

# 1 Einleitung

## 1.1 Hintergrund der Arbeit

Funktionsstörungen des vegetativen Nervensystems spielen im klinischen Alltag aufgrund ihres häufigen Vorkommens eine außerordentlich große Rolle. Die Bedeutung dieses wichtigen Regulationssystems unseres Körpers liegt vor allem darin begründet, dass es nahezu alle Organe innerviert und somit regulieren kann, um durch Anpassungsreaktionen eine Abstimmung zwischen den verschiedenen Funktionssystemen herzustellen. Somit ist es auch leicht zu verstehen, dass nahezu alle krankhaften Zustände mit vegetativen Regulations- oder Innervationsstörungen einhergehen. Das Spektrum reicht dabei von verhältnismäßig harmlosen Leiden, wie dem leichten Spannungskopfschmerz oder gastrointestinalen Verstimmungszuständen bis hin zum Zusammenbruch lebensnotwendiger Organfunktionen, wie denen des Herz-Kreislauf-Systems oder der Nieren.

In den letzten 20 Jahren hat die Forschung auf dem Gebiet der vegetativen Funktionsdiagnostik des Herz-Kreislauf-Systems einen starken Zuwachs erfahren. Die Entwicklung von nichtinvasiven Blutdruckmessverfahren<sup>1</sup> und von Methoden der quantitativen Signalanalyse<sup>2;3</sup> ermöglicht eine Diagnostik vegetativer Funktionsstörungen bereits im Frühstadium. Daher finden diese Analyseverfahren zunehmend häufiger klinischen Einsatz. So zum Beispiel bei der Diabetes-Diagnostik zur Erfassung autonomer Neuropathien<sup>4;6</sup>, bei der Verlaufskontrolle und Prognoseeinschätzung nach Myokardinfarkt<sup>7;8</sup>, bei der Diagnostik von Schlaganfällen und Schädel-Hirn-Traumata<sup>9-11</sup>, bei der Erfassung von Schlafstörungen<sup>12</sup> sowie in der Kardiochirurgie als Parameter bei der Abstoßungsdiagnostik<sup>13-15</sup>.

Einen wesentlichen Verlaufparameter bei der Analyse von Blutdruckrhythmen im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen stellen die sympathisch vermittelten Blutdruckoszillationen dar. Durch den Einsatz mikroneurografischer Techniken<sup>16-18</sup> konnte gezeigt werden, dass diese periodischen Schwankungen des arteriellen Blutdruckes durch rhythmische Kontraktionen von Widerstandsgefäßen entstehen, die ihrerseits durch periodische Entladungen des sympathischen Nervensystems verursacht werden. Diese als Mayer-Wellen bezeichneten Oszillationen liegen beim Menschen im Frequenzbereich um 0,1 Hz<sup>19</sup>, können jedoch bei Erkrankungen wie Diabetes mellitus<sup>6</sup>, Herzinsuffizienz<sup>20</sup>, arterieller Hypertonie<sup>21</sup> sowie orthostatischen Regulationsstörungen<sup>22;23</sup> in ihrer Amplitude und Frequenz verändert sein. Während diese Veränderungen bei Diabetes mellitus der autonomen Neuropathie zugeschrieben werden, sind die Ursachen

abnormaler Blutdruckrhythmik bei Erkrankungen, die nicht mit einer Degeneration sympathischer Nervenfasern einhergehen, noch nicht geklärt. Eine Erklärungsmöglichkeit für diese Frage bietet eine veränderte Ansprechbarkeit des Gefäßsystems gegenüber sympathischen Reizen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, den Einfluss der adrenergen Gefäßansprechbarkeit auf die Amplitude und die Frequenz von sympathisch vermittelten Blutdruckoszillationen zu untersuchen. In diesem Zusammenhang sollen die Faktoren bestimmt werden, die die sympathische Gefäßansprechbarkeit beeinflussen, wobei die Familie der  $\alpha_1$ -adrenergen Rezeptoren, die eine dominierende Rolle bei der Vermittlung sympathischer Signale auf das Blutgefäßsystem spielt<sup>24</sup>, besondere Berücksichtigung findet. Die Komplexität der autonomen Blutdruckregulation erfordert neben Untersuchungen auf systemphysiologischer Ebene auch eine isolierte Betrachtung der an ihr beteiligten Mechanismen. Aus diesem Grund werden neben Versuchen am wachen Tier auch Experimente auf zellulärer und vaskulärer Ebene durchgeführt.

Die Arbeit stellt Ergebnisse zu den Mechanismen, die die kontraktile Eigenschaften von glatten Gefäßmuskelzellen gegenüber  $\alpha_1$ -adrenergen Agonisten bestimmen, dar. Im Einzelnen wird der Einfluss einer erhöhten  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Dichte sowie der Expression der drei verschiedenen Subtypen  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  und  $\alpha_{1D}$  auf die kontraktile Eigenschaften genetisch transfizierter Muskelzellen untersucht. Frequenzanalysen von Blutdruck und sympathischer Nervenaktivität verschiedener Tiermodelle, die durch Unterschiede in ihrer vaskulären  $\alpha_1$ -adrenergen Ansprechbarkeit gekennzeichnet sind, gestatten es, dynamische Eigenschaften der Übertragung der rhythmischen Aktivität des vegetativen Nervensystems auf systemischer Ebene zu analysieren. In funktionellen Studien an isolierten mesenterialen Widerstandsgefäßen werden zudem die Mechanismen, die die sympathische Gefäßansprechbarkeit beeinflussen, untersucht.

## **1.2 Entstehung von Blutdruckoszillationen und deren Analyse**

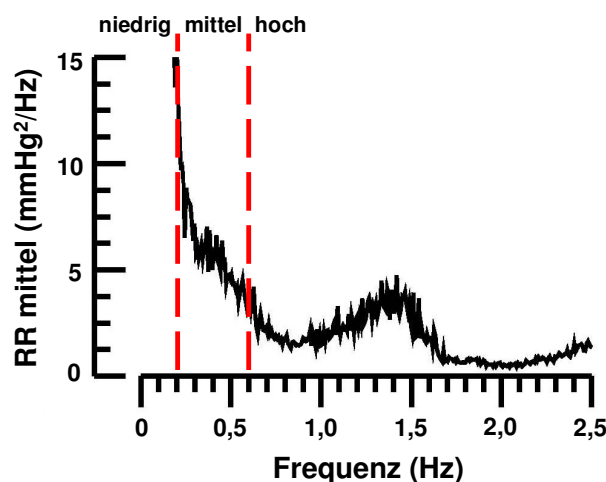
Das Herz-Kreislauf-System muss zu jeder Zeit eine bedarfsgerechte Gewebe- bzw. Organperfusion gewährleisten. Ein den Erfordernissen angepasster Blutdruck wird durch eine Reihe regulatorischer Systeme eingestellt, zu denen neben dem autonomen Nervensystem, das NO-System und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System<sup>25</sup> gehören. Das vegetative Nervensystem ist durch rhythmische Schwankungen seiner Aktivität gekennzeichnet. Solche periodischen Aktivitätsänderungen finden sich auch in den Effektoren von Atmung, Herz und Kreislauf, z.B. als Modulation der Herzfrequenz oder der Atmungstiefe. Für die Entstehung der rhythmischen Phänomene werden zentralnervöse Mechanismen in den Neuronen des kardiorespiratorischen Netz-

werkes der Medulla oblongata, reflektorische Verbindungen zwischen dem Atmungs- und dem Herz-Kreislauf-System sowie nichtlineare Informationsübertragungen innerhalb dieser Systeme diskutiert<sup>26-29</sup>.

Die Entwicklung quantitativer Methoden der Signalanalyse ermöglicht es, die Rolle von Kontrollsystemen der Blutdruckregulation zu untersuchen<sup>30-33</sup>. Die Grundidee ist, dass unterschiedliche Regulationssysteme den arteriellen Blutdruck nur in sehr spezifischen Frequenzbereichen modulieren können<sup>6,34</sup>. So führt zum Beispiel die pharmakologische Blockade des Kallikrinin-Kinin-Systems und des Renin-Angiotensin-Systems bei Ratten zu einer Reduktion der Blutdruckvariabilität im Frequenzbereich unter 0,2 Hz<sup>31</sup>. Eine weitere Quelle periodischer Fluktuationen des arteriellen Blutdruckes stellen sympathisch vermittelte Oszillationen der arteriellen Widerstandsgefäße dar. Diese als Mayer-Wellen<sup>35</sup> bezeichneten Blutdruckrhythmen sind beim Menschen im Frequenzbereich um 0,1 Hz<sup>19</sup> zu finden. Sie werden auch unter den Begriffen 10-Sekunden-Rhythmus oder Blutdruckwellen III. Ordnung geführt. Obwohl die Details zur Genese der Mayer-Wellen derzeit noch diskutiert werden, wurde ihr enger Zusammenhang mit dem sympathischen Nervensystem vielfach bestätigt<sup>16-18</sup>.

Blutdruckoszillationen können mittels der Spektralanalyse untersucht werden. Dieses Analyseverfahren beruht auf der Fourier-Transformation, einem von Joseph Fourier (1768-1830) entwickelten Verfahren und einer in der Natur- und Ingenieurwissenschaft vielfach genutzten Technik, mit der ein Signal in seine rhythmischen Komponenten, die durch ihre Frequenz und spektrale Leistung (ein Maß für die Amplitude) gekennzeichnet sind, zerlegt werden kann. Dieses Verfahren wird unter anderem bei der Untersuchung periodischer Komponenten der Herzfrequenzvariabilität eingesetzt. Die Analyse gestattet Rückschlüsse auf die Funktionen der an der Entstehung der Herzfrequenzmodulation beteiligten Systeme<sup>2,36-38</sup>. So kann man zum Beispiel eine sogenannte respiratorische Sinusarrhythmie in der Zeitreihe der Herzfrequenz identifizieren. Die Frequenz dieser Komponente der Herzfrequenzvariabilität korreliert mit der Atemfrequenz. Die spektrale Leistung in diesem Frequenzbereich stellt ein Maß für die Ausprägung der respiratorischen Sinusarrhythmie dar. Da diese durch die vagale Innervation der Herzens vermittelt wird, können unter standardisierten Untersuchungsbedingungen Aussagen über die Aktivität des parasympathischen Teils der vegetativen Herzsteuerung gemacht werden. Neben der Herzfrequenz und dem Blutdruck kann man mit der Spektralanalyse auch den Frequenzgehalt und die Ausprägung von Nervensignalen analysieren und diese in Bezug zu den entsprechenden kardiovaskulären Parametern setzen.

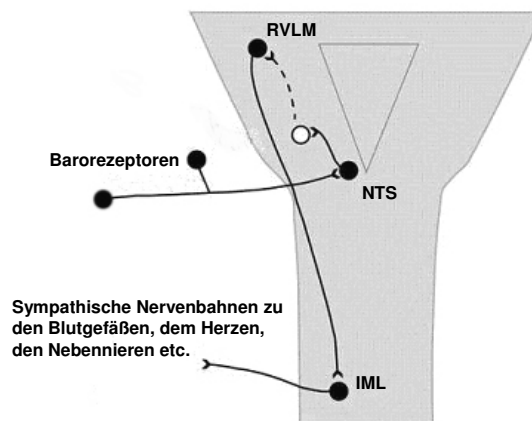
Die Spektralanalyse des Blutdruckes beim Menschen hat zur Identifizierung dreier wesentlicher Rhythmen geführt: Im sogenannten Hochfrequenzbereich des Blutdruckes (0,15-0,5 Hz) findet sich die atemungskorrelierte Komponente. Im Mittelfrequenzbereich (0,05-0,15 Hz) liegen die 10-Sekunden-Rhythmen oder Mayer-Wellen. Es gibt zahlreiche Befunde dafür, dass sie einen quantitativen Marker für die sympathische Aktivität darstellen<sup>17</sup>. Eine weitere prominente Leistung wird dem niedrigen Frequenzbereich (0,01-0,05 Hz) zugeordnet. In Bezug auf diesen Bereich gibt es Hinweise für eine Beteiligung myogener Rhythmizität<sup>39-41</sup> sowie von rhythmischen Änderungen der Gefäßweite im Dienste der Thermoregulation<sup>42</sup>. Dabei ist zu beachten, dass die für den Menschen geltenden Frequenzbereiche bei kleineren Spezies zu höheren Frequenzen hin verschoben sind. So zeigt die Abbildung 1.1 ein Blutdruckleistungsspektrum einer Ratte des Stammes Wistar Kyoto (WKY) mit Leistungen im Frequenzbereich von 0,6-2,5 Hz (Hochfrequenzbereich), 0,2-0,6 Hz (Mittelfrequenzbereich) und 0,02-0,2 Hz (Niedrigfrequenzbereich).



**Abbildung 1.1:** Leistungsspektrum des arteriellen Mitteldruckes einer Wistar Kyoto-Ratte. Auf der Ordinate ist die Leistung, auf der Abszisse die Frequenz abgetragen. Die roten Markierungen kennzeichnen die Grenzen des mittleren Frequenzbereiches, in dem die sympathisch vermittelten Blutdruckoszillationen lokalisiert sind.

### 1.3 Baroreflex und Theorien zur Entstehung sympathisch vermittelter Blutdruckoszillationen

Das autonome Nervensystem ist über den Baroreflexbogen entscheidend an der Blutdruckregulation beteiligt. Einen wesentlichen Bestandteil dieses Reflexbogens bilden die Baro- oder Pressorezeptoren, die in den Wänden des Karotissinus und des Aortenbogens lokalisiert sind. Sie sind in der Lage, durch die Dehnung der Gefäßwand, indirekt Blutdruckveränderungen zu registrieren. Fällt zum Beispiel der arterielle systemische Blutdruck plötzlich ab, wird das von den Barorezeptoren des Karotissinus über den Nervus glossopharyngeus, von denjenigen des Aortenbogens über den Nervus vagus an den Nucleus tractus solitarius (NTS) gemeldet. Von dort aus bestehen polysynaptische Verbindungen zum Nucleus ambiguus und Nucleus dorsalis nervi vagi, die die sogenannten kardiovagalen Nervenfasern entsenden und bei einem Blutdruckabfall eine Zunahme der Herzfrequenz bewirken. Des Weiteren erfolgt über Verbindungen zur rostroventrolateralen Medulla oblongata (RVLM) eine Aktivierung der kardialen und peripheren sympathischen Efferenz, was unter anderem zu einer Mobilisierung von Blutreserven in den Kapazitätsgefäßen, einer Erhöhung des systemischen Gefäßwiderstandes sowie zu einer Erhöhung der kardialen Inotropie, Chronotropie und Dromotropie führt (siehe Abbildung 1.2).



**Abbildung 1.2:** Vereinfachte schematische Darstellung des Baroreflexregelkreises. Die schwarzen Kreise symbolisieren zusammen mit den kontinuierlichen Linien exzitatorische Nervenbahnen. Die weißen Kreise mit den unterbrochenen Linien stehen für inhibitorische Nervenbahnen. NTS: Nucleus tractus solitarius; RVLM: rostroventrolaterale Medulla oblongata; IML: intermedialateraler Nucleus (Modifiziert nach Pilowsky und Goodchild, 2002).

Bereits 1951 stellten Guyton & Harris<sup>43</sup> die Theorie auf, dass es im Rahmen dieses autonomen Regelkreises zu einem Resonanzphänomen und somit zu kontinuierlichen Oszillationen des arteriellen Blutdruckes kommt. Später wurde die Hypothese durch den Einsatz von Computersimulationsmodellen präzisiert. Dementsprechend wird die Resonanzfrequenz offensichtlich durch die Latenzzeiten im Baroreflexbogen bestimmt<sup>44-46</sup>. Untersuchungen an sinoaortal denervierten Tieren, die eine Reduktion der sympathisch vermittelten Blutdruckoszillationen aufwiesen<sup>39;47-49</sup>, stützen diese Hypothese. Obwohl viele Studien eine wichtige Rolle des Baroreflexbogens bei der Synchronisation der Mayer-Wellen gezeigt haben, konnte keine von ihnen einen eindeutigen Beweis darüber liefern, dass die Oszillationen durch den Baroreflex per se entstehen.

Eine weitere Hypothese besagt auf der Basis von Tierexperimenten, dass die Mayer-Wellen durch einen zentralen Oszillator generiert werden. So konnten zum Beispiel in anästhesierten Katzen spontane, langsame Fluktuationen der sympathischen Nervenaktivität in Abwesenheit begleitender Blutdruckveränderungen festgestellt werden<sup>50</sup>. In einer weiteren Studie an vagotomierten Hunden wurde gezeigt, dass der Blutfluss in der hinteren Extremität auch bei konstant gehaltenem Karotissinusdruck selbsterhaltende Oszillationen aufweist<sup>51</sup>. Obwohl beide Studien die Beteiligung eines zentralen Oszillators an der Genese der Mayer-Wellen nahelegen, ist zu beachten, dass die Periodendauer von 20-25 s der beobachteten Fluktuationen länger ist als die der Mayer-Wellen in Katzen<sup>47</sup> und Hunden<sup>37</sup>. Auch Experimente an Tieren mit unterbrochenem afferenten Schenkel des Baroreflexbogens, bei denen die Fluktuationen im Frequenzbereich der Mayer-Wellen nur um 30-50% reduziert waren<sup>39;47;48;52</sup> liefern Argumente für die Theorie eines zentralen Oszillators. Für die Beteiligung des sympathischen Nervensystems an der Entstehung der Oszillationen sprechen Studien, in denen gezeigt wurde, dass sie nach akuter und chronischer Blockade der sympathischen Übertragung vollständig verschwinden<sup>48;53-55</sup>.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Genese der sympathisch vermittelten Blutdruckoszillationen noch nicht endgültig geklärt ist, da es Argumente für beide Theorien gibt, die bisher nicht eindeutig widerlegt werden konnten. Jedoch ist es weitestgehend akzeptiert, dass die Übertragung sympathischer Nervensignale auf das Blutgefäßsystem eine wesentliche Komponente bei der Entstehung der Mayer-Wellen darstellt.

## 1.4 Veränderungen der sympathisch vermittelten Blutdruckoszillationen bei Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems

Veränderungen der Amplitude und Frequenz von sympathisch vermittelten Blutdruckoszillationen sind bei verschiedenen pathophysiologischen Zuständen im Bereich des Herz-Kreislauf-Systems anzutreffen. So konnten bei Erkrankungen wie Diabetes mellitus<sup>6;56;57</sup>, Herzinsuffizienz<sup>58;59</sup>, Schlaganfall<sup>60;61</sup>, Bluthochdruck<sup>62;63</sup> sowie im Zusammenhang mit orthostatischen Regulationsstörungen<sup>22</sup> Veränderungen in den Parametern der Mayer-Wellen nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse führten zu einer zunehmenden Intensivierung der Bemühungen, die Ursachen bzw. die Mechanismen dieser Veränderungen zu verstehen. Im Rahmen dieser Studien wurde unter anderem eine negative Korrelation zwischen der Körpergröße einer Spezies und deren Mayer-Wellen-Frequenz festgestellt. So liegt der 10-Sekunden-Rhythmus des Menschen bei Hunden im Bereich um 0,14 Hz<sup>36;64</sup>, bei Kaninchen um 0,3 Hz<sup>65</sup> und bei Ratten um 0,4 Hz<sup>66</sup>. Diese speziesspezifischen Frequenzunterschiede werden der durch die jeweilige Körpergröße bedingten unterschiedlichen Entfernung zwischen den Oszillationsgeneratoren und den Zielorganen zugeschrieben<sup>67</sup>, die zu unterschiedlichen Latenzzeiten bei der sympathischen Signalübertragung führen.

Einer erhöhten Latenzzeit bei der neuronalen Signalübertragung wird auch die verringerte Frequenz der Mayer-Wellen bei Diabetes mellitus zugeschrieben<sup>6;68</sup>, bei dem es im Rahmen der autonomen Neuropathie zur Verringerung der Leitungsgeschwindigkeit sympathischer Nervenfasern kommt. Hiermit lassen sich jedoch nicht die Veränderungen der Mayer-Wellen-Parameter bei Erkrankungen, die nicht mit einer Neuropathie assoziiert sind, erklären. Eine mögliche Ursache für diese Veränderungen wäre in einer abnormen Reaktivität des Gefäßsystems zu suchen, die ebenfalls einen Verzögerungsfaktor in der Baroreflex-Schleife darstellen könnte. Erstaunlicherweise blieb der Einfluss der sympathischen Gefäßansprechbarkeit auf die Amplitude und die Frequenz der Mayer-Wellen über lange Zeit wissenschaftlich unberücksichtigt.

Die Lokalisation von Blutdruckoszillationen im Frequenzbereich zwischen 0,1 und 0,4 Hz setzt voraus, dass die Umwandlung des sympathischen Reizes in eine Gefäßreaktion schnell genug ist, um Fluktuationen dieses Frequenzniveaus aufrechterhalten zu können. Erste Experimente zu diesem Thema führten 1968 Rosenbaum und Race<sup>69</sup> durch, die den sympathischen Truncus lumbalis in der präparierten hinteren Extremität von Hunden elektrisch stimuliert haben. In der Studie reagierte das Gefäßsystem auf periodisch applizierte Reize äußerst langsam. Die Frequenz der resultierenden Blutdruckoszillationen lag dabei im Bereich um 0,017 Hz, was einer Perioden-

dauer von etwa 60 s entspricht. Bei solch einer langsamen Ansprechbarkeit wäre das Blutgefäßsystem jedoch nicht in der Lage, sympathische Stimuli, die im Frequenzbereich der Mayer-Wellen liegen, in Blutdruckoszillationen umzuwandeln. Vielmehr wäre eine Dauerkontraktion des jeweiligen Gefäßbereiches zu erwarten. In aktuelleren Studien am Menschen konnte mittels periodischer elektrischer Stimulation von sympathischen Nervenfasern gezeigt werden, dass das Gefäßsystem Reizfrequenzen von etwa 0,1 Hz folgen kann. Bei Ratten konnten sogar, in Abhängigkeit vom stimulierten Gefäßgebiet, Reizfrequenzen zwischen 0,1 und 0,5 Hz in Gefäßoszillationen übertragen werden<sup>70-73</sup>, womit entscheidende Hinweise für eine Rolle der sympathischen Ansprechbarkeit des vasomotorischen Systems bei der Generierung von Mayer-Wellen geliefert wurden. Gleichzeitig weisen diese Untersuchungen darauf hin, dass die Geschwindigkeit der sympathischen Gefäßansprechbarkeit die Frequenz der Mayer-Wellen limitiert<sup>73</sup>. Mit dieser Einschränkung ist auch die verhältnismäßig niedrige Frequenz der sympathisch vermittelten Blutdruckoszillationen und somit ihre Lage im mittelfrequenten Bereich des Blutdruckspektrums zu erklären. Eine pathologisch veränderte Gefäßansprechbarkeit könnte dementsprechend auch eine Rolle bei der Veränderung der Mayer-Wellen-Parameter im Rahmen von diversen kardiovaskulären Erkrankungen spielen. So weisen Untersuchungen an Menschen und Tieren darauf hin, dass eine erhöhte sympathische Nervenaktivität, wie sie im fortgeschrittenen Alter<sup>74</sup> oder im Rahmen einer Herzinsuffizienz<sup>75-77</sup> vorkommt, mit einer verminderten Gefäßansprechbarkeit gegenüber  $\alpha_1$ -adrenergen Agonisten einhergeht<sup>74</sup>. Dies lässt einen negativen Rückkopplungsmechanismus zwischen dem sympathischen Nervensystem und den  $\alpha_1$ -adrenergen Rezeptoren vermuten. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang eine agonistenvermittelte Verminderung der Anzahl vaskulärer  $\alpha_1$ -adrenerger Rezeptoren, wie sie beispielsweise für die  $\beta$ -Adrenozeptoren beschrieben wurde<sup>78</sup>.

## **1.5 Rolle der $\alpha_1$ -adrenergen Rezeptoren bei der Herz-Kreislauf-Regulation und der Mayer-Wellen-Genese**

Zu den adrenergen Rezeptoren werden neun verschiedene Genprodukte ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) gezählt, die alle die physiologischen Effekte der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin vermitteln. Sie gehören gemeinsam der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an und weisen viele strukturelle Ähnlichkeiten auf.

Der Familie der  $\alpha_1$ -adrenergen Rezeptoren kommt neben der Steuerung metabolischer Prozesse<sup>79</sup>, der renalen Natrium- und Wasserreabsorption<sup>80</sup> und der Kontraktilität des Urogenitaltraktes<sup>81</sup> eine bedeutende Rolle bei der Regulation des arteriellen Blutdruckes zu, was insbesondere

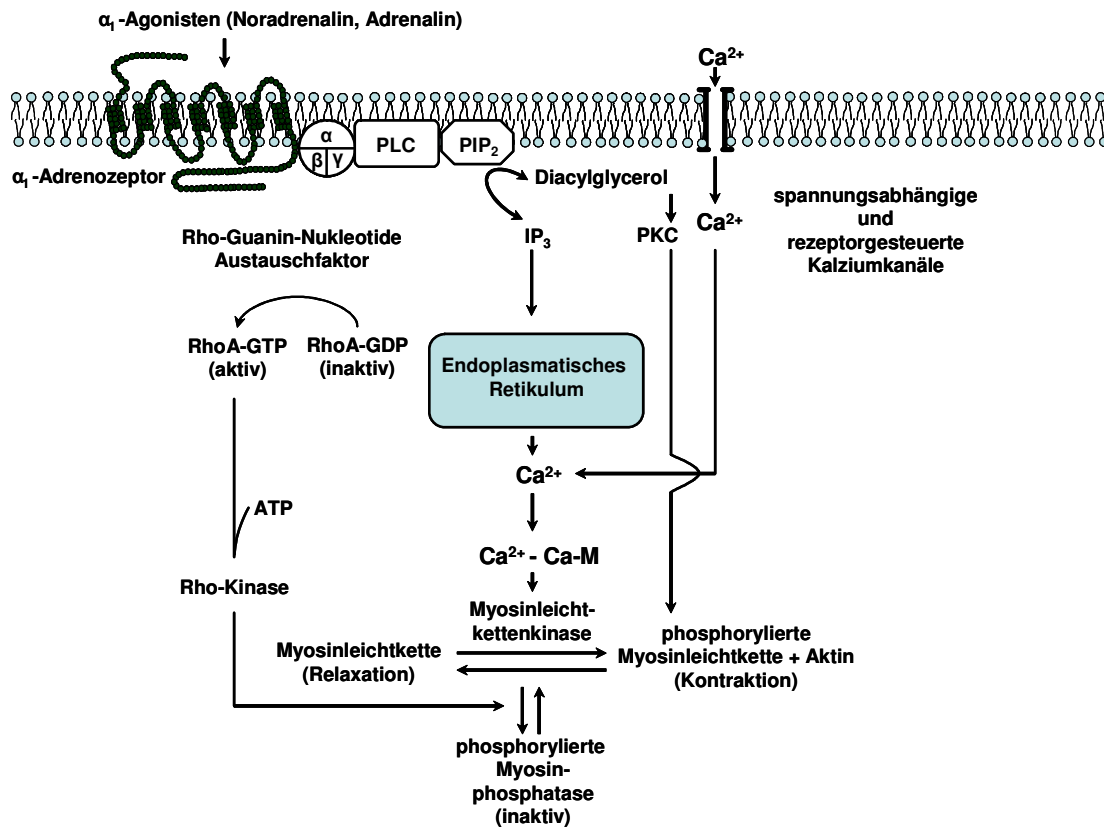


beim klinischen Einsatz von  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Antagonisten zum Ausdruck kommt<sup>24;82</sup>. Die Bedeutung dieser Rezeptorfamilie liegt dabei in der Vermittlung positiv-inotroper und chronotroper Effekte am Herzen sowie in der Regulation der sympathisch vermittelten Gefäßkontraktilität begründet.

Ihre Effekte vermitteln die  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren durch ihre Kopplung an ein Pertussistoxin-insensitives G-Protein der Gq/11-Familie<sup>83</sup>, das bei Aktivierung in der Zellmembran Phospholipase C (PLC) stimuliert. PLC bewirkt die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in die beiden Second-Messenger Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG). IP<sub>3</sub> erhöht die intrazelluläre Konzentration an Ca<sup>2+</sup>-Ionen durch deren Freisetzung aus intrazellulären Speichern, wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER). DAG aktiviert dagegen die Proteinkinase C (PKC), die ihrerseits die Phosphorylierung von Proteinen und Membrankanälen bewirkt und auf diesem Weg zur weiteren Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Ionenkonzentration<sup>84-86</sup> beiträgt. Sowohl IP<sub>3</sub> als auch DAG wirken nur kurzzeitig, werden in einem komplexen Zyklus metabolisiert und zur Synthese von PIP<sub>2</sub> wiederverwendet.

Die ins Zytoplasma freigesetzten Ca<sup>2+</sup>-Ionen bilden mit dem Protein Calmodulin einen Komplex (Ca-M), der eine Interaktion mit dem Enzym Myosinleichtkettenkinase eingeht. Dadurch wird die Myosinleichtkettenkinase aktiviert, wodurch sie ihrerseits die Phosphorylierung der 20 kDa leichten Ketten der Myosinköpfechen katalysiert. Hierdurch wird eine Interaktion zwischen Aktin und Myosin ermöglicht. Sinkt die intrazelluläre Konzentration an Ca<sup>2+</sup>-Ionen wieder ab, so vermindert sich die Aktivität dieser Proteinkinase und die leichten Ketten des Myosins werden durch die Myosinphosphatase dephosphoryliert, was zu einer Unterbrechung der Aktin-Myosin-Wechselwirkung führt.

Die Kontraktilität von glatten Muskelzellen wird zusätzlich durch von der Ca<sup>2+</sup>-Ionenkonzentration unabhängige Mechanismen reguliert. Diese spielen unter anderem bei der sympathischen Modulation des Gefäßtonus<sup>87</sup> und bei der Vermittlung myogener Gefäßantworten<sup>88</sup> eine bedeutende Rolle. Bei diesem sogenannten Ca<sup>2+</sup>-Sensitivierungsprozess führen aktivierte G-Proteine ihrerseits zu einer Aktivierung der Rho-Kinase, einer Serin-Threonin-Kinase, die eine Phosphorylierung der Myosinphosphatase und somit die Hemmung ihrer Aktivität bewirkt. Über diesen Mechanismus kommt es zu einer Kontraktionszunahme von Muskelzellen, ohne eine gleichzeitige Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Ionenkonzentration. Die Signalmechanismen sind in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt.



**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung der intrazellulären Signalprozesse glatter Gefäßmuskulaturzellen. Die Stimulation der  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren bewirkt eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die eine Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) in die beiden Second-Messenger Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) katalysiert. Dadurch kommt es zu einer  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern sowie zu einer Aktivierung diverser Zellproteine, wie der Myosinleichtkettenkinase und rezeptorgesteuerter Kalziumkanäle durch Phosphorylierung. Die Aktivierung der Rho-Kinase führt zu einer Sensitivierung des kontraktiven Apparates gegenüber  $Ca^{2+}$ -Ionen.

Die Forschung an  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren erfuhr Anfang der 90er Jahre einen Schub als es gelang, die Subtypen dieser Rezeptorfamilie zu identifizieren, zu klonieren und zu charakterisieren<sup>89-92</sup>. Damit konnte das bestätigt werden, was aufgrund pharmakologischer Studienergebnisse bereits lange vermutet wurde, nämlich dass es sich bei dem  $\alpha_1$ -adrenergen Rezeptor um verschiedene Genprodukte handelt<sup>93</sup>. Bisher wurden drei verschiedene Subtypen dieser Rezeptorfamilie isoliert, wobei spezies- und organspezifische Unterschiede bei der Expression der einzelnen Rezeptorsubtypen festgestellt werden konnten<sup>85;94-96</sup>.

Nach einer ausgeprägten Diskussion über die Nomenklatur der Subtypen, hat man sich auf die Bezeichnungen  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  und  $\alpha_{1D}$  für das jeweilige Genprodukt sowie  $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$  und  $\alpha_{1d}$  für die entsprechende cDNA geeinigt<sup>97</sup>. Dieser langwierige Einigungsprozess führte zur allgemeinen Kon-

fusion, die sich insbesondere in der wissenschaftlichen Literatur der 90er Jahre widerspiegelt. So ist der  $\alpha_{1A}$ -Subtyp oftmals auch unter den Bezeichnungen  $\alpha_{1C}$  oder  $\alpha_{1A/C}$  zu finden. Hingegen wurde der  $\alpha_{1D}$ -Subtyp über lange Zeit als  $\alpha_{1A}$  bezeichnet.

Nach ihrer Klonierung standen die drei  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Subtypen im zunehmenden Interesse der Herz-Kreislauf-Forschung. Dies liegt in erster Linie darin begründet, dass sie von da an in Zellen, die keinen endogenen Besatz dieser Rezeptoren aufwiesen, exprimiert werden konnten, wodurch die Untersuchung des Zusammenspiels individueller Subtypen mit zellulären Signalkaskaden möglich wurde. In diesen Studien wurde beobachtet, dass es signifikante Unterschiede im Kopplungsvermögen der  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Subtypen an intrazelluläre Signalmoleküle gibt<sup>98;99</sup>. Des Weiteren wurden die Rezeptoren mit der Pathogenese diverser Erkrankungen in Verbindung gebracht, zu denen die Multisystematrophie<sup>100;101</sup>, Herzhypertrophie<sup>102-105</sup>, ischämisch induzierte kardiale Arrhythmien<sup>98;106</sup>, pulmonale Hypertonie<sup>107</sup>, Arteriosklerose<sup>108;109</sup> sowie arterielle Hypertonie<sup>94;96;110</sup> und mit dieser Erkrankung assoziierte Gefäßveränderungen<sup>111</sup> zählen.

Obwohl die bedeutende Rolle der  $\alpha_1$ -adrenergen Rezeptoren bei der Blutdruckregulation seit langem bekannt ist, konnte die Beteiligung der einzelnen Subtypen an diesem Regulationsprozess noch nicht aufgeklärt werden. Dies liegt in erster Linie an dem Mangel ausreichend selektiver Agonisten- und Antagonisten sowie der unterschiedlichen Expression der einzelnen  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Subtypen innerhalb des Herz-Kreislauf-Systems. Ebenfalls ungelöst ist die Frage, inwiefern die vaskuläre  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Expression die Parameter der sympathisch vermittelten Blutdruckoszillationen beeinflusst. Mehrfach konnte bereits gezeigt werden, dass eine Blockade des  $\alpha_1$ -adrenergen Rezeptorsystems zu einer starken Verminderung der Blutdruckvariabilität im Frequenzbereich der Mayer-Wellen führt<sup>55;112</sup>. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Rezeptorfamilie wesentlich an der Genese dieser Oszillationen beteiligt ist, indem sie die Umwandlung des sympathischen Reizes durch die Bindung des Transmitters Noradrenalin in eine Gefäßmuskelkontraktion vermittelt. Bisher wurde jedoch noch bei keiner Erkrankung ein direkter Zusammenhang zwischen der vaskulären  $\alpha_1$ -adrenergen Ansprechbarkeit und Veränderungen der Mayer-Wellen-Parameter gezeigt.

## 1.6 Hypothesen

- 1.) Das Ausmaß und die Geschwindigkeit der  $\alpha_1$ -adrenerg vermittelten Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen hängen von der Dichte der exprimierten  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren ab.
- 2.) Die kontraktile Eigenschaften glatter Gefäßmuskelzellen unterscheiden sich in Abhängigkeit vom exprimierten  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Subtyp.
- 3.) Die sympathische Gefäßansprechbarkeit von arteriellen Widerstandsgefäßen hängt von der  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Expression ab.
- 4.) Eine erhöhte  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Expression im Herz-Kreislauf-System führt zu einer verstärkten Blutdruckansprechbarkeit gegenüber spezifischen Agonisten.
- 5.) Eine verstärkte Ansprechbarkeit des Gefäßsystems auf sympathische Stimuli führt zu einer erhöhten Frequenz und Amplitude sympathisch vermittelter Blutdruckoszillationen.

## 1.7 Experimentelle Überlegungen

Ein Großteil des bisherigen Wissens über die  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Subtypen stammt aus Experimenten an genetisch modifizierten Zellkulturen, in denen unter anderem COS-7-<sup>95</sup> oder HEK293-Zellen<sup>113</sup> bzw. Fibroblasten<sup>114</sup> verwendet wurden. Diese Studien konnten zwar wichtige molekularbiologische Eigenschaften der einzelnen  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren aufdecken, sie lassen jedoch keinen Schluss über ihren Einfluss auf das Kontraktionsverhalten glatter Gefäßmuskelzellen zu, da diese als hoch spezialisierte Zellen einerseits über eine spezifische Ausstattung an kontraktilen Proteinen, Signalkaskadenmolekülen und Ionenkanälen verfügen<sup>115</sup>, andererseits eine einfache Extrapolation der molekularbiologischen Befunde nicht ausreicht, um Aussagen über die kontraktilen Eigenschaften von Gefäßmuskelzellen zu treffen. Würde man dies tun, müsste man einen linearen Zusammenhang zwischen der Menge an gebildeten Signalmolekülen und dem Ausmaß der Muskelkontraktion voraussetzen, was jedoch in Anbetracht der großen Anzahl an potentiellen Interaktionsmechanismen der zum Teil neu entdeckten Signalwege die Gefahr falscher Schlussfolgerungen in sich birgt.

Um den Einfluss der  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren auf die kontraktilen Eigenschaften von Blutgefäßen zu untersuchen, wurden in den letzten Jahren viele Studien an isolierten Blutgefäßen verschiedener Gefäßregionen durchgeführt. Einschränkungen dieser Experimente ergeben sich aus der unterschiedlichen Verteilung der Rezeptoren im Blutgefäßsystem<sup>116</sup> sowie aus dem Mangel an entsprechenden, hochselektiven Agonisten und Antagonisten. Der Vergleich unterschiedlicher Gefäßgebiete mit einem individuellen  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Besatz sowie Unterschieden in der Ausstattung an intrazellulären Signalmolekülen und Membrankanälen ist für die Beantwortung der Frage nach der Funktion von  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Subtypen nur bedingt geeignet. Aus den genannten Gründen wurden in der vorliegenden Arbeit Transfektionsexperimente an isolierten Muskelzellen einer Gefäßregion durchgeführt. Ziel der Studien war es dabei, die zelluläre Überexpression eines einzelnen  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Subtyps herbeizuführen, um anschließend dessen Einfluss auf den Kontraktionsprozess zu untersuchen. Bei den Versuchen wurde sowohl die Intensität als auch die Geschwindigkeit der Zellkontraktion bestimmt, da beide Parameter einen potentiellen Einfluss auf die Amplitude und Frequenz sympathisch vermittelter Blutdruckoszillationen haben können.

Für die Erstellung eines Zusammenhanges zwischen der  $\alpha_1$ -adrenerg vermittelten Blutdruckansprechbarkeit und den Parametern der sympathisch vermittelten Blutdruckoszillationen, wurden Ratten, bei denen bereits Unterschiede in der vaskulären  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Dichte<sup>117;118</sup> und in

der katecholaminvermittelten Gefäßansprechbarkeit<sup>119;120</sup> beschrieben wurden, verwendet. In die Versuche wurden spontan hypertensive Ratten (SHR), renal hypertensive Ratten (2K-1C) sowie der normotensive Kontrollstamm Wistar Kyoto eingeschlossen. SHR weisen eine erbliche Form der Hypertonie auf, die durch eine sympathoadrenale Hyperaktivität gekennzeichnet ist<sup>121;122</sup>. Mehrere Studien haben zudem eine erhöhte Expression vaskulärer  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren sowie erhöhte Plasmakatecholaminspiegel in diesem Tiermodell gezeigt, bei dem eine genetisch bedingte Regulationsstörung zwischen Agonist und Rezeptor vermutet wird<sup>123</sup>. Demgegenüber stellen die 2K-1C ein Modell für eine sekundäre Hypertonieform dar, die durch eine künstlich herbeigeführte Nierenarterienstenose und eine dadurch bedingte Aktivierung des Endothelin- sowie des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems hervorgerufen wird<sup>124;125</sup>. Da Angiotensin II eine verstärkte Katecholaminfreisetzung aus peripheren sympathischen Neuronen bewirkt<sup>126</sup> und somit zu einer vermehrten Transmitterexposition vaskulärer  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren führt, könnte die Verminderung der Rezeptorzahl durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus bedingt sein.

Alle in vivo-Experimente wurden an wachen Tieren durchgeführt, um einen Einfluss des Narkosemittels auf die Untersuchungen auszuschließen. Dabei wurde der Blutdruck mittels eines arteriellen Katheters direkt gemessen, da dies eine genaue und reproduzierbare Methode für die Beurteilung des Blutdruckes und der Herzfrequenz darstellt. Die sympathische Nervenaktivität wurde am Nervus splanchnicus major mittels einer bipolaren Ableitelektrode einen Tag nach der operativen Instrumentierung gemessen, da bei Ratten bereits am zweiten postoperativen Tag Degenerationserscheinungen am präparierten Nerven auftreten. Zu Beginn der Studie wurden die Ruhewerte von Blutdruck, Herzfrequenz und sympathischer Nervenaktivität als Grundlage für die Leistungsspektralanalyse bestimmt. Bei der Bewertung dieser Basalwerte ist zu beachten, dass die wachen Ratten neben einem venösen und arteriellen Katheter mit einer Nervenlektrode instrumentiert waren, deren kontinuierliche Irritation eventuell Auswirkungen auf die Ruhewerte haben konnte.

An die Ruheregistrierungen schlossen sich funktionelle Experimente mit adrenergen und nichtadrenergen gefäßaktiven Substanzen an. Dabei sollte festgestellt werden, ob es gruppenabhängige Unterschiede in der  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-vermittelten Blutdruckansprechbarkeit gibt und ob diese spezifisch für die Gruppe der  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren sind. Zusätzlich wurden die zugrundeliegenden vaskulären Mechanismen an isolierten mesenterialen Widerstandsgefäßen untersucht, in denen im Vergleich zu in vivo-Studien eine Vielzahl an systemischen Einflussfaktoren ausgeschlossen wird.