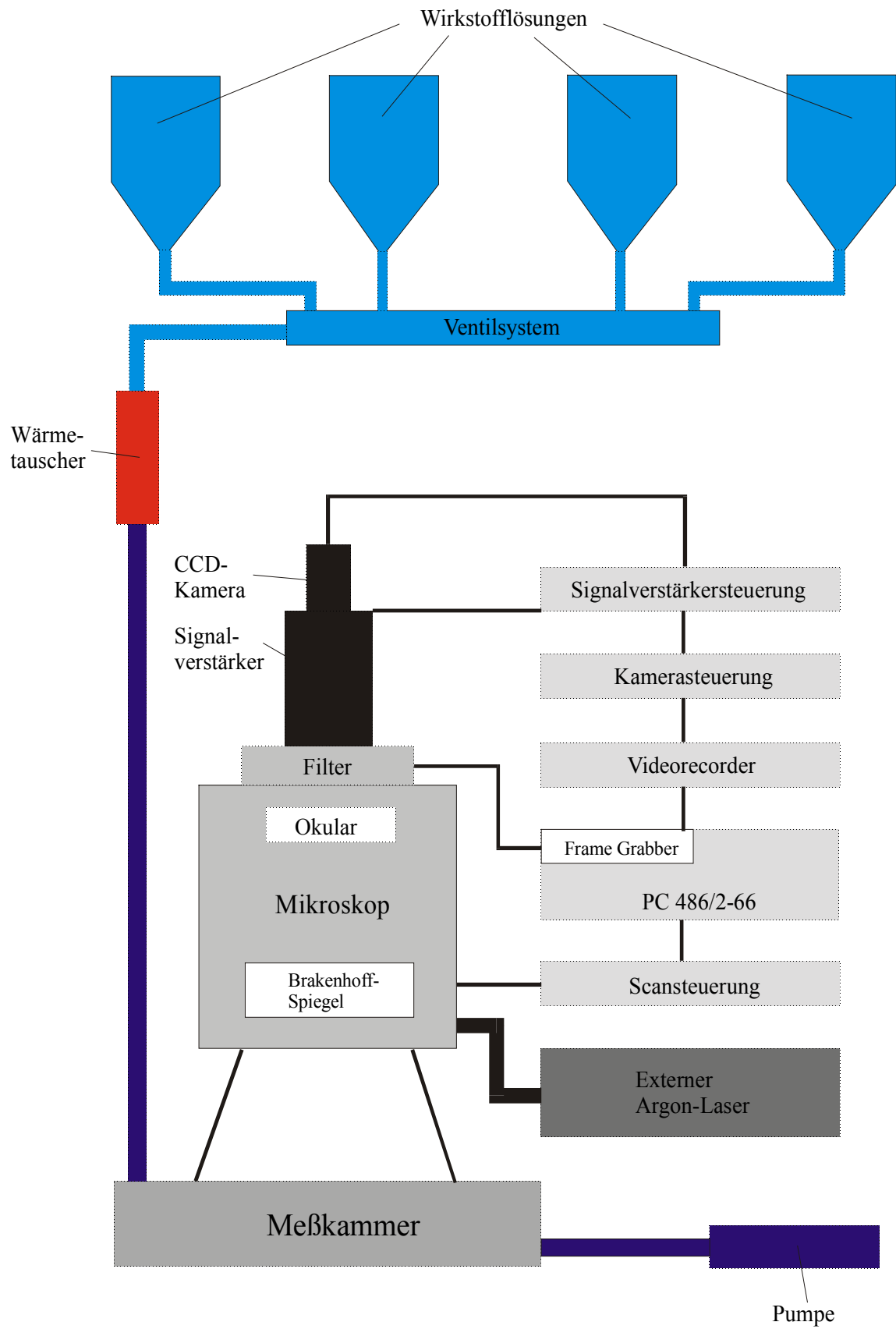


Abb. 2: Schematische Darstellung des Meßplatzes

2.5. Statistik

Die zeitlichen Fluoreszenzverläufe der einzelnen ausgewählten Areale wurden mit Hilfe des Programmes SigmaPlot 5.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA) graphisch dargestellt. Als Maß für die zeitliche Synchronizität dieser Fluoreszenzverläufe wurde deren Kreuzkorrelationskoeffizient mit dem Programm StatGraphics (STSC Inc., Rockville, USA) berechnet. Dazu wurden jeweils die Fluoreszenzverläufe zweier Areale miteinander verglichen. Bei mehr als zwei Arealen im untersuchten Gefäßabschnitt wurde der Fluoreszenzverlauf jedes Areals mit jedem der übrigen verglichen und aus den Kreuzkorrelationskoeffizienten der Mittelwert gebildet. Statistische Daten wurden in Form von Mittelwert $\pm$ Standardfehler berechnet (Microsoft Excel 97, Microsoft Corporation). Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen einzelnen Mittelwerten wurde mit Hilfe von ANOVA- und anschließend paarweisem t-Test überprüft ($p < 0,05$).

3. Ergebnisse

3.1. Der Einfluß von Noradrenalin auf die $[Ca^{2+}]_i$ -abhängige Fluoreszenz in glatten Gefäßmuskelzellen

Die Abb. 3 zeigt eine Folge longitudinaler Schnittbilder (Z-Serie) einer Rattenmesenterialarterie nach Beladung mit Fluo-3. Beginnend am äußeren Rand der Adventitia wurden fortlaufend in 1- μ m-Schritten longitudinale Schnittbilder bis in den Bereich des Gefäßendothels aufgenommen. In einer Tiefe von 16 bis 30 μ m ließen sich senkrecht zur Gefäßlängsachse angeordnete Areale mit stärkerer Fluoreszenz abgrenzen, welche die glatten Gefäßmuskelzellen repräsentieren (Abb. 3a). Weiter zentral finden sich längs zur Gefäßachse angeordnete Strukturen. Diese stellen das Gefäßendothel [18] dar. Nach Stimulation mit 3 μ M NA erhöhte sich die Fluoreszenz in den glatten Gefäßmuskelzellen. Nach einem initialen Fluoreszenzanstieg von ca. 60 s Dauer wurden im weiteren Verlauf rhythmische Änderungen der Fluoreszenzintensität beobachtet. Abb. 3b zeigt eine Z-Serie nach Stimulation mit 3 μ M NA zum Zeitpunkt der konstanten Fluoreszenzerhöhung.

Wurde die Ebene der Signalgewinnung in den Bereich der glatten Gefäßmuskelzellen gelegt, so ließ sich mit Hilfe einer Zeitserie die rhythmische Änderung der Fluoreszenzintensität in den Gefäßmuskelzellen darstellen (Abb. 4).

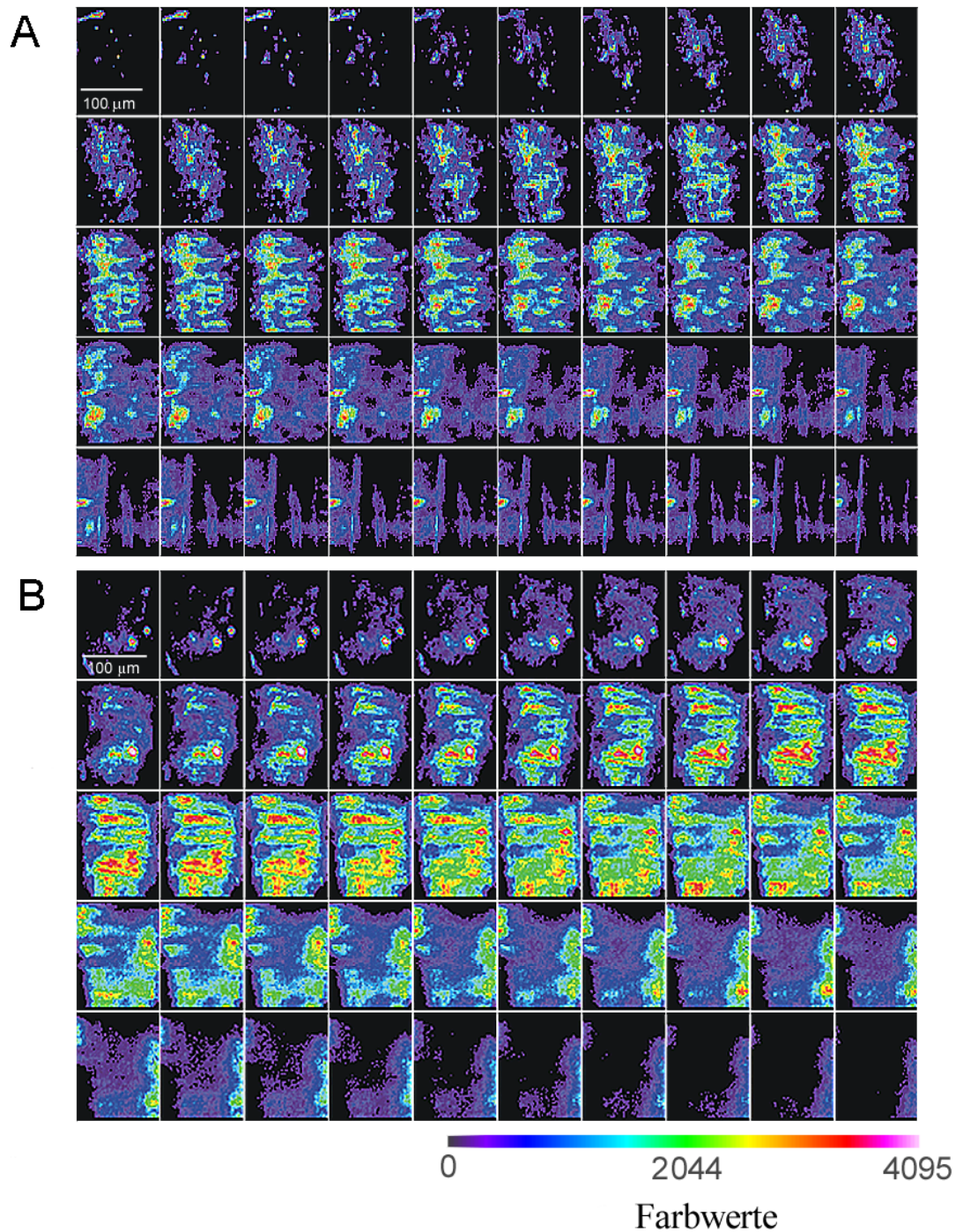


Abb. 3: Z-Serie der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzverteilung (Pseudofarbdarstellung, rote Pixel zeigen eine hohe, blaue eine niedrige $[\text{Ca}^{2+}]_i$) in einer intakten Mesenterialarterie der Ratte vor (A) und nach Applikation von 3 μM NA (B). Die Darstellungen beginnen (linke obere Bildecke) an der Adventitia und schreiten in 1 μm -Schritten zum Gefäßlumen fort. Die Gefäßlängsachse verläuft in dieser Darstellung in vertikaler Richtung.

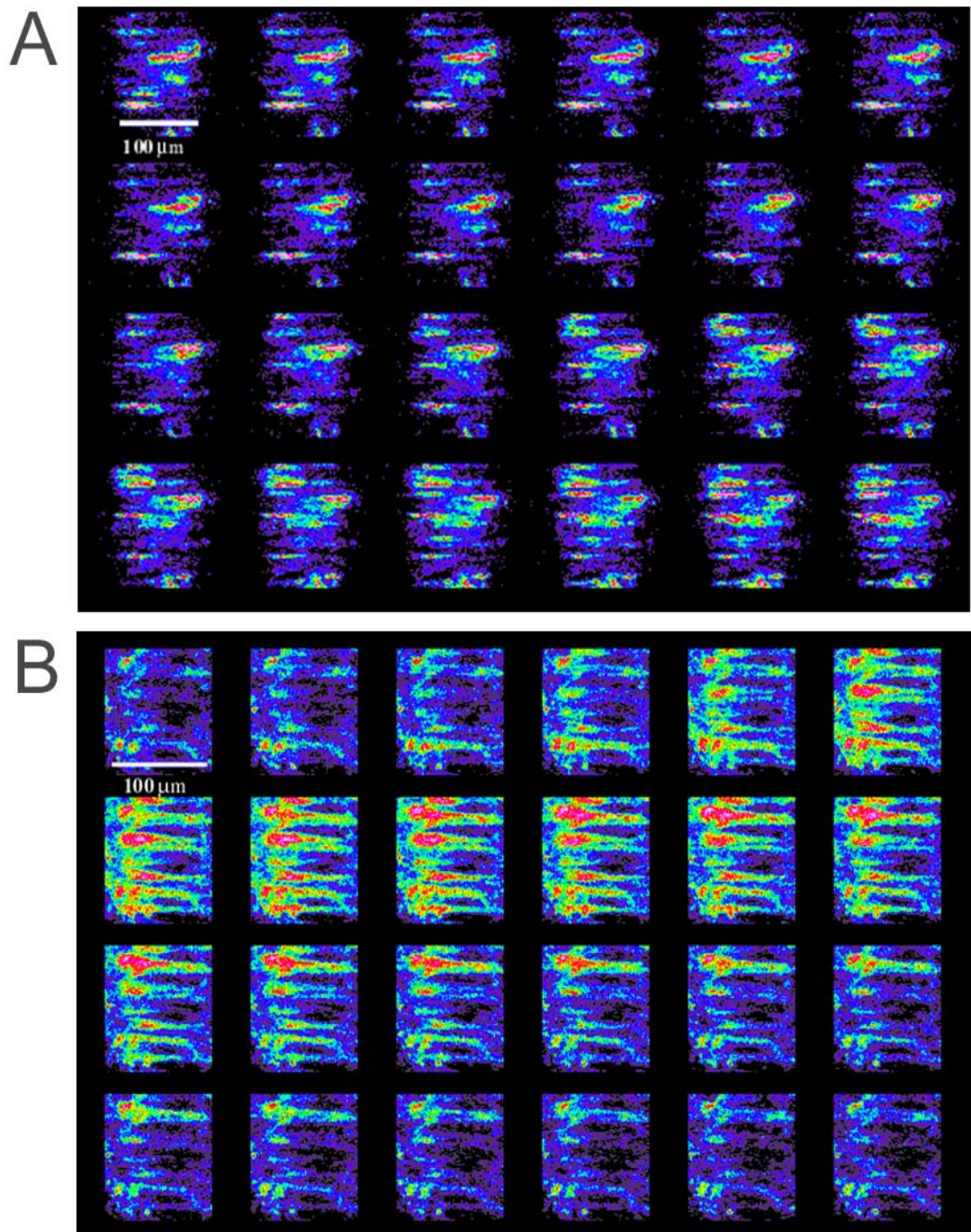


Abb. 4: Beispiele für die zeitabhängige Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale in einzelnen glatten Muskelzellen intakter Mesenterialarterien. Zeitserie des Fluo-3-Fluoreszenzverlaufes nach Stimulation mit 1 μ M NA (A) bzw. 3 μ M NA (B). Zeitintervall 280 ms. A und B zeigen zwei verschiedene Gefäße.

3.2. Der Einfluß der Noradrenalkonzentration auf die Korrelation der $[Ca^{2+}]_i$ -abhängigen Fluoreszenzsignale glatter Gefäßmuskelzellen

Nach der Zugabe von NA zur Badlösung wurden wiederholt transiente Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in den glatten Gefäßmuskelzellen beobachtet. Bei einer NA-Konzentration von 1 μM traten nur sporadische $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in einzelnen Zellen auf. Das bedeutet, die Fluoreszenzmaxima erschienen eher stochastisch verteilt in den einzelnen glatten Gefäßmuskelzellen, mit Zeitintervallen von mehreren Sekunden zwischen den Maxima einzelner Zellen. Die zeitliche Korrelation der Fluoreszenzsignale einzelner Gefäßmuskelzellen war gering (Abb. 4a, 5a, 6b). Eine Erhöhung der NA-Konzentration auf 3 oder 10 μM führte zu rhythmischen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ und einer Verstärkung der Korrelation zwischen den $[Ca^{2+}]_i$ -Signalen verschiedener Zellen. (Abb. 4b, 5b und c, 6b).

Die Anzahl der $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten pro Minute stieg bei Erhöhung der NA-Konzentration von 1 auf 3 μM an. Jedoch war die Frequenz der rhythmischen Oszillationen bei einer NA-Konzentration von 3 und 10 μM etwa gleich (Abb. 6a).

Im Zusammenhang mit der Applikation von NA traten auch rhythmische Kontraktionen der Mesenterialarterien auf, welche durch das Aufziehen auf die Glaskapillare weitgehend unterdrückt werden konnten. Eine geringe Kontraktion und somit minimale Bewegung der Gefäßmuskelzellen war jedoch nicht vollständig zu verhindern. Um sicherzustellen, daß die Änderungen der Fluo-3-bedingten Fluoreszenz nicht durch Bewegungsartefakte (lokale Erhöhung der Farbstoffkonzentration bei Kontraktion) bedingt waren, wurden einige Messungen bei gleichzeitiger Beladung der glatten Gefäßmuskelzellen mit Fura-Red durchgeführt. Bei Fluo-3 handelt es sich um einen sogenannten Ein-Wellenlängen-Intensitätsmodulierenden-Indikator, d.h. durch Bindung von Ca^{2+} -Ionen kommt es zu einer Intensitätssteigerung der Fluoreszenz bei unveränderter Frequenz des emittierten Lichtes (Maximum bei 526 nm). Fura-Red verhält sich in zwei Gesichtspunkten anders. Erstens ist er ein Zwei-Wellenlängen-Indikator und weist in der Ca^{2+} -freien im Gegensatz zur Ca^{2+} -gebundenen Form ein gering verändertes Emissionsmaximum (645nm bzw. 640nm) auf. Zweitens tritt bei Ca^{2+} -Bindung eine Abnahme der Fluoreszenzintensität auf [16]. Wie in Abb. 7 dargestellt, wurden die rhythmischen Erhöhungen der Fluo-3-bedingten Fluoreszenz von synchronen Verminderungen der Fura-Red-bedingten Fluoreszenz begleitet, wie dies für $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen zu erwarten ist. Die Änderung des Quotienten der Fluo-3-

bedingten zur Fura-Red-bedingten Fluoreszenz ist somit ein genaues Maß für die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$, ohne die oben genannten Fehlerquellen [19]. Aufgrund der Synchronizität des Signals der Fluo-3-bedingten Fluoreszenz und des aus Fluo-3- und Fura-Red-bedingter Fluoreszenz gebildeten Quotienten war das Ausmaß des möglichen Fehlers bei alleiniger Verwendung der Fluo-3-bedingten Fluoreszenz jedoch minimal. Für die hier durchgeführten Messungen war die einfachere alleinige Verwendung von Fluo-3 deshalb ausreichend.

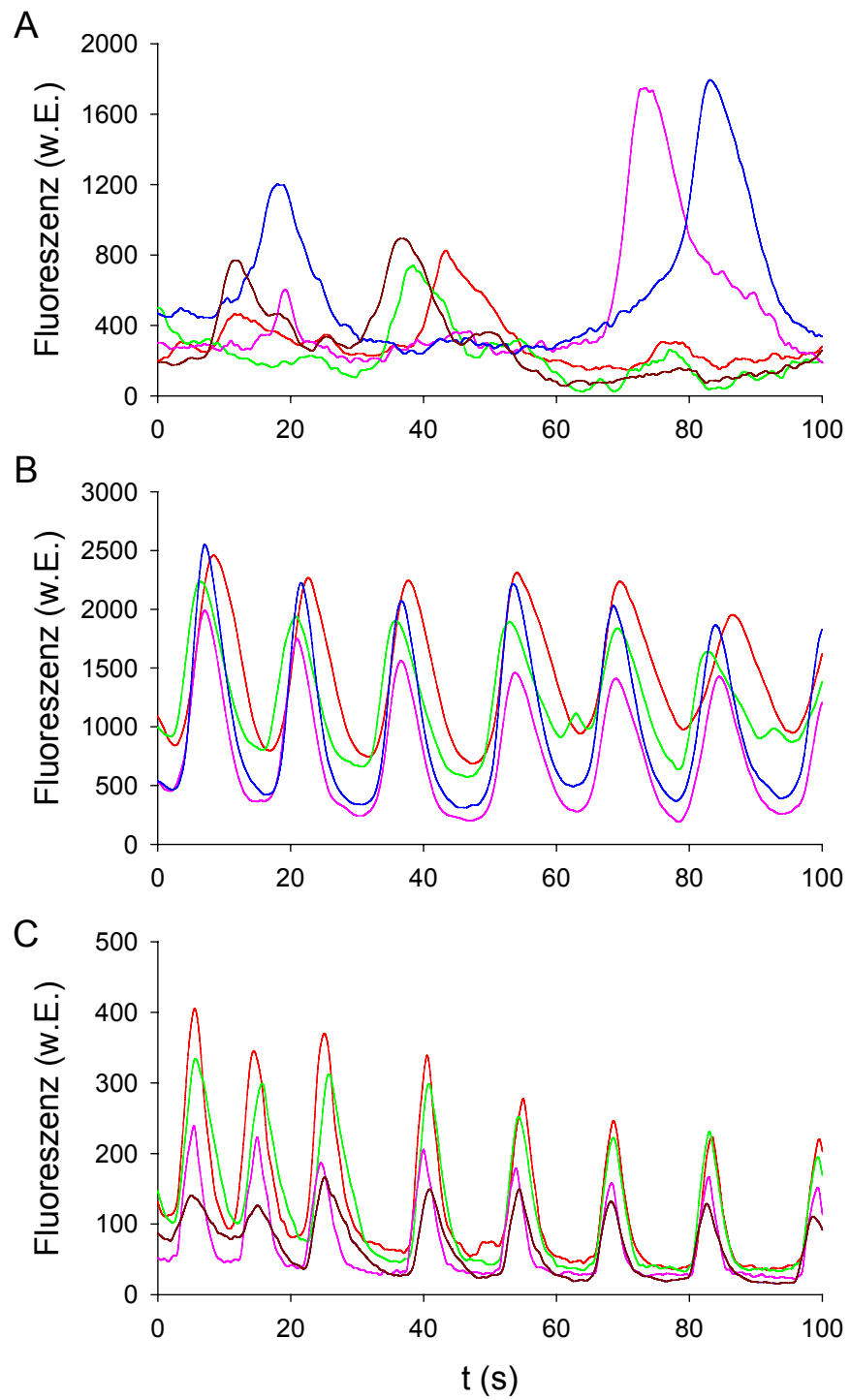


Abb. 5: Korrelation des zeitabhängigen $[Ca^{2+}]_i$ -Signals verschiedener glatter Gefäßmuskelzellen intakter Arterien nach Applikation von 1 μ M (A), 3 μ M (B) und 10 μ M NA (C). Es handelt sich um drei verschiedene Arterien.

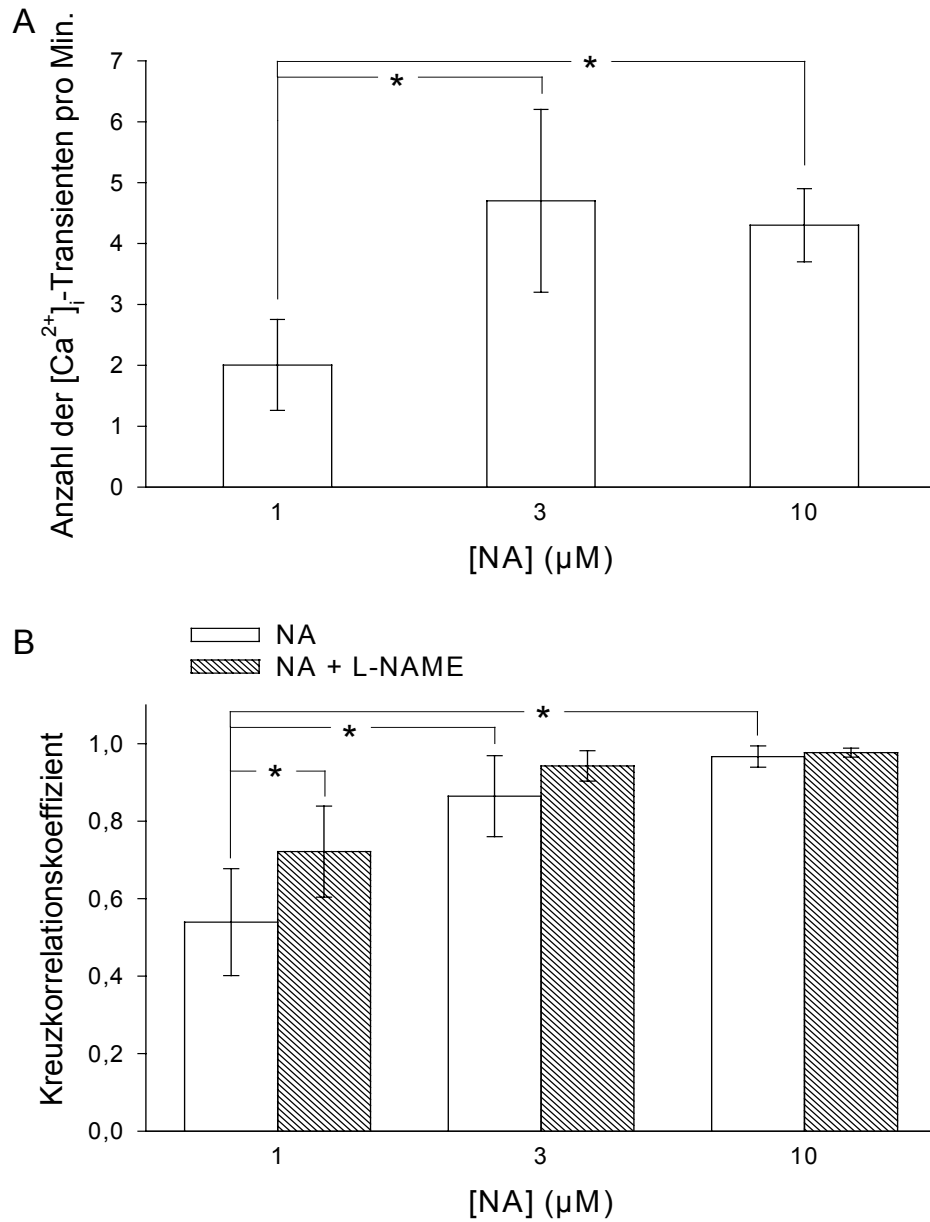


Abb. 6: Der Einfluß von NA auf das $[Ca^{2+}]_i$ -Signal glatter Gefäßmuskelzellen intakter Arterien. (A) Abhängigkeit der Häufigkeit der $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten von der NA-Konzentration. Mittelwerte von 18 – 25 Zellen aus 5 – 7 Gefäßen. (B) Mittlere Kreuzkorrelationskoeffizienten der $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten nach Applikation verschiedener NA-Konzentrationen mit und ohne zusätzlicher Gabe von 1 mM L-NAME. Mittelwerte von 16 – 40 Zellen aus 4 – 6 Gefäßen. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet.

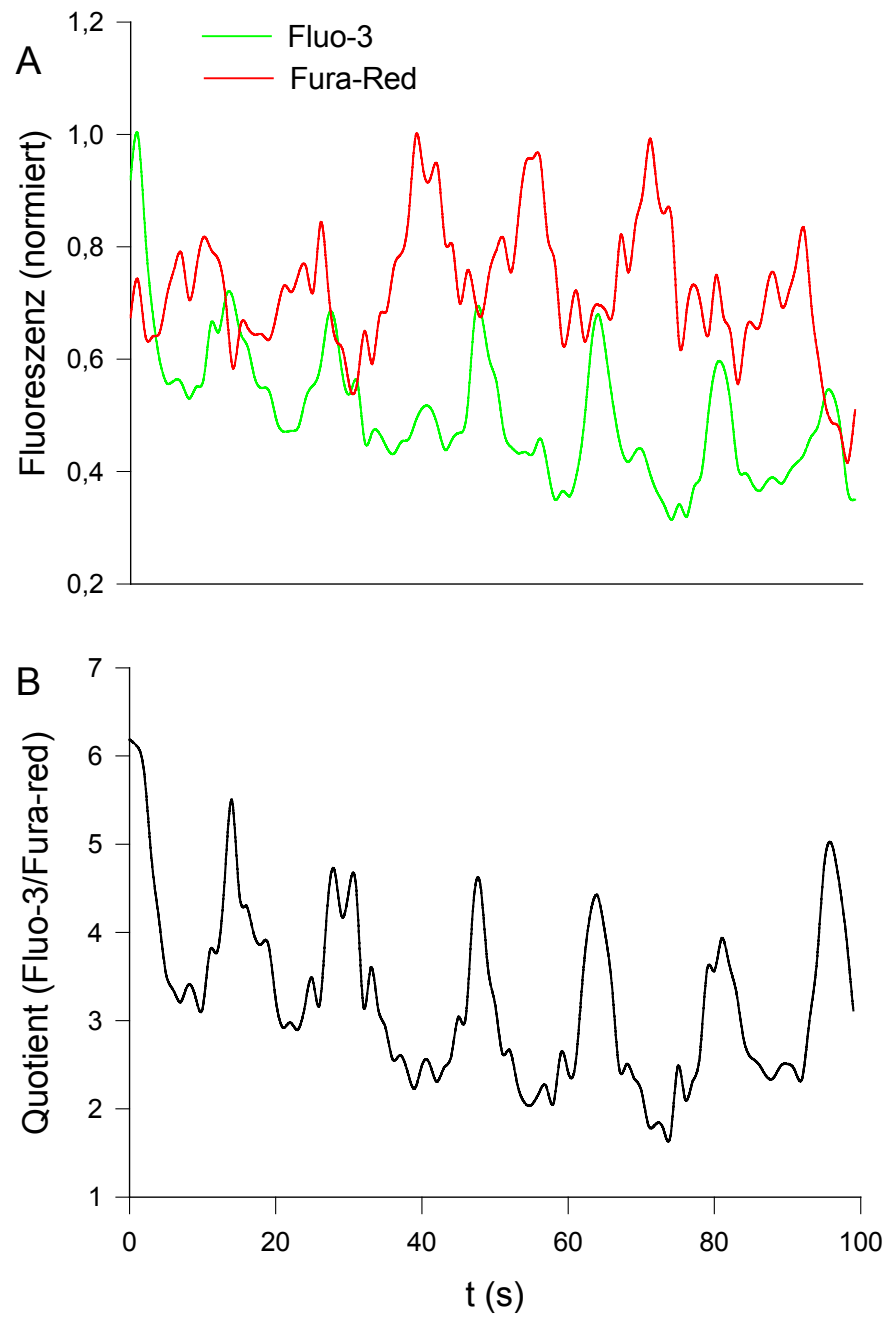


Abb. 7: Zeitabhängige Änderung des normierten mittleren Fluoreszenzsignals der Fluoreszenzfarbstoffe Fluo-3 und Fura-Red (A) und deren Quotient (B) in einer glatten Gefäßmuskelzelle nach Stimulation mit 3 μ M NA

3.3. Der Einfluß von NO auf die Korrelation der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale

Die gleichzeitige Applikation des NO-Synthase-Inhibitors L-NAME [20] zur Badlösung zusammen mit NA erhöhte die zeitliche Korrelation der $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten einzelner glatter Gefäßmuskelzellen im Vergleich zur alleinigen Gabe von NA (Abb. 6b). Dies war besonders deutlich bei einer niedriger NA-Konzentration, welche allein nur eine geringe zeitliche Kopplung der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale bewirkte. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß NO aus dem Endothel einen desynchronisierenden Effekt auf die $[Ca^{2+}]_i$ -Signale glatter Gefäßmuskelzellen hat. Die Annahme wurde durch die Beobachtung gestützt, daß ACh die $[Ca^{2+}]_i$ -Signale in Präparaten mit intaktem Endothel reversibel desynchronisierte (Abb. 8 und 12a). Durch die Gabe von L-NAME wurde die desynchronisierende Wirkung von ACh auf die $[Ca^{2+}]_i$ -Signale aufgehoben (Abb. 12a). Des weiteren hatte die exogene Zufuhr des NO-Donors SNP in Präparaten mit geschädigtem Endothel die gleiche desynchronisierende Wirkung auf die Fluoreszenzsignale wie ACh bei intaktem Endothel. Dieser Effekt war ebenfalls reversibel. Er war jedoch durch L-NAME nicht zu unterdrücken (Abb. 9 und 12b).

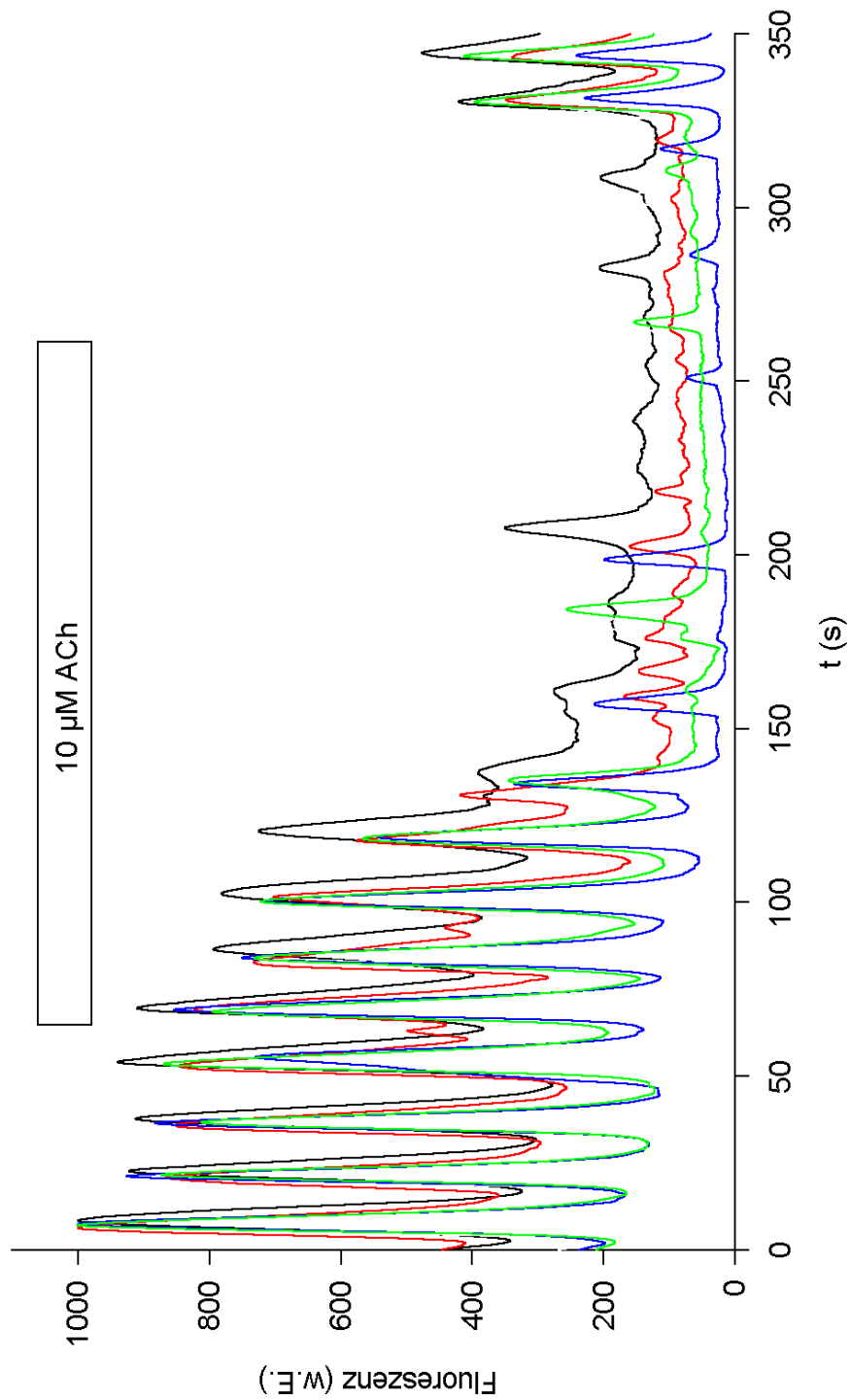


Abb. 8: Der desynchronisierende Einfluß von ACh auf $[Ca^{2+}]_i$ -Signale glatter Muskelzellen einer Mesenterialarterie. Zeitverlauf des Fluoreszenzsignals verschiedener Muskelzellen eines Gefäßes. 3 μ M NA wurde über gesamten Zeitraum appliziert. 10 μ M ACh wurde wie angegeben der Badlösung zugesetzt.

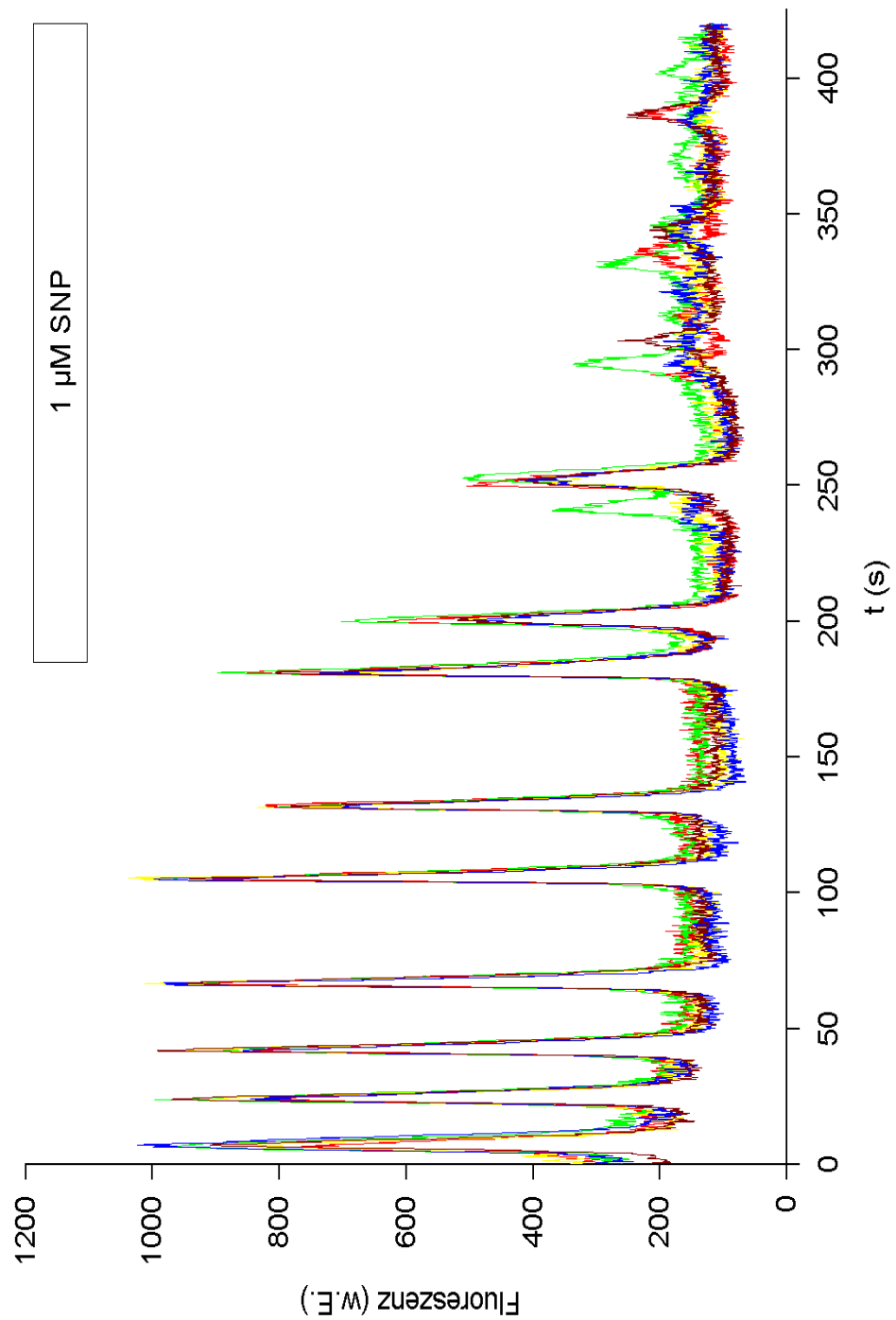


Abb. 9: Der Effekt von SNP auf synchrone $[Ca^{2+}]_i$ -Signale glatter Gefäßmuskelzellen nach Schädigung des Endothels durch Luftpassage. Die Badlösung enthielt im gesamten dargestellten Zeitraum 10 μ M NA und 1 mM L-NAME. 1 μ M SNP wurde wie angezeigt zugegeben.

3.4. Der Einfluß von Heptanol auf die Synchronisation der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale glatter Gefäßmuskelzellen

Um die Bedeutung der gap-junctions für die Synchronisation der $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten zu untersuchen, wurde nach Auslösen von synchronen $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten durch NA die gap-junction-entkoppelnde Substanz Heptanol [21] der Badlösung zugesetzt. Wie in Abb. 10 gezeigt (für die Statistik siehe Abb. 12c), führte die Zugabe von Heptanol zu einer schnellen Desynchronisation über einen Zeitraum von ca. 50 s mit annähernd unveränderten Amplituden der $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten. Nach ca. 1 min trat eine massive Reduktion der Transienten auf. Die Heptanolwirkung war reversibel, d.h. nach dem Auswaschen der Substanz traten die $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen wieder auf. $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen konnten ebenfalls in Gefäßen mit zerstörtem Endothel erzeugt werden. Bei diesen Präparaten war der Effekt von Heptanol auf die $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen gleich dem bei Gefäßen mit intaktem Endothel. Abb. 11 zeigt das Wiederauftreten von synchronen $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen nach dem Auswaschen des Heptanols am Beispiel eines Gefäßes mit zerstörtem Endothel.

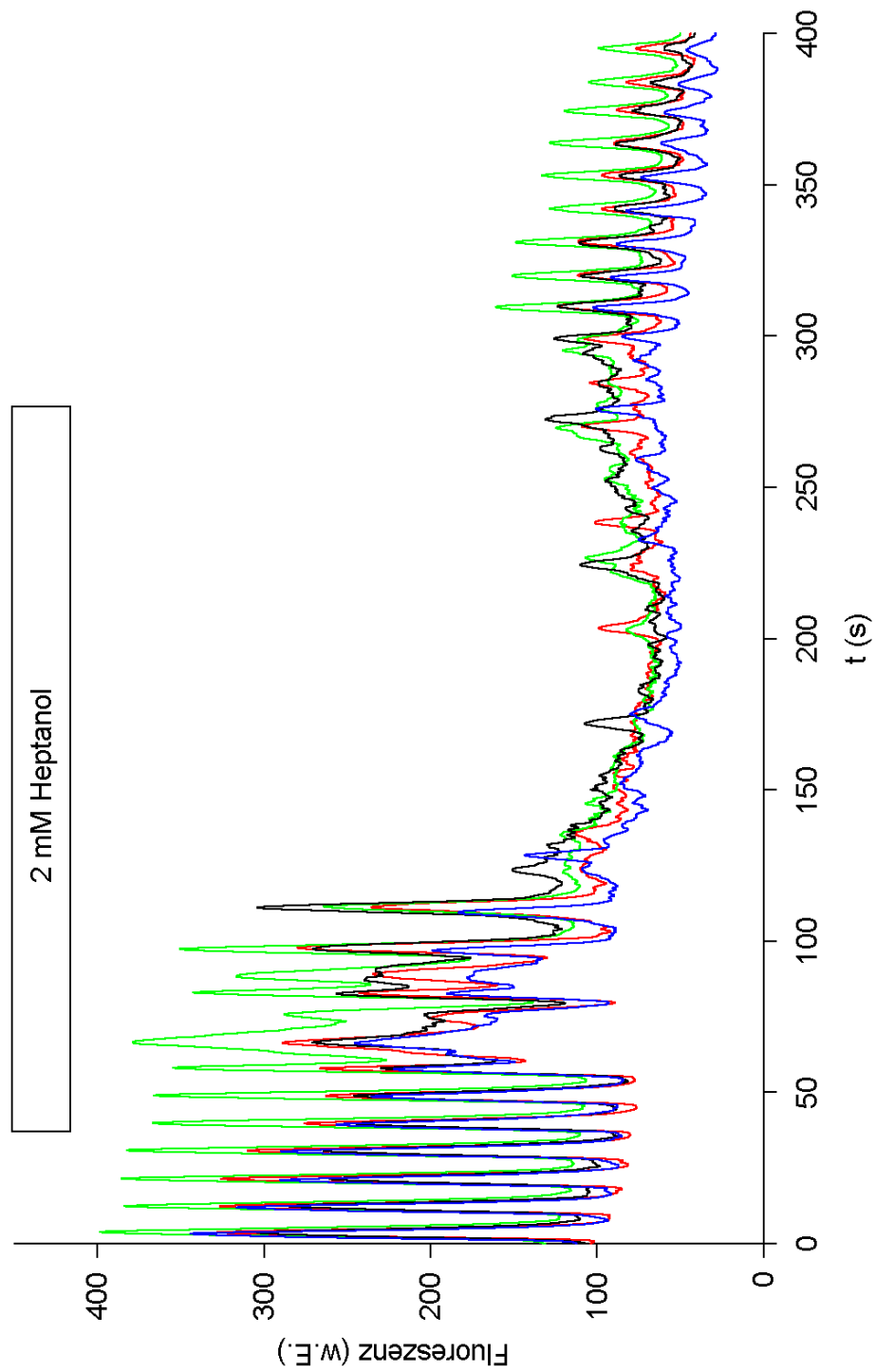


Abb. 10: Der Einfluß von Heptanol auf synchrone $[Ca^{2+}]_i$ -Signale. Beispiel für den Verlauf des mittleren Fluoreszenzsignales verschiedener glatter Muskelzellen einer Rattenmesenterialarterie. Während der gesamten Aufzeichnung wurden $3 \mu M$ NA appliziert. Heptanol wurde der Badlösung wie dargestellt zugegeben.

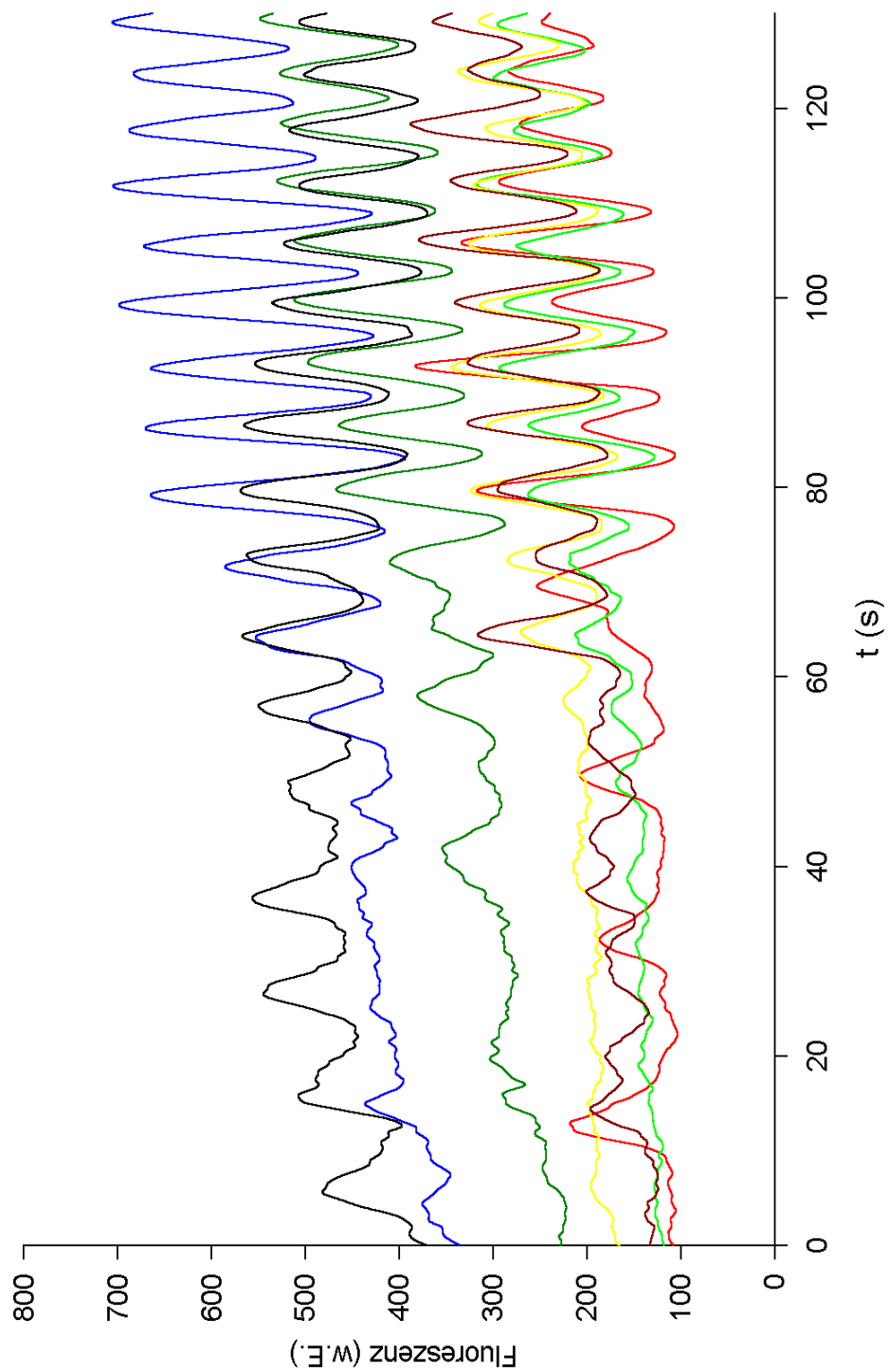


Abb. 11: Wiederauftreten der synchronen $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen in verschiedenen Gefäßmuskelzellen nach dem Auswaschen von 2 mM Heptanol am Beispiel eines Gefäßes mit zerstörtem Endothel. 3 μ M NA in der Badlösung über den gesamten Zeitraum, 2 mM Heptanol zusätzlich bis 100s vor Beginn der Aufzeichnung.

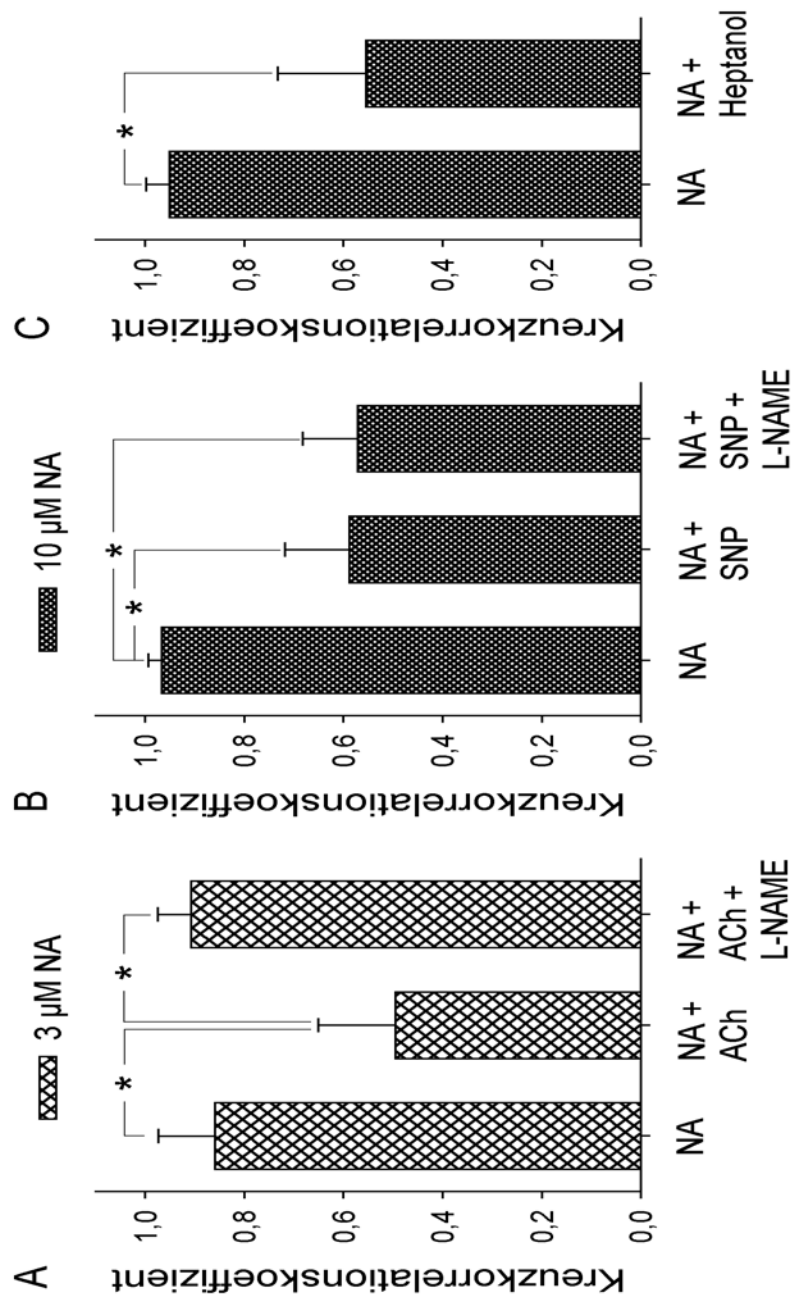


Abb. 12: Statistische Werte für den Einfluß von Modulatoren der NO-Wirkung sowie von Heptanol auf die Synchronisation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale. Darstellung des mittleren Kreuzkorrelationskoeffizienten der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten verschiedener Paare glatter Gefäßmuskelzellen. Analyse von 15 bis 38 Zellen aus 4 (A) bzw. 3 Gefäßen (B und C). Stimulation mit 3 μM (A) bzw. 10 μM NA (B und C), weitere Substanzen entsprechen der Angabe auf der Abszisse. Endothel intakt (A), zerstört (B) sowie für Gefäße mit intaktem und zerstörtem Endothel (C).

3.5. Die Bedeutung interzellulärer $[Ca^{2+}]_i$ -Wellen für die Synchronisation der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale

Bei einer NA-Konzentration von 1 μ M konnte die Ausbreitung von $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten innerhalb einzelner glatter Gefäßmuskelzellen beobachtet werden. Abb. 14 verdeutlicht an Hand dreier Topogramme die Wanderung einer $[Ca^{2+}]_i$ -Welle. Es stellte sich die Frage, ob die Synchronisation der $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen bei höheren NA-Konzentrationen durch eine interzelluläre Ausbreitung solcher $[Ca^{2+}]_i$ -Wellen hervorgerufen wird. Aus diesem Grund wurde die Ausbreitungsgeschwindigkeit der $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten in einzelnen glatten Gefäßmuskelzellen bestimmt (Abb. 13a und b). Die mittlere Ausbreitungsgeschwindigkeit betrug $25,2 \pm 2,6$ μ m/s. (N = 6 Zellen). Dieser Wert mußte in Beziehung zu dem zeitlichen Abstand zwischen den oszillierenden $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten verschiedener Zellen gesetzt werden. Bei einer NA-Konzentration von 3 μ M wurde der zeitliche Abstand der $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten mit Hilfe der Zeitverschiebung (Phasenverschiebung) der maximalen Kreuzkorrelation von Paaren parallel angeordneter glatter Gefäßmuskelzellen bestimmt. Die betrachteten Paare waren durch bis zu vier weitere interponierte Zellen voneinander getrennt. Wie in Abb. 13c dargestellt, bestand keine signifikante Abhängigkeit des zeitlichen Abstandes der $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten zweier Zellen von der Anzahl der dazwischen liegenden Zellen. Der mittlere Abstand zweier parallel liegender glatter Muskelzellen in der Gefäßwand wurde mit 18 ± 2 μ m (30 Zellen aus 5 Gefäßen) ermittelt. Das bedeutet, daß die $[Ca^{2+}]_i$ -Welle bei vier dazwischen liegenden Zellen einen Abstand von ca. 90 μ m überwinden muß. Bei der berechneten Ausbreitungsgeschwindigkeit von ca. 25 μ m/s würden dafür ungefähr 3,6 s benötigt. Aus Abb. 13c läßt sich jedoch ableiten, daß das synchronisierende Signal dafür weniger als 1 s benötigt. Aus diesem Grund kann man schließen, daß die $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen nicht durch eine interzelluläre Ausbreitung von $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten synchronisiert werden.

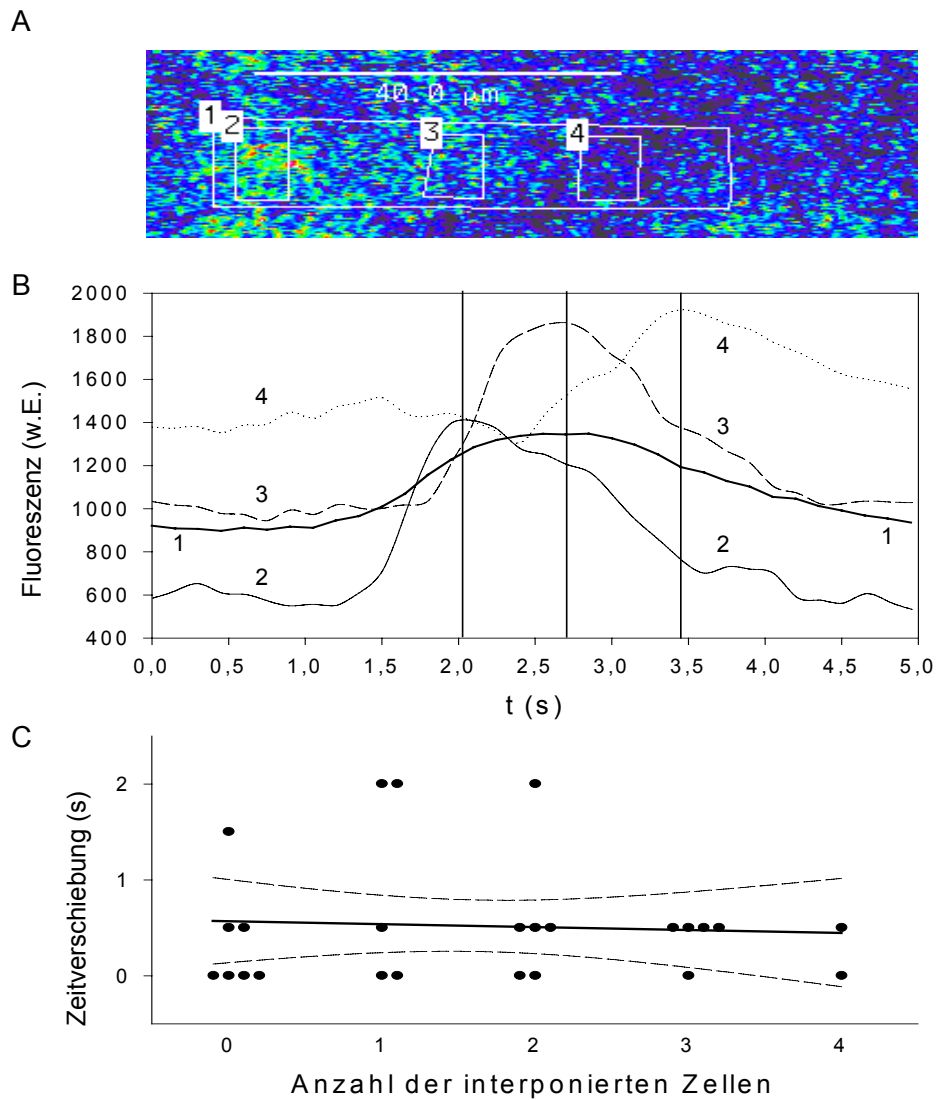


Abb. 13: Ausbreitung der $[Ca^{2+}]_i$ -Wellen. (A) Prinzip der Messung der Ausbreitungsgeschwindigkeit von $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten. Area 1 zeigt die vermutete gesamte Muskelzelle, die Areae 2 bis 4 einzelne Abschnitte davon. Pseudofarbdarstellung, rote Pixel zeigen eine hohe, blaue eine niedrige $[Ca^{2+}]_i$. (B) Zeitabhängiger Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ für die Areae aus A. Aus der Zeitverschiebung der $[Ca^{2+}]_i$ -Maxima der Areae 2 und 4 und deren Abstand ließ sich eine Geschwindigkeit von $28 \mu\text{m/s}$ errechnen. (C) Zusammenhang zwischen relativen Abstand der Zellen und der Zeitverschiebung ihrer maximalen Kreuzkorrelation. Messwerte von 3 Gefäßen mit Darstellung ihrer linearen Regression (Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden statistisch nicht signifikant von 0 verschieden).

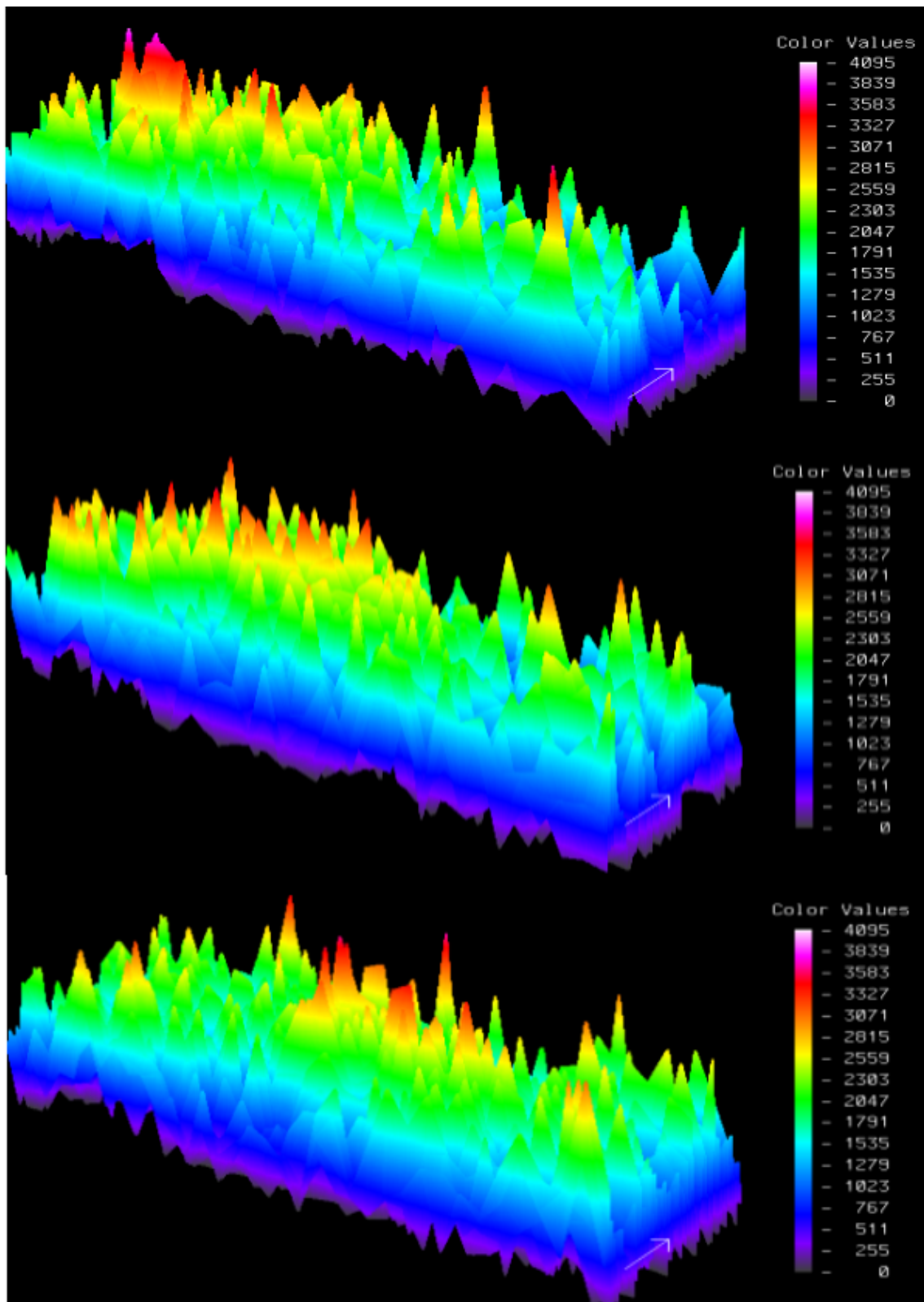


Abb. 14: Pseudofarbttopogramme der Fluoreszenzverteilung in einer Muskelzelle während einer $[Ca^{2+}]_i$ -Welle. Der dargestellte Bereich entspricht Area 1 in Abb. 13. Es werden die Fluoreszenzverteilungen zum Zeitpunkt des jeweiligen Maximums der mittleren Fluoreszenz in den Arealen 2, 3 und 4 (von oben nach unten) dargestellt.

3.6. Der Einfluß der Amplitude der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale auf deren Synchronisation

Während der Desynchronisation der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale durch ACh, SNP oder Heptanol verringerte sich die Amplitude der Fluoreszenzsignale und somit vermutlich auch der $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen. Um zu prüfen, ob ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Amplitude der Fluoreszenzoszillationen und der Synchronisation der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale besteht, wurden Experimente mit einer verminderten extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_e$) durchgeführt. Wie in Abb. 15 dargestellt, verringerten sich dadurch die Amplituden der Fluoreszenzoszillationen, ohne daß dabei eine Desynchronisation auftrat. In drei Experimenten, bei denen die Badlösung 3 μ M NA und 0,5 mM $[Ca^{2+}]_a$ enthielt, betrug der mittlere Korrelationskoeffizient der $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten $0,89 \pm 0,05$. Er unterschied sich damit nicht signifikant von dem Wert, der bei denselben Präparaten unter Verwendung von 2,5 mM $[Ca^{2+}]_a$ ermittelt wurde ($0,95 \pm 0,03$). Er war jedoch signifikant höher als nach Applikation von ACh, SNP oder Heptanol (siehe Abb. 12).

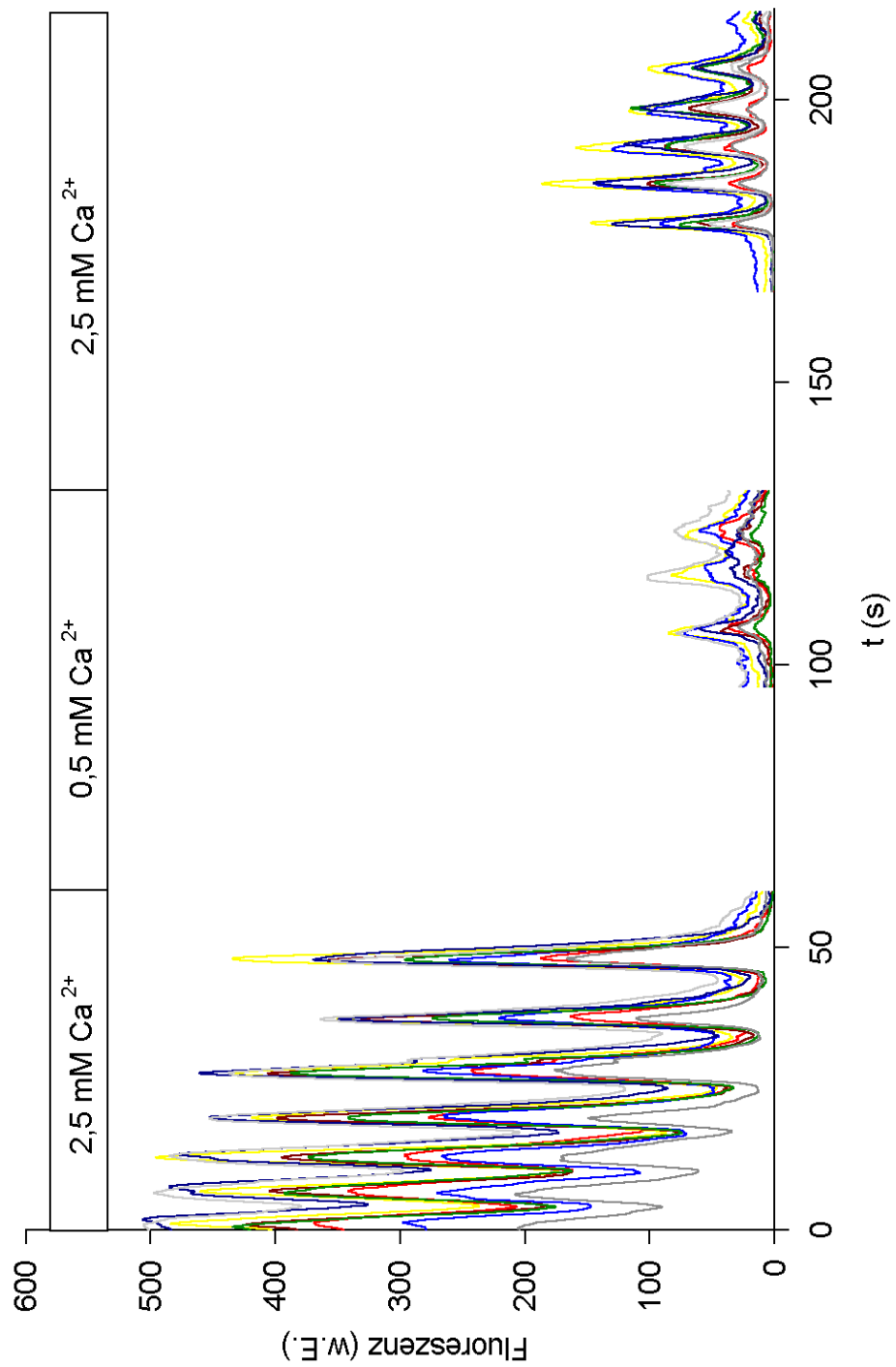


Abb. 15: Einfluß der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten glatter Gefäßmuskelzellen. Zeitlicher Verlauf des mittleren Fluoreszenzsignales verschiedener Muskelzellen eines Gefäßabschnittes unter Einwirkung von $3 \mu\text{M}$ NA. Die Ca^{2+} -Konzentration der Badlösung wurde wie angegeben verändert.

4. Diskussion

4.1. Das experimentelle Modell

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Veränderung der kontraktionssteuernden intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration einzelner Gefäßmuskelzellen an weitgehend intakten Arterien während der Applikation vasoaktiver Stimuli zu untersuchen. Mit Hilfe der durchgeführten Experimente sollte eine Brücke zwischen den Ergebnissen von Messungen der Kontraktion intakter Gefäße sowie der Untersuchung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ isolierter glatter Gefäßmuskelzellen geschlagen werden. Die Verwendung eines Mehrzellpräparates bietet Vorteile gegenüber der Untersuchung von Einzelzellen. Eine mögliche Beeinflussung der Signalübertragung und der Kontrolle der Muskelzellkontraktion durch $[\text{Ca}^{2+}]_i$ infolge der Isolierung und Kultivierung der glatten Gefäßmuskelzellen wird vermieden. Durch den erhaltenen Zellverband befinden sich die Zellen in einer eher physiologischen Umgebung. Nur in solch einem weitgehend intakten Gefäßpräparat kann die Koordination der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten einzelner Gefäßmuskelzellen untersucht werden. Andererseits ist die Kontrolle der extrazellulären Lösung eingeschränkt und ein schneller Austausch derselben nicht durchführbar. Außerdem war in den intakten Arterien die optische Auflösung geringer als bei Einzelzellpräparaten, und darum waren exakte Untersuchungen der subzellulären $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale, wie z.B. die Auflösung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -sparks, nicht möglich. Ein Nachweis von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -sparks auch in Mehrzellpräparaten ist jedoch mit Hilfe von optischen Systemen mit einer besseren Auflösung gelungen [22]. In den hier durchgeführten Experimenten konnten nur die Gesamt- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale einzelner glatter Gefäßmuskelzellen abgegrenzt werden. Obwohl es nicht gelang, die Grenzen der einzelnen Muskelzellen darzustellen, stimmen die ausgewählten Areale in Bezug auf Anordnung und Länge mit Beobachtungen mittels eines Elektronenmikroskops überein. Es besteht jedoch eine Abweichung in Bezug auf den Querdurchmesser der Zellen. Dieser weist in den elektronenmikroskopischen Präparaten bis zu 50% geringere Werte auf [23]. Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen tritt jedoch meist ein präparationsbedingtes Schrumpfen der Zellen auf.

Ein Vergleich der Zelldichte im Präparat mit der in elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigt, daß nicht alle Muskelzellen ausreichend mit Farbstoff beladen wurden.

Eine Kalibrierung des Fluoreszenzsignals auf die absolute $[Ca^{2+}]_i$ erwies sich als schwierig und unzuverlässig, da die Beladung der einzelnen Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen zum Teil sehr unterschiedlich ausfiel. Aus diesem Grund wurden Messungen der relativen Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ unter Verwendung von Fluo-3 durchgeführt. In einigen Experimenten erfolgte die Beladung zusätzlich mit Fura-Red. Dadurch konnte gezeigt werden, daß die Anstiege der Fluo-3-Fluoreszenz durch Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$ bedingt waren und nicht aufgrund von Bewegungsartefakten entstanden [19].

4.2. Die Synchronisation des $[Ca^{2+}]_i$ -Signals einzelner glatter Gefäßmuskelzellen wird durch NA kontrolliert

Die $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen in glatten Gefäßmuskelzellen werden wahrscheinlich über α_1 -adrenerge Rezeptoren ausgelöst, da der α_1 -adrenerge Agonist Phenylephrin $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen in glatten Gefäßmuskelzellen erzeugen kann. Dies wurde in ähnlichen Versuchen wie den hier beschriebenen gezeigt [13; 24] und stimmt mit der generellen Erkenntnis überein, daß durch Stimulation der Phospholipase-C-Signalkette (die u.a. über α_1 -adrenerge Rezeptoren aktiviert wird) Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ sowie der Muskelspannung glatter Muskelzellen ausgelöst werden können [3; 6; 11].

Bei einer niedrigen NA-Konzentration von 1 μ M waren die $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten der einzelnen glatten Gefäßmuskelzellen zeitlich nur schwach oder gar nicht gekoppelt. Dies stimmt mit von Weidelt et al. durchgeführten Experimenten überein, bei denen unter Verwendung des gleichen Präparates mittels Einzelelektroden-Spannungsmessung die Änderungen von Membranpotentialen und Strömen einzelner glatter Gefäßmuskelzellen bestimmt wurden und keine elektrische Kopplung zwischen den Gefäßmuskelzellen gefunden wurde [14]. In gleichartigen Experimenten wie den hier beschriebenen konnten $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten in einzelnen glatten Gefäßmuskelzellen von weitgehend intakten Rattenschwanzarterien beobachtet werden. Konzentrationen von NA oder Phenylephrin bis zu 1 μ M sowie die Stimulation der perivaskulären sympathischen Nervenfasern führten zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des Auftretens von $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten in einer einzelnen Zelle bzw. erhöhten die Anzahl der Zellen, in denen $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten beobachtet werden konnten. Die Signale waren auch hier nicht synchron [13; 22; 25]. Umgekehrt führte die Gabe von ACh oder SNP bei mittels 0,3 μ M NA oder Reizung der perivaskulären Nervenfasern stimulierten Gefäßmuskelzellen zu einer Reduktion der Zellen mit $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten sowie der Frequenz der Oszillationen in einzelnen Zellen [26]. Daraus wurde geschlossen, daß die abgestufte kontraktile Antwort einer Arterie, welche durch die Menge des sympathischen Transmitters und des vom Endothel synthetisierten NO kontrolliert wird, größtenteils über die abgestufte Anzahl aktiver Zellen in der Gefäßwand reguliert wird. Dies würde also analog zur Kontrolle der Kraftentfaltung in Skelettmuskeln durch die Rekrutierung motorischer Einheiten erfolgen. Für einen solchen Mechanismus wäre eine Synchronisation der Einzelzellkontraktionen aufgrund einer Kopplung der $[Ca^{2+}]_i$ -

Signale einzelner glatter Gefäßmuskelzellen nicht sinnvoll. Das beschriebene Prinzip würde eher in Gefäßen (kleine Arterien) mit mehreren konzentrischen Lagen von Muskelzellen funktionieren, wogegen bei Arteriolen mit nur einer Muskelschicht die glatten Gefäßmuskelzellen meist gekoppelt erscheinen [10].

Die hier durchgeführten Messungen zeigen, daß bei höheren Konzentrationen von 3 und 10 μM NA eine Koordination der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale einzelner glatter Gefäßmuskelzellen eintritt, die zu synchronen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Antworten großer Teile der Gefäßwand führt. Dies ist begleitet von einer synchronen Vasomotion, wie mittels konfokaler Darstellung von Muskelzellen in Mesenterialarterien [13; 24] und afferenten Arteriolen der Ratte [27] gezeigt werden konnte. Die Spannungsentwicklung in den hier untersuchten Gefäßen entsteht so durch eine zunehmende Synchronisation der Kontraktion der einzelnen Muskelzellen.

Die Frequenz der Oszillationen änderte sich nicht bei Erhöhung der NA-Konzentration von 3 auf 10 μM . Das erscheint sinnvoll im Zusammenhang mit Berechnungen, die zeigen, daß Änderungen des Widerstandes und Flusses von der Oszillationsfrequenz unabhängig sind [7]. Jedoch wurde unter verschiedenen experimentellen Bedingungen bei Erhöhung der Agonistkonzentration in einigen Fällen eine Zunahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationsfrequenz, jedoch nicht der Amplitude der Oszillationen beobachtet. Die maximale Frequenz wurde gewöhnlich bei der Konzentration beobachtet, die auch die maximale mechanische Antwort hervorrief [11].

4.3. NO desynchronisiert die $[Ca^{2+}]_i$ -Signale einzelner glatter Gefäßmuskelzellen

Der Gefäßtonus wird durch die Balance kontrahierender und relaxierender Mediatoren gesteuert. Stickstoffmonoxid (NO), welches nach Stimulation durch Agonisten vom Endothel freigesetzt wird, ist einer der wichtigsten Vasodilatoren. Wenn kontrahierende Agonisten wie NA die Vasomotion durch Synchronisation der Gefäßmuskelzellen auslösen, so kann vermutet werden, daß relaxierende Substanzen wie endotheliales NO ihre hemmende Wirkung auf die Oszillationen der Wandspannung durch einen desynchronisierenden Effekt erreichen. Dies fand sich in den hier beschriebenen Experimenten bestätigt. $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen konnten durch NA nicht nur bei fehlendem Endothel ausgelöst werden, vielmehr verringerte ACh in Abhängigkeit von einem funktionierenden Endothel die Korrelation der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale einzelner glatter Gefäßmuskelzellen. Dieser Effekt lies sich durch L-NAME blockieren und durch den NO-Donor SNP nachahmen. L-NAME hatte keinen Effekt auf die SNP-induzierte Desynchronisation. Das weist darauf hin, daß endotheliales NO in der Lage ist, unter den angegebenen experimentellen Bedingungen synchrone $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen zu behindern. Weiterhin spricht der synchronisierende Effekt von L-NAME bei intaktem Endothel für eine ständige basale Freisetzung von NO aus dem Endothel auch ohne ACh-Stimulation, welche einen desynchronisierenden Effekt auch unter Ruhebedingungen zur Folge hat.

Der Einfluß des Endothels auf die $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen und die Änderungen der Gefäßwandspannung könnte von den für die Auslösung der Oszillationen gewählten experimentellen Bedingungen abhängen [3]. Zum Beispiel wurde für Mesenterialarterien der Ratte eine Abhängigkeit der Oszillationen der Wandspannung von einem intakten Endothel in einigen Versuchen nachgewiesen [28; 29]. In anderen Experimenten war dies nicht der Fall [24; 30–32]. Weiterhin wurde, obwohl eine kontinuierliche basale Freisetzung von NO als notwendig für Oszillationen der Wandspannung gilt [28; 29], ein inhibitorischer Einfluß von NO auf Vasomotion [33] und $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen [13] in diesen Präparaten beschrieben. Außerdem wurde berichtet, daß L-NAME die Vasomotion hemmt [28]. In den hier durchgeführten Experimenten wurden die $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen durch diese Substanz verstärkt. Der Grund für diese gegensätzlichen Beobachtungen bleibt unklar. Sicher spielen unterschiedliche experimentelle Bedingungen (Temperatur, pO_2 , Wandspannung) eine Rolle.

4.4. Gap-junctions sind an der Synchronisation der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale glatter Gefäß-muskelzellen beteiligt

Viele Studien haben gezeigt, daß die Kopplung der glatten Muskelzellen durch gap-junctions an der Ausbildung von synchronen Kontraktionen und $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen beteiligt ist [21]. Vor diesem Hintergrund ist die desynchronisierende Wirkung von gap-junction-Entkopplern ein häufig beobachtetes Phänomen [3; 6]. Entsprechend konnte in den gezeigten Versuchen ein desynchronisierender Effekt auf die Kopplung der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale der glatten Muskelzellen, ähnlich dem von ACh und SNP, auch durch Heptanol, einen bekannten Entkoppler der gap-junction-Kanäle [34], hervorgerufen werden. Weiterhin vermindert NA den Eingangswiderstand der untersuchten glatten Gefäßmuskelzellen, wohingegen die nachfolgende Gabe von ACh diesen reduziert [35]. Dies deutet auf einen möglichen stimulierenden Effekt von NA und eine hemmende Wirkung von ACh auf die Öffnung der gap-junctions hin. Andererseits können durch NA und ACh hervorgerufene anderweitige Veränderungen von Trägern der Membranleitfähigkeit, wie z.B. der Cl^- -Kanälen, nicht ausgeschlossen werden.

Gap-junctions in der Media von Arterien bestehen hauptsächlich aus Connexin (Cx) 43, zu einem geringeren Anteil auch aus Cx 40 und Cx 37 [36–38]. Eine mögliche Signalkaskade, welche den Verschluß von gap-junction-Kanälen bewirkt, könnte von im Endothel gebildetem NO ausgehen, das in den glatten Gefäßmuskelzellen die cGMP-Bildung fördert. Es ist bekannt, daß aus Cx 43 aufgebaute gap-junctions sich bei Stimulation durch Proteinkinase G verschließen [39; 40]. Die Signalkette, welche zu einer Verstärkung der zellulären Kopplung durch NA führt, könnte die über α_1 -adrenerge Rezeptoren erfolgte Aktivierung von Phospholipase C und Proteinkinase C (PKC) beinhalten. Es ist bekannt, daß PKC die interzelluläre Kopplung Cx 43-gekoppelter Herzzellen verstärkt [41]. Dies geschieht möglicherweise durch eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit der Cx 43 gap-junctions in einem Zustand geringer Leitfähigkeit [39]. Andererseits kann die Verstärkung der Kopplung glatter Gefäßmuskelzellen durch NA auch über β -adrenerge Rezeptoren vermittelt werden. Substanzen, die den zellulären cAMP-Spiegel erhöhen, steigern im allgemeinen die Leitfähigkeit der gap-junctions durch eine erhöhte Expression oder Proteinkinase A-vermittelte Phosphorylierung von Cx 43 [42]. Weiterhin wurde gefunden, daß 8-Br-cAMP die allgemeine gap-junction-vermittelte Leitfähigkeit von Cx 40 exprimierenden humanen Hepatomzellen erhöht [43]. Andererseits wurde bei glatten Muskelzellen der

Rattenaorta in Zellkultur eine geringe Verminderung der Leitfähigkeit durch 8-Br-cAMP beobachtet [44].

Es ist prinzipiell möglich, daß sich die $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten erst ab einer bestimmten $[Ca^{2+}]_i$ -Schwelle als Wellen ausbreiten. Wenn diese Wellen für die Kopplung der glatten Gefäßmuskelzellen verantwortlich sind, würde das Ausmaß der Synchronisation in erster Linie durch die Größe der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege und nicht durch die Öffnungswahrscheinlichkeit der gap-junctions kontrolliert werden. Man könnte deshalb schlußfolgern, daß der desynchronisierende Effekt von ACh, SNP und Heptanol auf die $[Ca^{2+}]_i$ -Signale nur durch eine Verminderung der Amplitude der $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten erreicht wird und nicht durch einen Verschluß von gap-junctions. Die deutliche Abnahme der Amplituden der Fluo-3-Oszillationen nach Applikation dieser Substanzen könnte diese Annahme unterstützen. Eine Verminderung der Amplituden der $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten durch Reduktion der $[Ca^{2+}]_e$ ergab jedoch keine signifikante Änderung der Kopplung der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale (Abb. 15). Weiterhin trat während des Auswaschens von ACh (Abb. 8), Heptanol (Abb. 9) und SNP (nicht gezeigt) eine erneute Synchronisation auf, obwohl die Amplituden der Fluoreszenzoszillationen viel geringer als zuvor und kaum größer als während der Applikation der desynchronisierenden Wirkstoffe waren. Dies spricht gegen eine führende Rolle der Stärke der $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten für die Synchronisation der glatten Gefäßmuskelzellen.

4.5. Die Kopplung der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale entsteht nicht durch eine interzelluläre Ausbreitung von $[Ca^{2+}]_i$ -Wellen

Eine Beteiligung der gap junctions an der Kopplung der glatten Gefäßmuskelzellen kann prinzipiell über zwei verschiedene Wege erfolgen. Erstens können die gap-junctions die Übertragung eines oszillierenden intrazellulären Mediators ermöglichen. Da allgemein angenommen wird, daß die Konzentration von IP_3 während periodischer Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ nicht oszilliert [6; 11], kommt als möglicher Mediator vor allem $[Ca^{2+}]_i$ in Frage. Für eine effektive Synchronisation müssen sich die Ca^{2+} -Ionen schnell zwischen den Zellen bewegen. Bei einer Konzentration von 1 μM NA wurde in den durchgeführten Experimenten eine Ausbreitungsgeschwindigkeit der $[Ca^{2+}]_i$ -Wellen von 25 $\mu m/s$ ermittelt. Dies entspricht der Größenordnung von anderen Messungen an glatten Muskelzellen [13; 45; 46]. Aber selbst wenn mögliche Verzögerungen der Übertragung der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale an den Zellgrenzen nicht berücksichtigt werden, ist diese Ausbreitungsgeschwindigkeit zu gering, um die beobachtete enge zeitliche Kopplung der glatten Gefäßmuskelzellen zu ermöglichen. Wie Abb. 13 zeigt, müßte die Weiterleitung des synchronisierenden Signals um mindestens eine Zehnerpotenz schneller erfolgen als die gemessene Ausbreitungsgeschwindigkeit des $[Ca^{2+}]_i$ -Signals in den glatten Gefäßmuskelzellen. Dies kann wahrscheinlich nur durch eine Änderung des Plasmamembranpotentials erreicht werden, den zweiten möglichen gap-junction-vermittelten Mechanismus. Es ist bekannt, daß sich Aktionspotentiale entlang gekoppelter glatter Gefäßmuskelzellen mit einer Geschwindigkeit von ungefähr 1 cm/s ausbreiten können [3]. In Mesenterialarterien der Ratte wird die Vasomotion von rhythmischen Änderungen des Membranpotentials begleitet [28]. Daraus kann geschlossen werden, daß die hier beobachteten $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen von der Ausbreitung solcher Membranpotentialoszillationen abhängen. Da die Mechanismen der Erzeugung der $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen in dieser Arbeit nicht detailliert untersucht wurden, kann nur vermutet werden, daß mögliche membranpotentialabhängige transmembranale K^+ - und/oder Ca^{2+} -Ströme an der Erzeugung, Erhaltung und Synchronisation der rhythmischen $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen beteiligt sind, wie dies von anderen bereits demonstriert wurde [3].

In einer kürzlich erschienenen Arbeit von Peng et al. [47] wurde eine Hypothese für die Entstehung der Vasomotion vorgestellt. Bei diesem Modell wird durch die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum ein starker depolarisierender Strom

erzeugt, welcher von einer ausreichend hohen Konzentration an intrazellulärem cGMP abhängig ist. Die Depolarisation führt zu einer Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle, wodurch über eine positive Rückkopplung weitere Ca^{2+} -Ionen aus dem SR freigesetzt werden. Dies soll die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen der einzelnen glatten Gefäßmuskelzellen synchronisieren. Eine Änderung der Leitfähigkeit der gap-junctions wurde nicht berücksichtigt, aber diese müßte ausreichend groß sein, um eine elektrische Kopplung der glatten Gefäßmuskelzellen durch einen depolarisierenden Strom zu ermöglichen. Im Gegensatz dazu ergaben andere Experimente einen hohen Eingangswiderstand der glatten Gefäßmuskelzellen bei einer niedrigen NA-Konzentration (0 [35] bzw. 1 μM [14]) und bestätigten mit anderen Messungen, daß die glatten Gefäßmuskelzellen in der hier verwendeten Präparation unter diesen Umständen nicht elektrisch gekoppelt sind [14]. Weiterhin breiteten sich die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten in den hier untersuchten Präparaten bei einer niedrigen Konzentration von 1 μM NA nicht auf benachbarte Zellen aus. Die Spannungsozillationen, die in der Arbeit von Peng et al. [47] demonstriert wurden, unterscheiden sich in mehreren Aspekten von den hier gemessenen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen. Die synchrone Vasomotion trat bereits bei einer NA-Konzentration von 0,2 μM auf, war abhängig von intrazellulärem cGMP und hatte eine Frequenz von 8 bis 16 min^{-1} . Im Gegensatz dazu treten die hier gemessenen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen erst bei einer Konzentration von ungefähr 3 μM NA auf, werden durch ACh oder SNP, welche die cGMP-Konzentration in glatten Gefäßmuskelzellen erhöhen, desynchronisiert und haben eine mittlere Frequenz um 4 min^{-1} . Wahrscheinlich wurden verschiedene Arten von Oszillationen mit verschiedenen zugrunde liegenden zellulären Mechanismen gemessen.

5. Zusammenfassung

Rhythmische Änderungen des Durchmessers wurden an Arteriolen und kleinen Arterien in verschiedenen Präparaten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet. Das Phänomen wird als Vasomotion bezeichnet und dient der Kontrolle der Blutverteilung im Gewebe. Verschiedene Faktoren (nervale und hormonelle Signale) beeinflussen das Auftreten und Ausmaß der Vasomotion in unterschiedlicher Weise. Dabei zeigen sich bei verschiedenen Arten und in verschiedenen Stromgebieten derselben Art z.T. gegensätzliche Wirkungen einzelner Faktoren.

Die Vasomotion entsteht durch die koordinierte Kontraktion der glatten Muskelzellen in der Gefäßwand. Die Voraussetzung für eine Kontraktion ist die Erhöhung der Kalziumionenkonzentration im kontraktile Kompartiment der glatten Muskelzellen. Die Ca^{2+} -Ionen werden aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt bzw. gelangen durch transplasmalemmalen Einstrom in die Zelle. Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, unter welchen Bedingungen synchrone Oszillationen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ entstehen und wodurch die Kopplung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale einzelner Muskelzellen ermöglicht wird. Glatte Muskelzellen in intakten Mesenterialarterien der Ratte wurden mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 beladen. Mit Hilfe eines konfokalen LASER-Scanning-Mikroskops wurden die zeitlichen Verläufe der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale der einzelnen glatten Muskelzellen gemessen und anschließend deren Synchronizität berechnet.

Noradrenalin (1 μM) erzeugt transitorische desynchrone Anstiege der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ einzelner Muskelzellen. Bei höheren NA-Konzentrationen (3 und 10 μM) tritt eine Synchronisation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale der Muskelzellen auf. Dabei hat die Amplitude der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten keinen Einfluß auf die Korrelation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale der einzelnen Muskelzellen. Ein erhöhter Sympathikotonus führt folglich, möglicherweise über eine Synchronisation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen, zum Auftreten einer Vasomotion. Bei dem hier verwendeten Präparat hat das Endothel einen hemmenden Einfluß auf die Synchronisation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale. Nach Zugabe von ACh bei vorheriger Stimulation mit NA trat eine Entkopplung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale auf. Der gleiche Effekt ließ sich an Gefäßen mit geschädigtem Endothel durch die Gabe von SNP, einen NO-Donor, erreichen. Im Gegensatz dazu verstärkte L-NAME, ein Inhibitor der NO-Synthese, die Kopplung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale in Präparationen mit intaktem Endothel. Diese Befunde

sprechen dafür, daß die relaxierende und vasomotionshemmende Wirkung des Endothels über die Synthese von NO erfolgt und daß bei intakter Funktion des Endothels eine kontinuierliche basale NO-Synthese besteht.

Durch Heptanol, einen Entkoppler der gap-junctions, wird die Synchronizität der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale einzelner Muskelzellen reversibel aufgehoben. Dies spricht für eine Beteiligung der gap-junctions an der Ausbreitung des synchronisierenden Signales zwischen den Muskelzellen. Als möglicher Mediator der Synchronisation käme eine interzelluläre Ausbreitung der $[Ca^{2+}]_i$ -Wellen in Betracht. Die in den Experimenten bestimmte Ausbreitungsgeschwindigkeit der $[Ca^{2+}]_i$ -Wellen ist jedoch zu niedrig, um als Signal für die Synchronisation zu dienen. Experimente anderer Autoren zeigen, daß fortgeleitete Änderungen des Membranpotentials ein möglicher Mechanismus der Synchronisierung sind.

Zusammenfassend kann man schlußfolgern, daß die Kopplung der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale in glatten Gefäßmuskelzellen durch NA gefördert und durch aus dem Endothel stammendes NO gehemmt wird. Zusätzlich deuten einige Ergebnisse darauf hin, daß die gap-junctions an dieser Regulation beteiligt sind. Die genauen Mechanismen der Entstehung synchroner $[Ca^{2+}]_i$ -Signale sind noch nicht vollständig bekannt. Weitere Experimente sind erforderlich, um die den $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen zugrunde liegenden Signalketten zu verstehen.

6. Literaturverzeichnis

1. Kaley G, Altura BM (Eds): Microcirculation. University Park Press, Baltimore, 1978
2. Intaglietta M: Arteriolar vasomotion: implications for tissue ischemia. *Blood Vessels* 28 (1991) 11-17
3. Shimamura K, Sekiguchi F, Sunano S: Tension oscillation in arteries and its abnormality in hypertensive animals. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26 (1999) 275-284
4. de Mey JGR, Boonen HCM, Struyker-Boudier HAJ: Rhythmic contractile activity in resistance-sized arteries of spontaneously hypertensive rats. In: Halpern W (Ed): Resistance arteries. Perinatology Press, S. 336-341
5. Gustafsson H: Vasomotion and underlying mechanisms in small arteries. An *in vitro* study of rat blood vessels. *Acta Physiol Scand* 149 (1993) 6141-6144
6. Røttingen J, Iversen JG: Ruled by waves? Intracellular and intercellular calcium signalling. *Acta Physiol Scand* 169 (2000) 203-219
7. Parthimos D, Edwards DH, Griffith TM: Comparison of chaotic and sinusoidal vasomotion in the regulation of microvascular flow. *Cardiovasc Res* 31 (1996) 388-399
8. Secomb TW, Intaglietta M, Gross JF: Effects of vasomotion on microcirculatory mass transport. *Prog Appl Microcirc* 15 (1989) 49-61
9. Griffith TM: Temporal chaos in the microcirculation. *Cardiovasc Res* 31 (1996) 342-358

10. Bartlett IS, Crane GJ, Neild TO, Segal SS: Electrophysiological basis of arteriolar vasomotion in vivo. *J Vasc Res* 31 (2000) 568-575
11. Savineau JP, Marthan R: Cytosolic calcium oscillations in smooth muscle cells. *News Physiol Sci* 15 (2000) 50-55.
12. Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, Miyamoto S, Nakazawa H, Won K, Sato K: Calcium movements, distribution and function in smooth muscle. *Pharmacol Rev* 49 (1997) 157-230
13. Mauban JR, Lamont C, Balke CW, Wier WG: Adrenergic stimulation of rat resistance arteries affects Ca^{2+} sparks, Ca^{2+} waves, and Ca^{2+} oscillations. *Am J Physiol* 280 (2001) H2399-H2405.
14. Weidelt T, Boldt W, Markwardt F: Acetylcholine-induced K^{+} currents in smooth muscle cells of intact rat small arteries. *J Physiol (Lond)* 500 (1997) 617-630
15. Brakenhoff GJ, Visscher K: Confocal imaging with bilateral scanning and array detectors. *J Microsc* 165 (1992) 139-146
16. Kao JPY: Practical aspects of measuring $[\text{Ca}^{2+}]$ with fluorescent indicators. In: *Methods in cell Biology* 40 (1994), S. 155-180
17. Wussling M, Salz H: Nonlinear propagation of spherical calcium waves in rat cardiac myocytes. *Biophys J* 70 (1996) 1144-1153
18. Xia J, Little TL, Duling BR: Cellular pathway of the conducted electrical response in arterioles of hamster cheek pouch in vitro. *Am J Physiol* 269 (1995) H2031-H2038
19. Lipp P, Niggli E: Ratiometric confocal Ca^{2+} -measurements with visible wavelength indicators in isolated cardiac myocytes. *Cell Calcium* 14 (1993) 359-372

20. Rees DD, Palmer RMJ, Schulz R, Hodson HF, Moncada S: Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 101 (1990) 746-752
21. Christ GJ: Modulation of α_1 -adrenergic contractility in isolated vascular tissues by heptanol: A functional demonstration of the potential importance of intercellular communication to vascular response generation. *Life Sciences* Vol. 56 No. 10 (1995) 709-721
22. Schuster A, Oishi H, Beny JL, Stergiopoulos N, Meister JJ: Simultaneous arterial calcium dynamics and diameter measurements: application to myoendothelial communication. *Am J Physiol* 280 (2001) H1088-H1096
23. Miller BG, Evan AP, Bohlen HG: Exposure of vascular smooth muscle cells for analysis with the scanning electron microscope. *Scanning Microscopy* Vol. 1 No. 3 (1987) 1295-1313
24. Miriel VA, Mauban JRH, Blaustein MP, Wier WG: Local and cellular Ca^{2+} transients in smooth muscle of pressurized rat resistance arteries during myogenic and agonist stimulation. *J Physiol (Lond)* 518 (1999) 815-824
25. Iino M, Kasai H, Yamazawa T: Visualization of neural control of intracellular Ca^{2+} concentration in single vascular smooth muscle cells in situ. *EMBO J* 13 (1994) 5026-5031
26. Kasai Y, Yamazawa T, Sakurai T, Taketani Y, Iino M: Endothelium-dependent frequency modulation of Ca^{2+} signalling in individual vascular smooth muscle cells of the rat. *J Physiol (Lond)* 504 (1997) 349-357
27. Yip KP, Marsh DJ: $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in rat afferent arteriole during constriction measured with confocal fluorescence microscopy. *Am J Physiol* 40 (1996) F1004-F1011

28. Gustafsson H, Mulvany MJ, Nilsson H: Rhythmic contractions of isolated small arteries from rat: influence of the endothelium. *Acta Physiol Scand* 148 (1993) 153-163
29. Gustafsson H, Bülow A, Nilsson H: Rhythmic contractions of isolated, pressurized small arteries from rat. *Acta Physiol Scand* 152 (1994) 145-152
30. Gustafsson H, Nilsson H: Rhythmic contractions in isolated small arteries of rat: role of K^+ channels and the Na^+/K^+ -pump. *Acta Physiol Scand* 150 (1994) 161-170
31. Watts SW, Tsai ML, Loch-Caruso R, Webb RC: Gap junctional communication and vascular smooth muscle reactivity : Use of tetraethylammonium chloride. *J Vasc Res* 31 (1994) 307-313
32. Tsai ML, Watts SW, Loch-Caruso R, Webb RC: The role of gap junctional communication in contractile oscillations in arteries from normotensive and hypertensive rats. *J Hypertens* 13 (1995) 1123-1133
33. Huang Y, Cheung KK: Endothelium-dependent rhythmic contractions induced by cyclopiazonic acid in rat mesenteric artery. *Eur J Pharmacol* 332 (1997) 167-172
34. Kimura H, Oyamada Y, Ohshika H, Mori M, Oyamada M: Reversible inhibition of gap junctional intercellular communication, synchronous contraction, and synchronism of intracellular Ca^{2+} fluctuation in cultured neonatal rat cardiac myocytes by heptanol. *Exp Cell Res* 220 (1995) 348-356
35. Sell M, Boldt W, Markwardt F: Desynchronising effect of the endothelium on intracellular Ca^{2+} concentration dynamics in vascular smooth muscle cells of rat mesenteric arteries. *Cell Calcium* 32 (2002) 105-120

36. van Kempen MJA, Jongsma HJ: Distribution of connexin37, connexin40 and connexin43 in the aorta and coronary artery of several mammals. *Histochem Cell Biol* 112 (1999) 479-486
37. Dhein S: Gap junction channels in the cardiovascular system : pharmacological and physiological modulation. *Trends Pharmacol Sci* 19 (1998) 229-241
38. Christ GJ, Spray DC, Elsabban M, Moore LK, Brink PR: Gap junctions in vascular tissues. Evaluating the role of intercellular communication in the modulation of vasomotor tone. *Circ Res* 79 (1996) 631-646
39. Kwak BR, Hermans MM, de Jonge B, Lohmann SM, Jongsma HJ, Chanson M: Differential regulation of distinct types of gap junction channels by similar phosphorylating conditions. *Mol Biol Cell* 6 (1995) 1707-1719
40. Kwak BR, Saez JC, Wilders R et al: Effects of cGMP-dependent phosphorylation on rat and human connexin43 gap junction channels. *Pflügers Arch* 430 (1995) 770-778
41. Kwak BR, Jongsma HJ: Regulation of cardiac gap junction channel permeability and conductance by several phosphorylating conditions. *Mol Cell Biochem* 157 (1996) 93-99
42. Lampe PD, Lau AF: Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys* 384 (2000) 205-215
43. van Rijen HVM, van Veen TAB, Hermans MMP, Jongsma HJ: Human connexin40 gap junction channels are modulated by cAMP. *Cardiovasc Res* 45 (2000) 941-951
44. Moore LK, Beyer EC, Burt JM: Characterization of gap junction channels in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 260 (1991) C975-C981

45. Maruya J, Norota I, Takemura S, Kayama T, Sato M, Endoh M: Differential regulation of intracellular Ca^{2+} signalling induced by high K^{+} and endothelin-1 in single smooth muscle cells of intact canine basilar artery : detection by means of confocal laser microscopy. *Life Sci* 64 (1999) 995-1004
46. Blatter LA, Wier WG: Agonist-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ waves and Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in mammalian vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 263 (1992) H576-H586
47. Peng H, Matchkov V, Ivarsen A, Aalkjaer C, Nilsson H: Hypothesis for the initiation of vasomotion. *Circ Res* 88 (2001) 810-815

7. Thesen

1. Die als Vasomotion bezeichnete Oszillation des Gefäßdurchmessers ist eine Eigenschaft der kleinen Arterien und der Arteriolen. Sie dient der Verteilung des Blutflusses im Gefäßsystem.
2. Oszillationen des Gefäßdurchmessers entstehen durch die rhythmische Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in den glatten Gefäßmuskelzellen. Für die Vasomotion ist eine Koordination der $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten mehrerer Gefäßmuskelzellen erforderlich.
3. Durch Beladung weitgehend intakter kleiner Rattenmesenterialarterien mit den Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen Fluo-3 und Fura-Red und unter Verwendung eines LASER-Scanning-Mikroskops lassen sich $[Ca^{2+}]_i$ -Veränderungen einzelner glatter Gefäßmuskelzellen *in situ* untersuchen.
4. NA (1 μ M) führt, vermutlich über eine Aktivierung der Phospholipase-C-Signalkette, zum Auftreten desynchroner transienter Erhöhungen der $[Ca^{2+}]_i$ in glatten Muskelzellen von Mesenterialarterien der Ratte. Ab einer Konzentration von 3 μ M NA treten synchrone $[Ca^{2+}]_i$ -Signale auf.
5. Das Endothel besitzt in den untersuchten Präparaten einen hemmenden Einfluß auf die Ausbildung synchroner $[Ca^{2+}]_i$ -Signale. Der Einfluß des Endothels erfolgt über eine NO-vermittelte Desynchronisation der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale der Muskelzellen.
6. Gap-junctions spielen eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der synchronisierenden Signale zwischen den Muskelzellen. Durch Blockade der gap-junctions mittels Heptanol lassen sich die durch NA ausgelösten synchronen $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten reversibel unterdrücken.
7. Die Amplitude der $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten hat keinen Einfluß auf das Ausmaß ihrer Korrelation.

8. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Wellen sind in ihrer Ausbreitungsgeschwindigkeit zu langsam, um als Mediator der Synchronisation zu dienen. Plasmamembranpotentialoszillationen könnten statt dessen hier diese Funktion wahrnehmen.

Lebenslauf

Name	Sell
Vorname	Michael
Geburtsdatum	20.04.1971
Geburtsort	Querfurt
Familienstand	ledig

Schulbildung

1977 bis 1987	Polytechnische Oberschule in Roßleben
1987 bis 1989	Erweiterte Oberschule in Roßleben

Wehrdienst

09/1989 bis 03/1990

Studium

09/1990 bis 09/1996	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/1996 bis 10/1997	Promotionsstudium am Institut für Physiologie der Martin- Luther-Universität Halle-Wittenberg

Berufliche Tätigkeit

11/1997 bis 04/1999	Arzt im Praktikum in der Abteilung für HNO-Heilkunde des KKH Buchholz/Nordheide
seit 07/1999	Assistenzarzt in der HNO-Klinik des Klinikums Neubrandenburg

Neubrandenburg, im April 2003

Michael Sell

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation

Der desynchronisierende Effekt des Endothels auf die Kinetik der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration glatter Gefäßmuskelzellen in Mesenterialarterien der Ratte.

selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Neubrandenburg, im April 2003

Michael Sell

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation

**Der desynchronisierende Effekt des Endothels auf die Kinetik der intrazellulären
Ca²⁺-Konzentration glatter Gefäßmuskelzellen in Mesenterialarterien der Ratte.**

zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin (Dr. med.) erstmalig einreiche.

Es liegt nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens vor.

Neubrandenburg, im April 2003

Michael Sell

Ergebnisse der Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

1. Sell M, Boldt W, Markwardt F: Distribution of intracellular Ca^{2+} concentration in norepinephrine and acetylcholine stimulated intact small arteries from rat mesentery. Pflügers Arch 433 (S6) (1997) R83 (A)
2. Sell M, Boldt W, Markwardt F: Influence of the endothelium on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -oscillations in vascular smooth muscle cells of small arteries. Pflügers Arch 437 (S5) (1999) R169 (A)
3. Sell M, Boldt W, Markwardt F: Desynchronizing effect of the endothelium on Ca^{2+} concentration dynamics in vascular smooth muscle cells. Biophys J 82 (2002) 651a (A)
4. Sell M, Boldt W, Markwardt F: Desynchronizing effect of the endothelium on intracellular Ca^{2+} concentration dynamics in vascular smooth muscle cells of rat mesenteric arteries. Pflügers Arch 443 (S1) (2002) S202 (A)
5. Sell M, Boldt W, Markwardt F: Desynchronizing effect of the endothelium on intracellular Ca^{2+} concentration dynamics in vascular smooth muscle cells of rat mesenteric arteries. Cell Calcium 32 (2002) 105-120

(A) Abstract

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. habil. G. Isenberg danke ich für die Ermöglichung dieser Dissertation am Julius-Bernstein-Institut für Physiologie.

Mein Dank gilt in besonderem Maße Herrn Prof. Dr. med. habil. F. Markwardt und Herrn Dr. rer. nat. W. Boldt für die Einführung in die Thematik und die Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit.

Weiterhin danke ich Frau Christa Girke und Frau Monika Schmidt für ihre freundliche Hilfe. Sie haben mit ihrem Einsatz entscheidend zum Gelingen der Experimente beigetragen.