

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die koronare Blutflussregulation und somit die Sauerstoffbereitstellung an das Myokard wird durch interagierende Mechanismen (metabolische, myogene, endotheliale, neurogene Kontrolle), die die Widerstände der Gefäßsegmente regulieren, optimiert. Humanmedizinisch-klinische und physiologische Untersuchungsergebnisse weisen eindeutig auf die Relevanz der koronaren Arteriolen mit Durchmessern kleiner 20  $\mu\text{m}$  bezüglich der physiologischen und pathophysiologischen Durchblutungsregulation des Herzens hin. Das erste Ziel bestand in der Etablierung eines neuartigen Modells, um erstmalig Durchmesseränderungen koronarer, terminaler Arteriolen zu untersuchen. Das zweite Ziel war die Beurteilung druckvermittelter (myogener) Regulationsmechanismen des Blutflusses in diesem Gebiet. Bei Nichtauffinden eines geeigneten arteriolären Gefäßabschnittes fanden alternative Untersuchungen zu postkapillären Venolen statt. *Isolierte Rattenherzen wurden in ein modifiziertes, miniaturisiertes Langendorff-Modell integriert und mit einer 37 °C warmen, oxygenierten ( $\text{O}_2\text{:CO}_2$ , 97:3% vol:vol) Krebs-Henseleit-Lösung (KHL) perfundiert ( $\text{CaCl}_2$  1,25 mmol/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2 mol/l, Pyruvat 2 mol/l, KCl 3,8 mol/l,  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  1,2 mol/l,  $\text{NaHCO}_3$  15,5 mol/l, Glukose 11,5 mol/l, Mannitol 16 mol/l, NaCl 123,4 mol/l, EDTA 0,05 mol/l, Insulin 5 IE). Der pH-Wert, der  $\text{O}_2$ - und  $\text{CO}_2$ -Partialdruck wurden während der Untersuchungen regelmäßig kontrolliert. Nach einer Stabilisierungsphase (30min) schloss sich die Rezirkulation (Volumen 20 ml) und die selektive Arretierung der Herzmuskelzellen durch Tetrodotoxin (50  $\mu\text{mol/l}$ ) an. Vorversuche ergaben einen Untersuchungszeitraum von 120min mit stabilen Funktionswerten. Das Perfusionssystem wurde auf einen Mikroskopisch platziert und das Mikroskop zur Visualisierung der koronaren Gefäße um 90° gekippt. Fluoresceinisothiozyanat-Dextran im Perfusat verstärkte den Kontrast. Die Differenzierung zwischen Arteriolen und Venolen erfolgte durch die Beurteilung der Flussrichtung fluoreszierender Mikrobeads. Ein computer-kontrollierter Perfusionsdruck (PP) von 80 mmHg galt als Kontrolldruck ( $\text{mmHg} \times 0,133 = \text{kPa}$ ). Der PP wurde in der Hauptgruppe in 20 mmHg Schritten stufenweise auf Werte zwischen 40 mmHg und 140 mmHg eingestellt (**PPArt**,  $n = 6$ ). Die Ermittlung des maximalen Regulationsspektrums (40 bis 140 mmHg) erfolgte in Vorversuchen (VV) an isolierten, schlagenden Herzen. In allen Versuchen fand nach einer jeweils 10-minütigen Stabilisierungsphase pro Druckstufe die Videoaufzeichnung der Gefäße statt. Die Durchmesser zu den einzelnen Druckstufen wurden offline ermittelt. Es wurden bis zu 19 Arteriolen pro Herz und Druckstufe untersucht. Um passive Antworten koronarer Arteriolen zu bestimmen, wurden die Gefäße in einer zweiten Gruppe (**PAP+SNP**,  $n = 6$ ) vor den Druckänderungen bei sonst identischem Untersuchungsverlauf maximal dilatiert. In einer dritten Gruppe (**PPArtKontrolle**,  $n = 3$ ) blieb der PP konstant 80 mmHg für 120min. Postkapilläre Venolen wurden bei konstantem koronarem Fluss in folgenden Gruppen untersucht: In der vierten Gruppe (**Venolen**,  $n = 5$ ) wurde der Druck im rechten Vorhof in 5 cm-Schritten (0  $\text{cmH}_2\text{O}$  bis 30  $\text{cmH}_2\text{O}$ ) geändert, ( $\text{cmH}_2\text{O} \times 0,098 = \text{kPa}$ ). Die fünfte Gruppe (**KontrolleVenolen**,  $n = 4$ ) diente Untersuchungen, während derer der Druck im rechten Vorhof konstant 0  $\text{cmH}_2\text{O}$  für 120min blieb. Es wurden bis zu 16 Venolen pro Herz und Druckstufe untersucht. Darüber hinaus sollen die Ergebnisse zusätzlicher VV als Grundlage für weitere Projekte dienen (Dosis-Wirkungsbeziehungen: Adenosin-Konzentrationen in der KHL von  $10^{-7}$  mol/l bis  $10^{-4}$  mol/l, Nitroprussid-Natrium-Konzentrationen in der KHL von  $10^{-8}$  mol/l bis  $10^{-6}$  mol/l, Maximaldilatation der Gefäßmuskulatur durch Dipyridamol in der KHL von  $1,25 \times 10^{-4}$  mol/l). Der Steigungskoeffizient ( $b_1$ ) der Druck-Flussbeziehungen betrug in der Gruppe **PPArt**  $0,05 \pm 0,008$  ml/min/mmHg, in der Gruppe **PAP+SNP**  $0,13 \pm 0,011$  ml/min/mmHg und in der Gruppe **PPArtKontrolle**  $-0,02 \pm 0,003$  ml/min/min (arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}$ )  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes).*

Die Arteriolen wurden in zwei Gruppen (Ausgangsdurchmesser  $< 10 \mu\text{m}$  und  $\geq 10 \mu\text{m}$ ) eingeteilt. PP-Senkungen führten in der Gruppe **PPArt** zur Gefäßdilataion: 40 mmHg: 20,9/ 14,0; 60 mmHg: 11,0/ 10,6 (Mediane der prozentualen Durchmesseränderungen; Gefäße  $< 10 \mu\text{m}$ /  $\geq 10 \mu\text{m}$ ). PP-Steigerungen riefen Gefäßkonstriktionen hervor: 100 mmHg: -7,3/ -9,2; 120 mmHg: -18,6/ -9,6; 140 mmHg: -5,1/ -10,6. Die Maximaldilataion der Gefäße vor den Druckänderungen in der Gruppe **PAP+SNP** führte zu passiven Durchmesseränderungen: PP 40 mmHg: -15,4; 60 mmHg: -8,2; 100 mmHg: 3,8; 120 mmHg: 8,2; 140 mmHg: 17,5 (Mediane der prozentualen Durchmesseränderungen). In der Gruppe **PPArtKontrolle** blieben die Durchmesser annähernd konstant: bis 60min 0,0, nach 80min 0,9, nach 100min -0,2, nach 120min 0,7. Die Streuung der Daten war im Gefäßsegment  $< 10 \mu\text{m}$  größer als bei Ausgangsdurchmessern  $\geq 10 \mu\text{m}$ . Ursächlich wird ein je nach topographischem Ursprung der untersuchten Arteriolen unterschiedlicher Basistonus diskutiert. Ursachen segmentaler Unterschiede werden im unterschiedlichen Aufbau der Gefäßwand und einer heterogenen Expressierung spannungsaktivierbarer Ionenkanäle, die die myogene Reaktion vermitteln, vermutet. Die Gesamtwiderstandsänderungen ( $R_{\text{Ges.}}$ ;  $\bar{x}$ ) einzelner Herzen (berechnet mittels Ohm-Gesetz) und die auf Grund von Durchmesserbestimmungen berechneten Widerstandsänderungen ( $R_{\text{Gef.}}$ ; Median) wurden verglichen. Das Ausmaß der prozentualen Widerstandsänderungen im präkapillären Gefäßsegment war während aller Druckstufen wesentlich größer als die Gesamtwiderstandsänderung: 40 mmHg: -40,1/ -15,5; 60 mmHg: -31,2/ -8,2; 100 mmHg: 49,5/ 6,0; 120 mmHg: 72,4/ 11,0; 140 mmHg: 90,7/ 13,9 (prozentuale Widerstandsänderungen;  $R_{\text{Gef.}}/ R_{\text{Ges.}}$ ). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass koronare Arteriolen mit Ausgangsdurchmessern  $< 30 \mu\text{m}$  entscheidend an der myogenen Regulation des Gesamtwiderstandes beteiligt sind. Druckzunahmen des rechten Vorhofs führten im wesentlichen zu Durchmesserzunahmen in der Gruppe **Venolen**, wobei bei Drücken von 5 cmH<sub>2</sub>O und 10 cmH<sub>2</sub>O einige Durchmesser vermindert waren. Gefäße mit Ausgangsdurchmessern  $< 15 \mu\text{m}$  zeigten stärkere Durchmesserzunahmen als Gefäße  $\geq 15 \mu\text{m}$ : 5 cmH<sub>2</sub>O: 3,3/ 0,7; 10 cmH<sub>2</sub>O: 6,1/ 3,2; 15 cmH<sub>2</sub>O: 8,3/ 5,6; 20 cmH<sub>2</sub>O: 12,9/ 6,6; 25 cmH<sub>2</sub>O: 14,0/ 9,1; 30cmH<sub>2</sub>O: 14,6/ 12,0 (Mediane der prozentualen Durchmesseränderungen; Gefäße  $< 15 \mu\text{m}$ /  $\geq 15 \mu\text{m}$ ). Die Ursache wird in einer größeren Compliance kleinerer Gefäße vermutet, da gefäßeigene Muskelzellen erst unter allmählicher Größenzunahme in die Gefäßwände eingelagert sind. Die Gruppe **KontrolleVenolen** zeigte zu allen Messzeitpunkten vergleichsweise geringe Durchmesseränderungen. Demzufolge scheint die Compliance eine wichtige Rolle bei der Widerstandsverteilung venolärer Gefäße zu spielen.

## 6 SUMMARY

### Establishment of a novel model of fluorescence video microscopy allowing for investigation of regulatory mechanisms of pre- and postcapillary coronary microvessels: Pressure induced reactions.

Coronary bloodflow regulation and therefore oxygen-distribution to the myocardium is optimized by a variety of interacting mechanisms (metabolic, myogenic, endothelial and neurogenic control) that control the resistance of vessel segments. Earlier medical and physiological investigations indicate an important role of coronary arterioles with diameters  $< 20 \mu\text{m}$  concerning physiological and pathophysiological blood flow regulation. The first aim of this study was to establish a novel experimental model which allows for the first time the observation of diameter changes of coronary terminal arterioles. The second aim was to investigate pressure-dependent (myogenic) control in these precapillary arterioles. Alternative studies of postcapillary venules were performed when suitable arterioles could not be visualized. *Isolated rat-hearts were integrated into a modified, miniaturized Langendorff-perfusion-circuit and perfused by a 37 °C-warm, oxygenated (O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>, 97:3% vol:vol) Krebs-Henseleit-solution (KHL: CaCl<sub>2</sub> 1,25 mmol/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mol/l, Pyruvat 2 mol/l, KCl 3,8 mol/l, MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 1,2 mol/l, NaHCO<sub>3</sub> 15,5 mol/l, Glukose 11,5 mol/l, Mannitol 16 mol/l, NaCl 123,4 mol/l, EDTA 0,05 mol/l, Insulin 5 IE). pH, O<sub>2</sub>- and CO<sub>2</sub>-tension were controlled throughout the experiment. After a stabilization period of 30min, recirculation started (priming volume 20 ml) and cardiac myocytes were selectively arrested by tetrodotoxin (50  $\mu\text{mol/l}$ ). Initial tests proved functional parameters to be stable for 120min. The perfusion system was placed on a microscope stage and the microscope was tilted by 90°. Fluoresceinisothiocyanate-dextran in the perfusate served for better contrast. Arterioles and venules were distinguished by the flow direction of fluorescent microbeads. Baseline computer-controlled perfusion-pressure (PP) was 80 mmHg (mmHg x 0,133 = kPa). PP was changed in 20 mmHg steps (ranging from 40 mmHg to 140 mmHg) in the main investigation-group (**PPArt**, n = 6). The maximal regulation range (40 mmHg to 140 mmHg) was determined in preliminary experiments with isolated, beating hearts. In all experiments video-recordings were obtained after 10min of stabilization at each pressure step. Diameters were measured offline. Up to 19 arterioles were examined per heart and pressure-step. In order to investigate passive diameter-changes of coronary arterioles, vessels were maximally dilated in a second group (**PAP+SNP**, n = 6) before changing the PP with an otherwise identical experimental procedure. In a third group (**PPArtKontrolle**, n = 3) PP was held constant at 80 mmHg for 120min. Postcapillary venules were investigated at constant coronary flow in the following groups: In the fourth group pressure-changes of the right atrium were performed in 5 cm steps (0 cmH<sub>2</sub>O to 30 cmH<sub>2</sub>O), (**Venolen**, n = 5), (cmH<sub>2</sub>O x 0,098 = kPa). In the fifth group, venular control-group (**KontrolleVenolen**, n = 4) right atrial pressure was held constant at 0 cmH<sub>2</sub>O for 120min. Up to 16 venules per heart and pressure-step were investigated. Furthermore, results of additional preliminary experiments will serve to design further projects (dose-effect-relationships: Adenosine-concentrations in the KHL of 10<sup>-7</sup> mol/l to 10<sup>-4</sup> mol/l, Nitroprussid-Natrium-concentrations in the KHL of 10<sup>-8</sup> mol/l to 10<sup>-6</sup> mol/l, maximal dilatation of vascular smooth muscle cells at a Dipyridamole-concentration of 1,25 x 10<sup>-4</sup> mol/l in the KHL). The slope (b<sub>1</sub>) of the pressure-flow-relationship was 0,05 ± 0,008 ml/min/mmHg in **PPArt**, 1,13 ± 0,011 ml/min/mmHg in **PAP+SNP** and -0,02 ± 0,003 ml/min/min in **PPArtKontrolle** (mean ± standard error of the mean). Arterioles were divided into two groups (baseline diameter  $< 10 \mu\text{m}$  and  $\geq 10 \mu\text{m}$ ). Decreases in PP caused dilation of arterioles in **PPArt**: 40 mmHg: 20,9/ 14,0; 60 mmHg: 11,0/ 10,6 (median of percent diameter changes; vessels  $< 10 \mu\text{m}$ /  $\geq 10 \mu\text{m}$ ). Increases in PP resulted in constriction of arterioles: 100 mmHg: -7,3/ -9,2;*

120 mmHg: -18,6/ -9,6; 140 mmHg: -5,1/ -10,6. Maximal dilatation of vessels preceding changes in PP led to passive diameter changes in **PAP+SNP**: PP 40 mmHg: -15,4, 60 mmHg: -8,2, 100 mmHg: 3,8, 120 mmHg: 8,2, 140 mmHg: 17,5 (median of percent diameter changes). In **PPArtKontrolle** diameters remained approximately constant: until 60min: 0,0, after 80min 0,9, after 100min -0,2, after 120min 0,7. The mean variation of data was higher in vessels with baseline diameters  $< 10 \mu\text{m}$  than in those  $\geq 10 \mu\text{m}$ . Variable responses may be due to different basal vessel tone, which depends on the topographical origin of the vessel. Differences in vessel wall structure or heterogeneous distribution of stretch-sensitive ion-channels, which mediate the myogenic reaction, may account for segmental differences. Changes in total vascular resistance ( $R_{\text{total}}$ ; mean) of single hearts (calculated by the Ohm-law) were compared to changes in resistances based on diameter-dependent-calculations ( $R_{\text{vessel}}$ ; median). A larger degree of percent resistance-change was observed in the precapillary vessel segment during all PP-steps as compared to changes in total resistance: 40 mmHg: -40,1/ -15,5; 60 mmHg: -31,2/ -8,2; 100 mmHg: 49,5/ 6,0; 120 mmHg: 72,4/ 11,0; 140 mmHg: 90,7/ 13,9 (percent changes in resistance;  $R_{\text{vessel}}/ R_{\text{total}}$ ). The results indicate that arterioles with baseline diameters  $< 30 \mu\text{m}$  are substantially involved in myogenic regulation of total coronary resistance. Increases in pressure of the right atrium basically caused increases in diameters in the group **Venolen**. Only a few venular diameters were reduced at 5 cmH<sub>2</sub>O and 10 cmH<sub>2</sub>O. Vessels with baseline diameters  $< 15 \mu\text{m}$  showed more prominent diameter increases than vessels  $\geq 15 \mu\text{m}$ : 5 cmH<sub>2</sub>O: 3,3/ 0,7; 10 cmH<sub>2</sub>O: 6,1/ 3,2; 15 cmH<sub>2</sub>O: 8,3/ 5,6; 20 cmH<sub>2</sub>O: 12,9/ 6,6; 25 cmH<sub>2</sub>O: 14,0/ 9,1; 30 cmH<sub>2</sub>O: 14,6/ 12,0 (medians of the percent diameter-changes; vessels  $< 15 \mu\text{m}$ /  $\geq 15 \mu\text{m}$ ). A greater compliance of the smallest vessels may cause this difference. Smooth muscle cells are only sporadically present in the wall of smallest venules yet become more and more frequent with increasing vessel size. In comparison venules in the group **KontrolleVenolen** only showed little diameter changes. The compliance therefore seems to play an important role in the distribution of venular resistance.