

### **3. ERGEBNISSE**

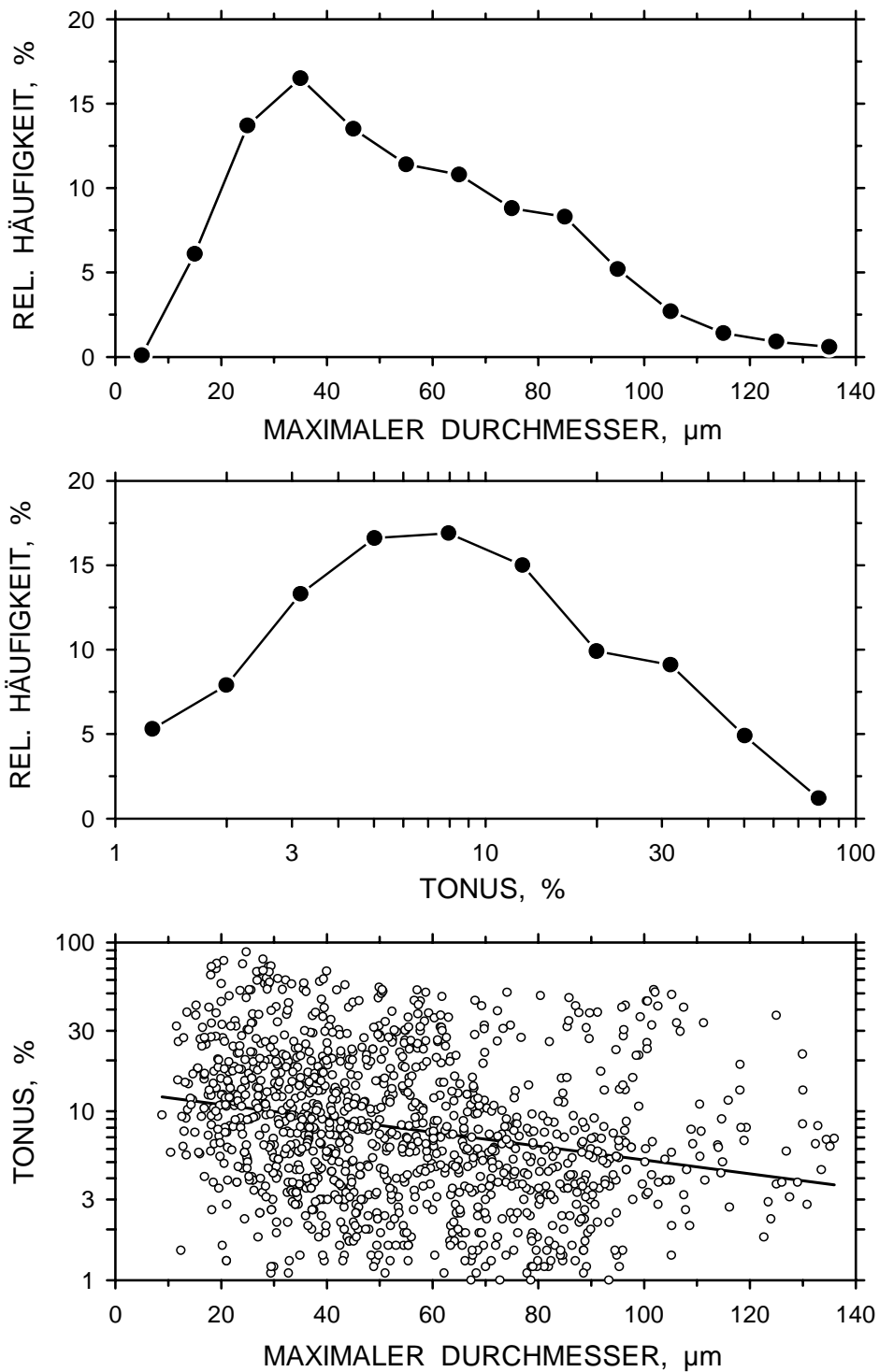
#### **3.1. Systemische hämodynamische Parameter**

Die Experimente wurden an insgesamt 121 Cremastermuskeln durchgeführt. Der arterielle systemische Blutdruck der Versuchstiere war während der Versuchsphasen weitgehend konstant. Die gemessenen Mitteldrucke lagen zwischen 90 und 130 mm Hg ( $114 \pm 19$  mmHg; MW  $\pm$  SD), die Herzfrequenzen zwischen 340 und 390 Schlägen pro Minute. Während der topischen Applikation der tonusbeeinflussenden Substanzen wurden keine signifikanten Änderungen der systemischen hämodynamischen Parameter beobachtet. Auch unter der Superfusion von ACh, PAP, ADO und SNP imponierten keine relevanten Blutdruck- und Herzfrequenzänderungen.

#### **3.2. Durchmesser und Ruhetonus der untersuchten Arteriolen**

Im M. cremaster wurde der Ruhetonus für insgesamt 1215 Arteriolen unterschiedlichen Kalibers bestimmt. Die Häufigkeitsverteilungen des maximalen Durchmessers und des Ruhetonus aller hier im Cremastermuskel untersuchten Arteriolen sind in Abb. 5 gezeigt. Der Durchmesser der Arteriolen lag im unbehandelten Kontrollzustand zwischen 7 und 128  $\mu\text{m}$  ( $48,7 \pm 25,7$   $\mu\text{m}$ ; MW  $\pm$  SD). Die maximal dilatierten Gefäße hatten Durchmesser im Bereich von 9 und 136  $\mu\text{m}$  ( $54,6 \pm 26,4$   $\mu\text{m}$ ). Die logarithmisch transformierten Ruhetonuswerte sind annähernd symmetrisch verteilt. Sie weisen einen Mittelwert von  $7,9 \pm 2,7$  % ( $7,5 \pm 1,0$  %; Median  $\pm$  SE) und eine starke Streuung über den gesamten Wertebereich ( $\sim 1$  bis 87,7 %) auf.

Zur Prüfung, ob der logarithmisch transformierte Ruhetonus Abhängigkeiten vom strukturell determinierten Gefäßdurchmesser, d.h. vom maximalen Durchmesser bei kompletter Vasodilatation, aufweist, wurde eine lineare Regression berechnet (Abb. 5, unten). Diese Analyse ergab eine geringe, aber signifikante inverse Korrelation des Tonus mit dem maximalen Gefäßdurchmesser. Der Tonus sinkt im Mittel von etwa 11 % für Arteriolen mit einem Durchmesser von 20  $\mu\text{m}$  auf etwa 4 % für größere Gefäße von 120 bis 130  $\mu\text{m}$ . Das niedrige Bestimmtheitsmaß verdeutlicht, daß lediglich 6 % der Tonusvariabilität durch unterschiedliche Maximaldurchmesser der Gefäße erklärbar ist.



**Abbildung 5:**

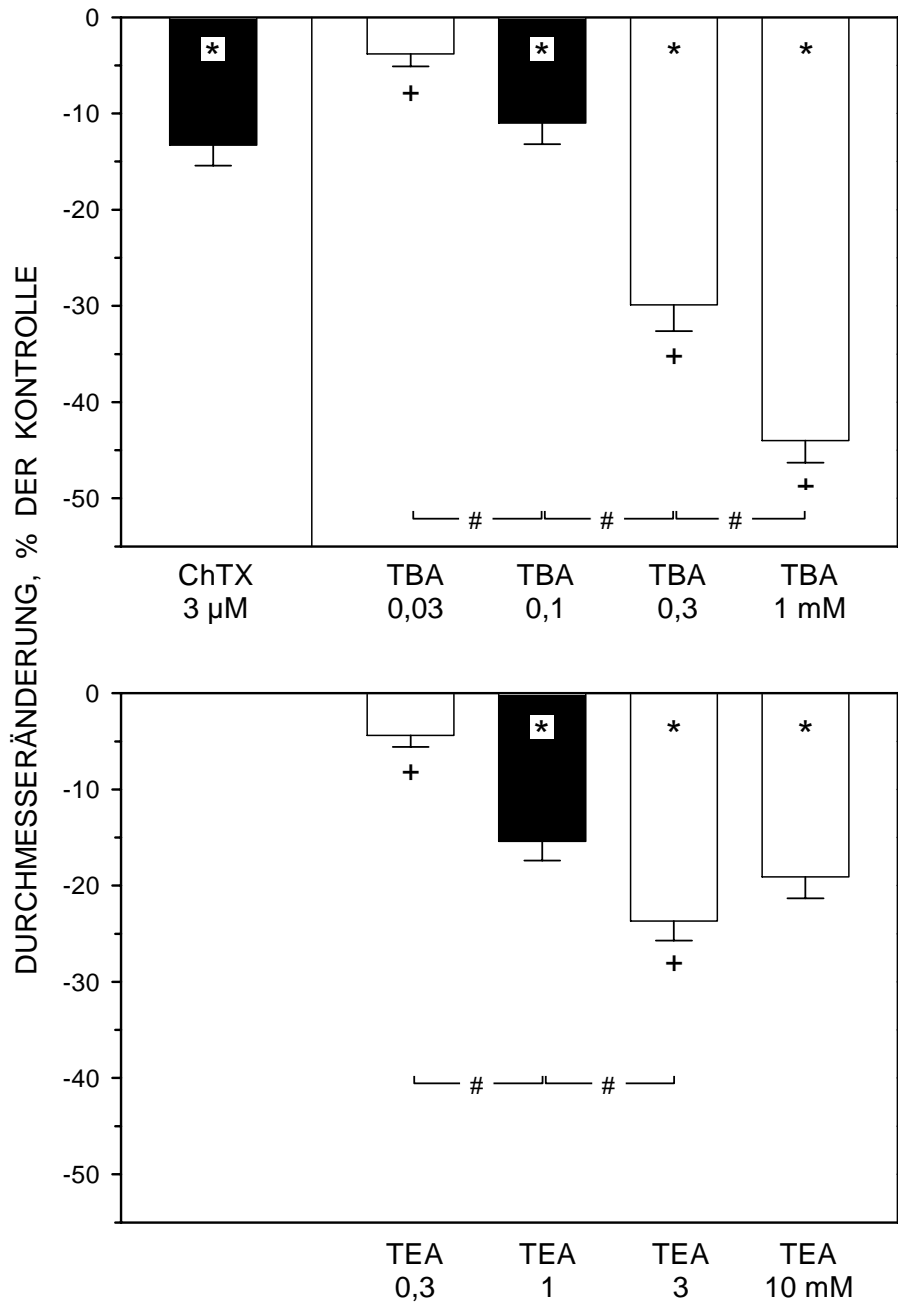
Häufigkeitsverteilungen der maximalen Durchmesser ( $\mu\text{m}$ ; oben) und ihrer logarithmisch transformierten Ruhetonuswerte (%; Mitte) von Arteriolen aus dem Rattencremaster *in vivo*. Die Berechnung der linearen Regression der logarithmierten Ruhetonuswerte gegen den Maximaldurchmesser zeigt eine geringe, aber signifikante Korrelation ( $\log \text{Tonus} = -0,004 \cdot D_{\text{max}} + 1,12$ ;  $r^2 = 0,06$ ; unten).

### 3.3. Dosis-Wirkungsbeziehung verschiedener $K^+_{Ca}$ -Kanal-Blocker

Nach Applikation von ChTX  $3 \mu\text{M}$  (*Versuchsreihe A*) kommt es im Mittel zu einer Abnahme des arteriölen Durchmessers um  $13,3 \pm 2,1 \%$  ( $\text{MW} \pm \text{SEM}$ ; Abb. 6, oben links). Diese Reaktion wurde als Referenz für Dosis-Wirkungsexperimente von TBA bzw. TEA verwendet (*Versuchsreihe B1, B2*). Ansteigende Konzentrationen von TBA führen zu einer zunehmenden Vasokonstriktion:  $0,03 \text{ mM}$ :  $3,8 \pm 1,3 \%$ ;  $0,1 \text{ mM}$ :  $11,0 \pm 2,2 \%$ ;  $0,3 \text{ mM}$ :  $29,9 \pm 2,7 \%$  und  $1 \text{ mM}$ :  $44,0 \pm 2,3 \%$  (Abb. 6, oben rechts). Die Größe der Durchmesserabnahme nach Applikation von TEA ist ebenfalls konzentrationsabhängig (Abb. 6, unten). Jedoch sind zehnfach höhere TEA-Konzentrationen nötig, um mit TBA quantitativ vergleichbare Gefäßeffekte zu erhalten:  $0,3 \text{ mM}$ :  $4,4 \pm 1,2 \%$ ;  $1 \text{ mM}$ :  $15,4 \pm 2,0 \%$ ;  $3 \text{ mM}$ :  $23,7 \pm 2,0 \%$  und  $10 \text{ mM}$ :  $19,1 \pm 2,2 \%$ . Im Folgenden wurden TBA und TEA in den niedrigsten Konzentrationen ( $0,1 \text{ mM}$  bzw.  $1 \text{ mM}$ ) verwendet, die verglichen mit ChTX ähnlich große Vasokonstriktionen induzierten.

### 3.4. Funktionelle Endotheldenudierung

In neun Versuchen (*Versuchsreihe C*) führte die funktionelle Endothelzerstörung unbehandelter Arteriolen mittels Light-Dye-Technik zu einer Vasokonstriktion von  $16,4 \pm 3,9 \%$  ( $\text{MW} \pm \text{SEM}$ ), während die zusätzliche ACh-Applikation eine Konstriktion von  $29,7 \pm 5,8 \%$  verursachte. In diesen funktionell denudierten Gefäßen induzierte die Superfusion von L-NNA plus INDO bzw. von L-NNA, INDO plus TBA Durchmesseränderungen von  $-0,8 \pm 1,4 \%$  bzw.  $0,3 \pm 3,1 \%$ , die statistisch nicht signifikant waren. Die Gabe der endothelunabhängigen Dilatator Papaverin, Adenosin und Nitroprussid-Natrium führte zu einer Vasodilatation von  $26,6 \pm 6,9 \%$ , die eine intakte Funktion des glatten Gefäßmuskels der denudierten Gefäßsegmente anzeigte.



**Abbildung 6:**

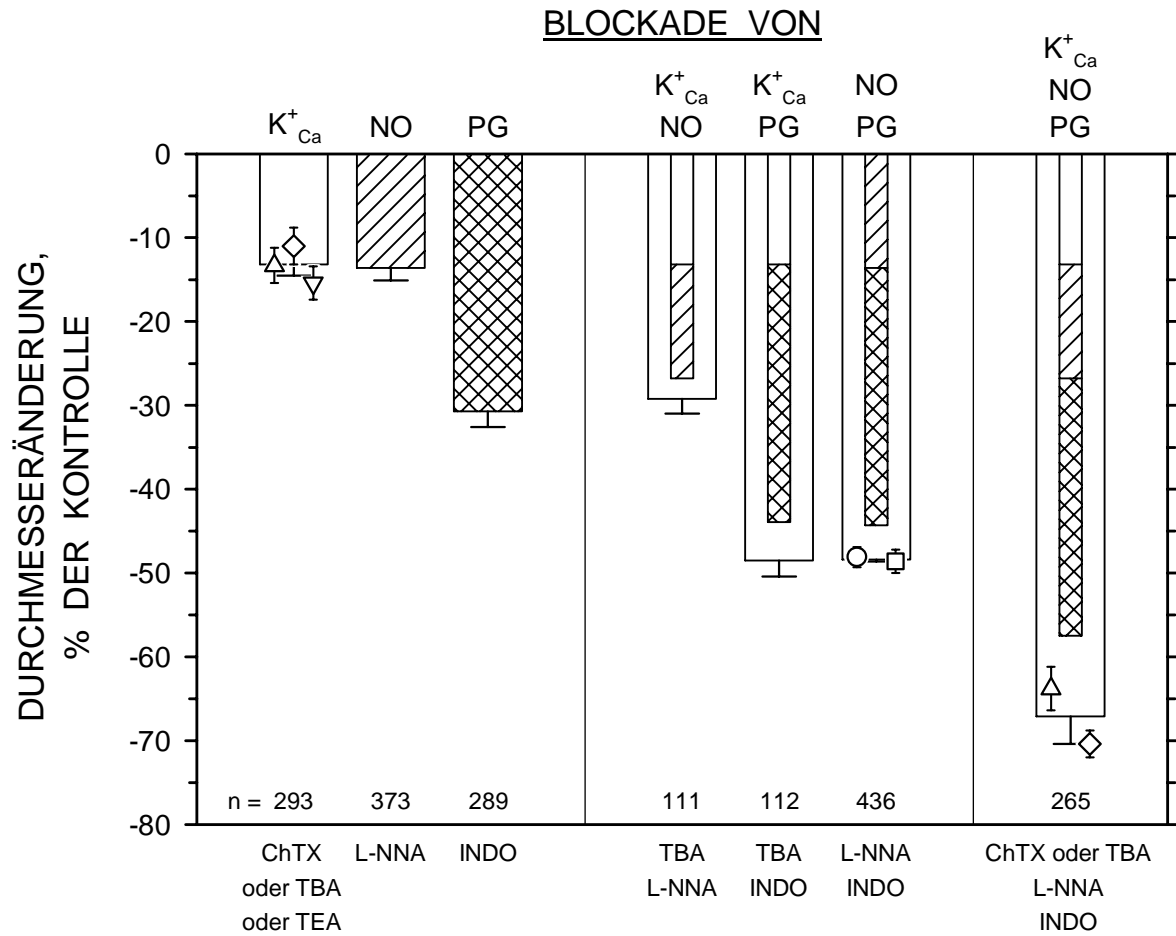
Mittlere Durchmesseränderung ( $\pm$  SEM) in % des Kontrolldurchmessers nach Hemmung der  $K^+_{Ca}$ -Kanäle mit verschiedenen Blockern. ChTX wurde in einer Konzentration von 3  $\mu$ M lokal appliziert (n=53; oben links). In weiteren Versuchsserien wurden ansteigende Konzentrationen von TBA (0,03 / 0,1 / 0,3 und 1 mM; n=106; oben rechts) and TEA (0,3 / 1 / 3 und 10 mM; n=134; unten) verabreicht. \* p<0,05 vs. unbehandelte Kontrolle; # p<0,05 vs. vorhergehende Blockerkonzentration; + p<0,05 vs. ChTX. Die schwarzen Balken kennzeichnen die im Folgenden verwendeten TBA- bzw. TEA-Konzentrationen, die zu ähnlich großen Vasokonstriktionen wie ChTX führen.

### 3.5. Autakoid-Effekte auf den arteriolären Ruhedurchmesser

Abb. 7 faßt die relativen Änderungen des arteriolären Durchmessers nach Hemmung der Effekte der verschiedenen Autakoid-Systeme zusammen. Diese wurden einzeln, kumulativ (*Versuchsreihe D*) bzw. kombiniert (*Versuchsreihe E*) gehemmt. Die Vasokonstriktionen (MW  $\pm$  SEM) nach Blockade der EDHF-Wirkungen mit ChTX, TBA oder TEA betragen  $13,3 \pm 2,1$  %,  $11,0 \pm 2,2$  % bzw.  $15,4 \pm 2,0$  % und im Mittel  $13,2 \pm 1,3$  %. Nach Hemmung des NO-Systems kommt es zu einer Vasokonstriktion von  $13,6 \pm 1,5$  %, die von der nach EDHF-Blockade nicht signifikant verschieden ist. Nach Unterdrückung der PG-Wirkungen imponiert eine erheblich stärkere Abnahme des Durchmessers von  $30,7 \pm 1,9$  %.

Die kombinierte Hemmung des EDHF- und NO-Systems führt zu einer Vasokonstriktion von  $29,2 \pm 1,8$  % und ist damit der Summe der entsprechenden Einzelwirkungen (26,8 %) sehr ähnlich. Die Vasokonstriktion nach kumulativer Blockade von EDHF und PG ist mit  $48,5 \pm 1,9$  % geringfügig höher als die der aufsummierten Einzelwirkungen (43,9 %). Die Durchmesseränderung nach kumulativer Unterdrückung der NO- und PG-Wirkungen ist unabhängig von der Reihenfolge der applizierten Blocker und beträgt  $48,1 \pm 1,2$  % (INDO nach L-NNA) bzw.  $48,6 \pm 1,4$  % (L-NNA nach INDO) im Vergleich zur Addition der Einzelreaktionen von 44,3 %.

Die gleichzeitige Blockade der Gefäßwirkungen aller drei Autakoid-Systeme (EDHF/ $K^+$ <sub>Ca</sub>-Kanäle, NO und PG) mit ChTX oder TBA plus L-NNA plus INDO ergibt eine Durchmesserabnahme von  $67,1 \pm 3,3$  % und ist damit deutlich überadditiv (Summe der Einzelwirkungen: 57,5 %).



**Abbildung 7:**

Arteriöläre Durchmesseränderungen (in % des Kontrolldurchmessers) nach Blockade der endothelialen Autakoide. Linker Abbildungsteil: Mittlere Durchmesseränderungen ( $\pm$  SEM) nach Applikation von ChTX ( $\Delta$ ; n = 53), TBA ( $\diamond$ ; n = 106) bzw. TEA ( $\nabla$ ; n = 134). Die breiten Balken repräsentieren die mittleren Effekte ( $\pm$  SEM) nach Blockade der Autakoid-Stoffwechselwege. Mittlerer Abbildungsteil: Zwei Blocker wurden kumulativ der Superfusionslösung beigemischt (F L-NNA nach INDO; n = 177; G INDO nach L-NNA, n = 259). Die schmalen Stapelbalken entsprechen den aufsummierten Durchmesseränderungen der einzeln blockierten Autakoid-Systeme entsprechend dem linken Abbildungsteil. Rechter Abbildungsteil: Effekt der gleichzeitigen Applikation von ChTX ( $\Delta$ ; n = 28) oder TBA ( $\diamond$ ; n = 237) plus L-NNA und INDO. Alle Durchmesseränderungen sind signifikant von der Kontrolle verschieden.

Die durch sequentielle Blockade von EDHF/K<sub>Ca</sub><sup>+</sup>-Kanäle, NO und PG induzierten Änderungen des Durchmessers sind in Tabelle 7 zusammengestellt. Die Vasokonstriktionen nach Gabe von ChTX, TBA oder TEA und nach INDO waren quantitativ unabhängig von der Vorbehandlung mit L-NNA und/oder INDO (*Versuchsreihe C*). Nur die Vasokonstriktion nach L-NNA war durch die Vorbehandlung mit INDO leicht erhöht.

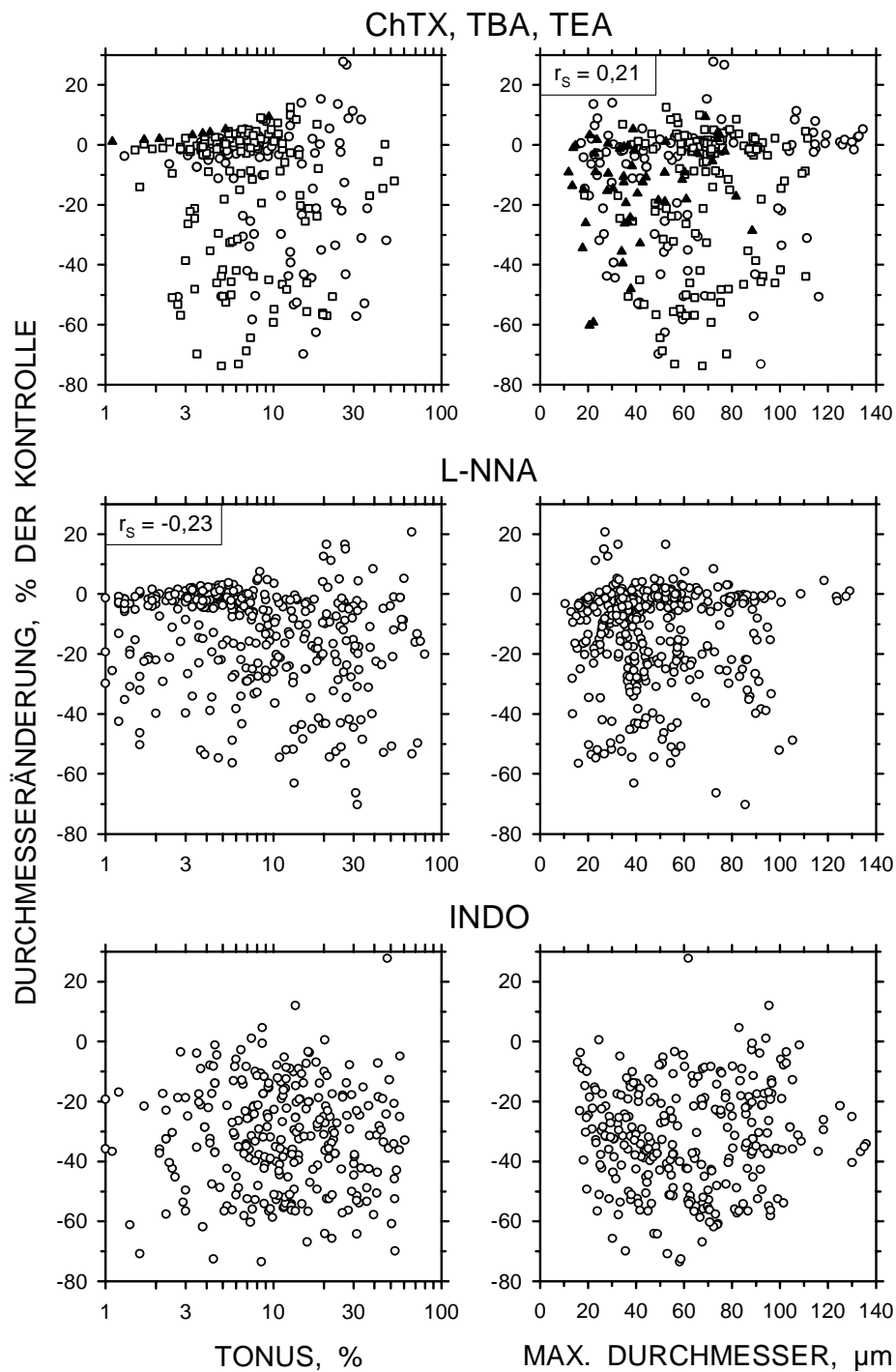
**Tabelle 7:** Vasokonstriktion nach verschiedenen, sequentiell applizierten Autakoid-Blockern

|                          | <i>Durchmesserabnahme (% der Kontrolle) nach Applikation von</i> |          |                 |          |                 |          |
|--------------------------|--|----------|-----------------|----------|-----------------|----------|
|                          | ChTX, TBA oder TEA   |          | L-NNA           |          | INDO            |          |
| <i>Vorbehandlung mit</i> | <i>MW ± SEM</i>  | <i>n</i> | <i>MW ± SEM</i> | <i>n</i> | <i>MW ± SEM</i> | <i>n</i> |
| —                        | 13,2 ± 1,3   | 293      | 13,6 ± 1,5      | 373      | 30,7 ± 1,9      | 289      |
| L-NNA                    | 18,8 ± 1,7   | 111      |                 |          | 34,0 ± 1,3      | 259      |
| INDO                     | 15,9 ± 1,1   | 112      | 19,8 ± 1,4*     | 177      |                 |          |
| L-NNA und INDO           | 17,7 ± 1,1   | 242      |                 |          |                 |          |

\* p<0,05 vs. Blockade ohne Vorbehandlung

Mögliche Abhängigkeiten der Durchmesseränderungen nach Applikation der blockierenden Substanzen (ChTX, TBA, TEA, L-NNA bzw. INDO) einerseits vom arteriolären Ruhetonus (Abb. 8, links) und andererseits vom maximalen Gefäßdurchmesser (Abb. 8, rechts) wurden mit dem Rangkorrelationstest berechnet. Mit Ausnahme schwacher Korrelationen zwischen der Durchmesseränderung nach Gabe von L-NNA und dem Tonus ( $r_s = -0,23$ ) bzw. zwischen den Reaktionen der K<sub>Ca</sub><sup>+</sup>-Kanal-Blocker und dem maximalen Durchmesser ( $r_s = 0,21$ ) wurden keine signifikanten Abhängigkeiten gefunden.

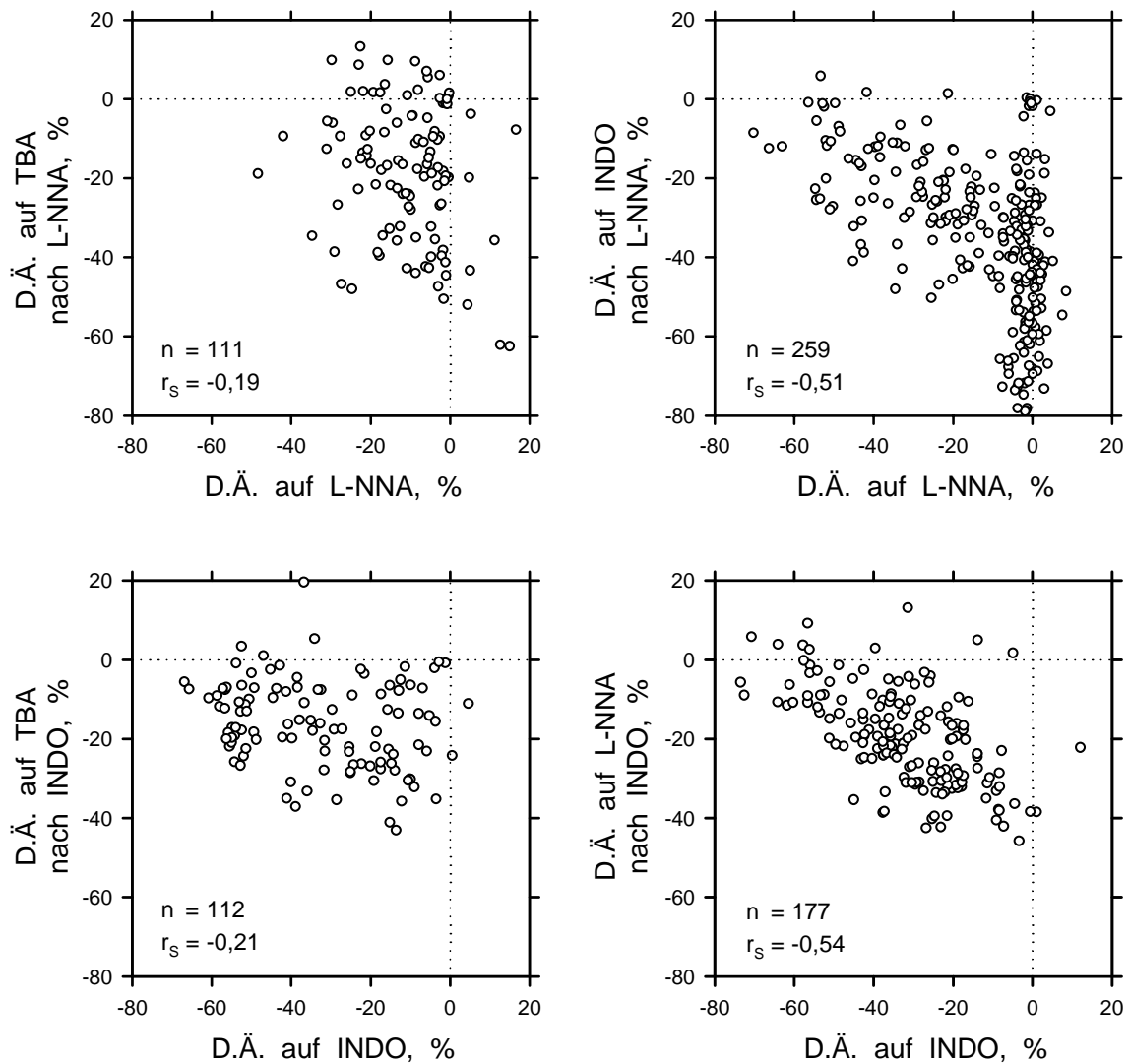
Weiterhin wurden Beziehungen zwischen den Gefäßreaktionen nach konsekutiver Blockade zweier Autakoid-Systeme geprüft (Abb. 9). Für alle getesteten Reihenfolgen ergaben sich signifikante inverse Korrelationen (TBA nach L-NNA:  $r_s = -0,19$ ; TBA nach INDO:  $r_s = -0,21$ ; INDO nach L-NNA:  $r_s = -0,51$ ; L-NNA nach INDO:  $r_s = -0,54$ ).



**Abbildung 8:**

Verteilungen der Durchmesseränderungen (in % des Kontrolldurchmessers) nach Superfusion verschiedener Autakoid-Blocker (ChTX: n = 53; TBA: n = 106; TEA: n = 134; L-NNA: n = 373; INDO: n = 289) relativ zum Ruhetonus (%) bzw. Maximaldurchmesser (μm) der untersuchten Arteriolen. Die Durchmesseränderungen induziert durch ChTX (▲), TBA (□) bzw. TEA (○) sind gruppiert (obere Teilabbildungen).





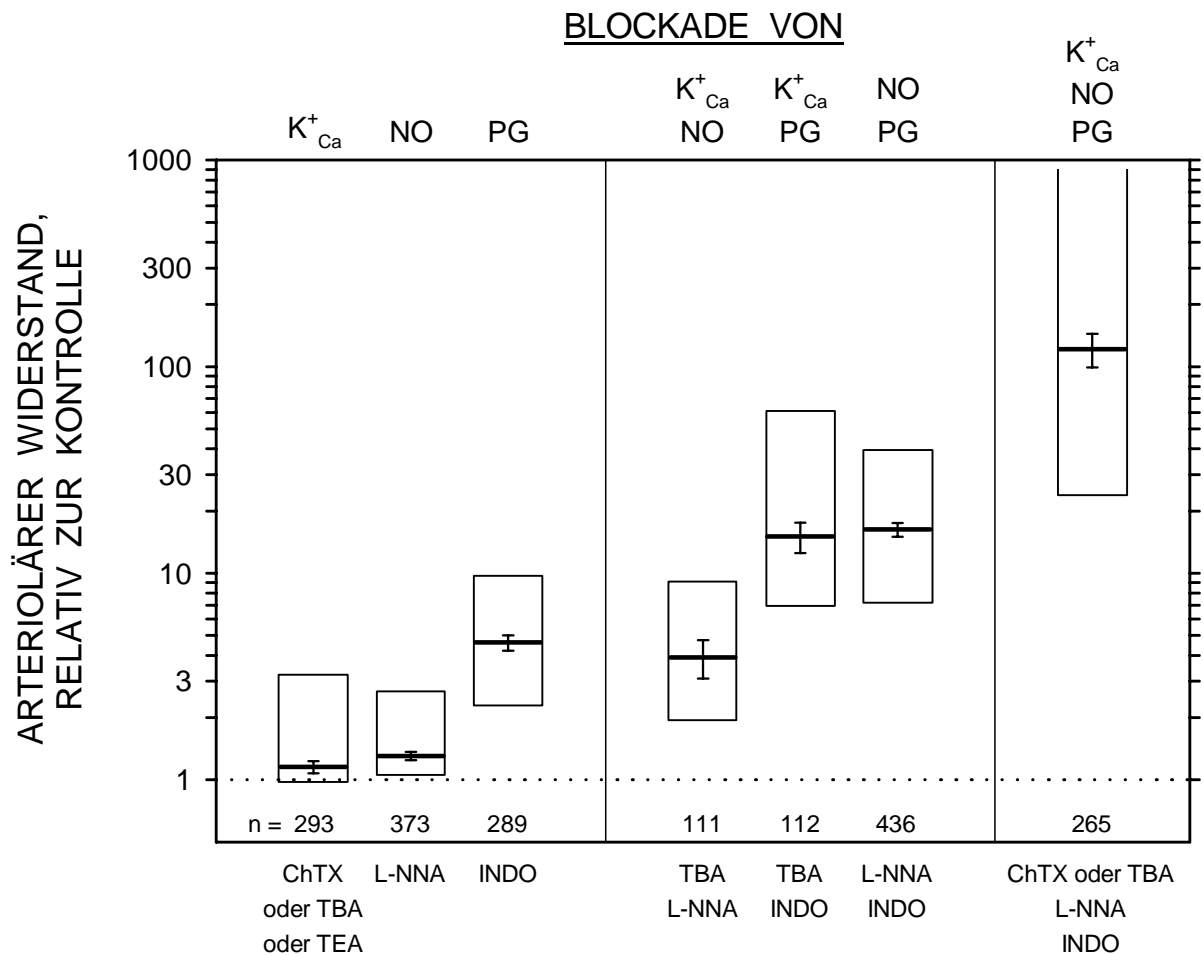
**Abbildung 9:**

Beziehung der Durchmesseränderungen (D.Ä.; % des Kontrolldurchmessers) einzelner Gefäßsegmente nach kumulativer Applikation zweier Autakoid-Blocker. Der Rangkorrelationstest ( $r_s$ ) ist signifikant für alle getesteten Substanzkombinationen.

Nach Applikation von L-NNA oder von ChTX, TBA bzw. TEA ohne Vorbehandlung zeigte fast die Hälfte der Arteriolen nur eine geringe Durchmesseränderung von  $\pm 5\%$  des Kontrolldurchmessers ('Non-Responders'; Abb. 8 und 9). Im Gegensatz hierzu waren nur wenige nicht-reagierende Gefäße nach Gabe von INDO auffällig. Das Auftreten von 'Non-Responders' nach Gabe von TBA oder L-NNA wurde aber durch die Vorbehandlung mit INDO oder L-NNA nahezu aufgehoben (Abb. 9).

### 3.6. Beeinflussung des arteriölen Strömungswiderstandes durch Autakoid-Effekte

Der errechnete arteriöle Strömungswiderstand nach Blockade der Autakoid-Wirkungen ist in Abb. 10 gezeigt. Der Widerstand beträgt nach Blockade von EDHF 1,15 sowie von NO 1,3 des Kontrollwertes, das entspricht einer Widerstandserhöhung von 15 % bzw. 30 %. Eine sehr deutliche Erhöhung des relativen Widerstandes von 4,6 (Widerstandserhöhung 360 %) ergibt sich nach Unterdrückung der PG-Wirkungen. Bei kombinierter Blockade der EDHF- und NO-Wirkungen beträgt der relative Widerstand 3,9. Der relative Widerstand ist nach Blockade von PG und EDHF sogar auf 15,0 bzw. von PG und NO auf 16,2 erhöht. Die Vasokonstriktion nach gemeinsamer Blockade von EDHF, NO und PG führt zu einem relativen Widerstand von 121,0.



**Abbildung 10:**

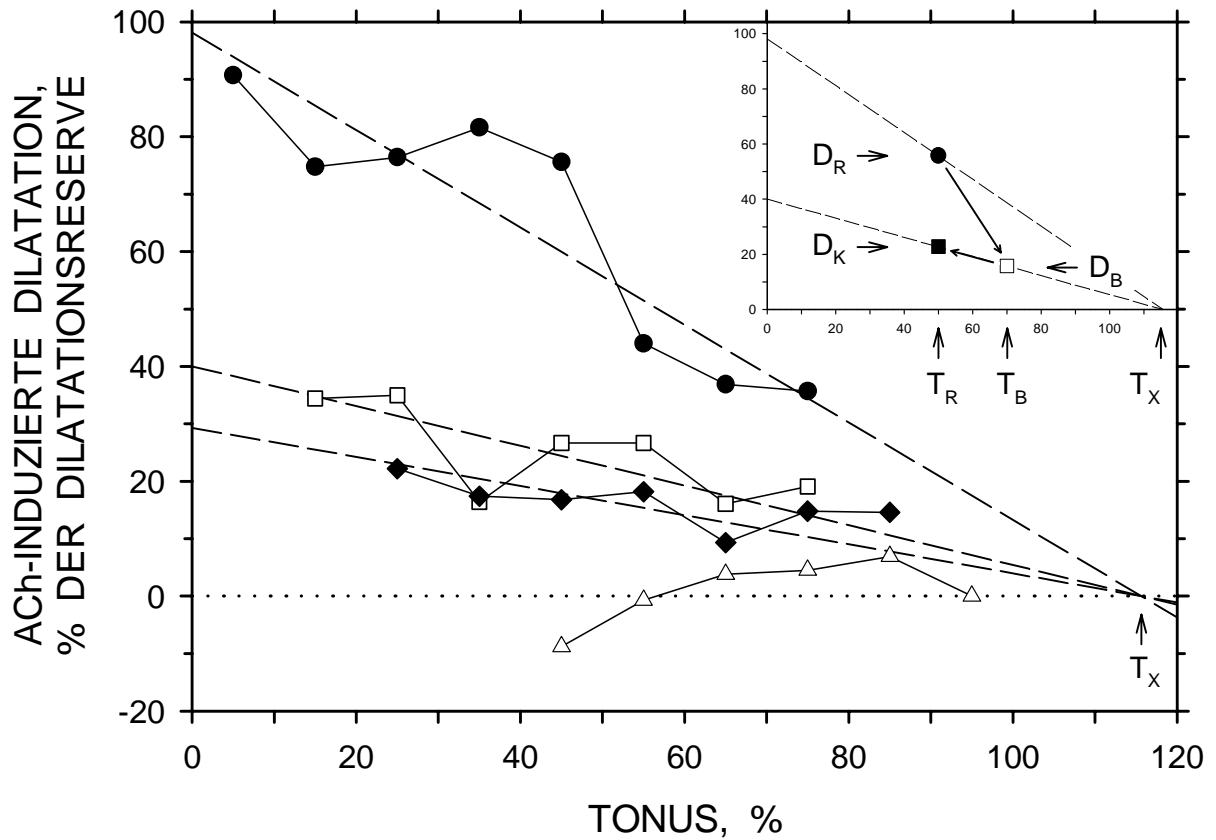
Arteriöler Strömungswiderstand (logarithmische Achsenskalierung; Median  $\pm$  SE, Quartile) nach Blockade der Autakoid-Wirkungen relativ zum Widerstand unter Kontrollbedingungen. Die Widerstandsänderungen sind aus den Durchmesseränderungen der Abb. 9 berechnet.

### 3.7. Anteil der einzelnen Autakoid-Systeme an der ACh-induzierten Vasodilatation

Nach der Stimulation des Endothels mit ACh zeigten die Cremaster-Arteriolen eine starke Vasodilatation. Der Median der dilatatorischen Antwort von  $n = 1177$  Gefäßen betrug 82,3 % der Dilatationsreserve (Quartile 55,2 % und 100 %; Daten nicht gezeigt). Die ACh-induzierte Dilatation war signifikant invers mit dem Ruhetonus korreliert ( $r_s = -0,38$ ). Deshalb wurden die beobachteten Gefäßreaktionen für den, wenn auch nur geringen, Tonuseinfluß korrigiert, um die Effekte nach Applikation von Autakoid-Blockern quantitativ vergleichen zu können.

Für die Tonuskorrektur wurden die Werte der ACh-induzierten Dilatation für die einzelnen Versuchsbedingungen (Kontrolle bzw. nach Blockerbehandlung) in Tonusintervalle von 10 % gruppiert und gemittelt. Diese Werte dienten der Berechnung linearer Regressionen (Abb. 11). Von den Regressionsgeraden, deren Bestimmtheitsmaß  $r^2$  größer als 0,05 war, wurde der Mittelwert ihrer X-Achsenabschnitte ( $T_x$ ) berechnet. Hieraus wurde mit Hilfe des Strahlensatzes für die einzelnen Datenpunkte die tonuskorrigierte Dilatation ermittelt (Abb. 11, eingefügte Abbildung): Von jedem Gefäß war der Ruhetonus ( $T_R$ ) und die ACh-induzierte Vasodilatation unter Kontrollbedingungen, hier als "Referenz-Dilatation" ( $D_R$ ) bezeichnet, bekannt. Durch die Blockade eines oder mehrerer Autakoid-Systeme stieg der Tonus auf den Wert  $T_B$  an, und nach Applikation von ACh wurde die Dilatation  $D_B$  gemessen. Aus diesem Wert wurde durch Extrapolieren von  $T_x$  auf den Ruhetonus ( $T_R$ ) die "tonuskorrigierte Dilatation" ( $D_K$ ) ermittelt.

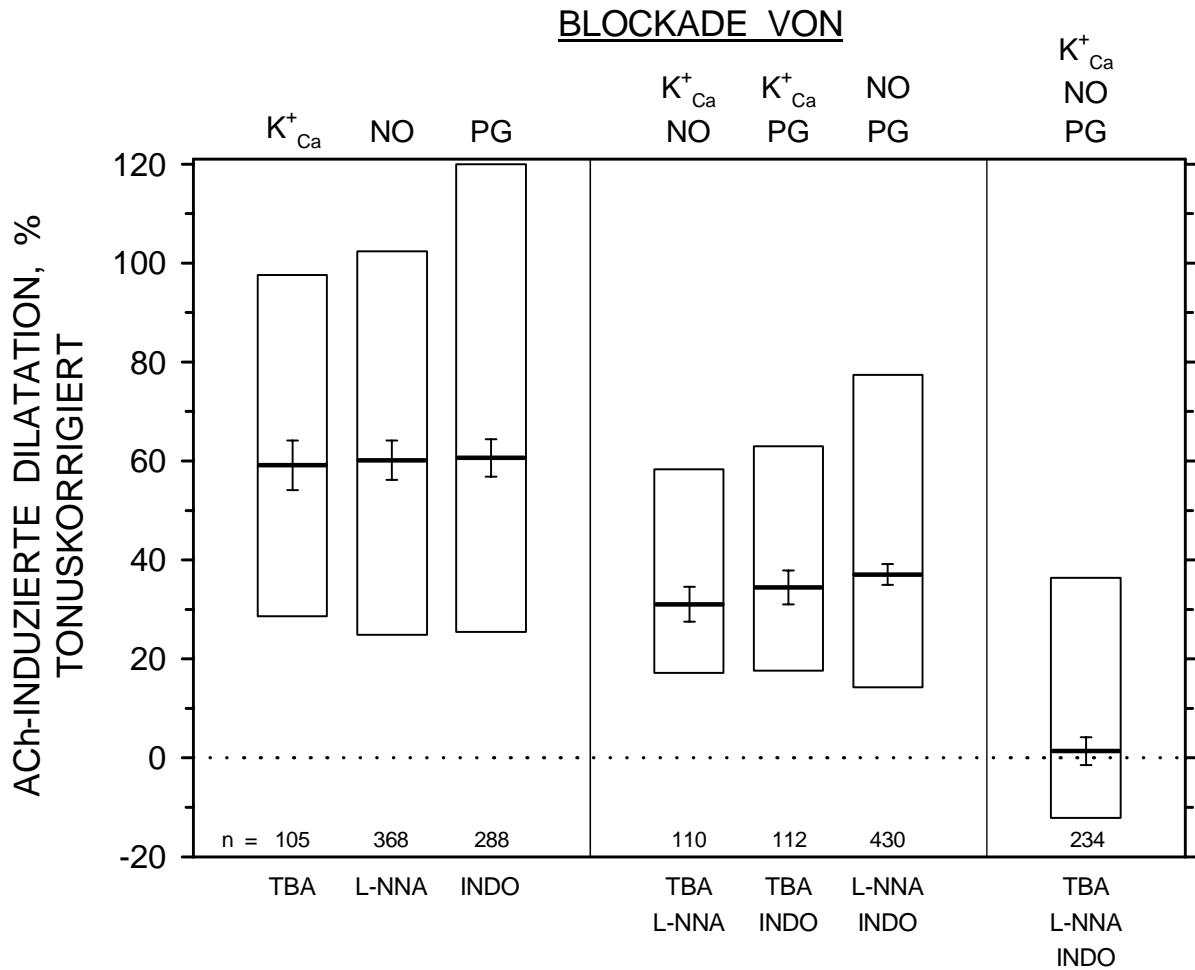
In Abb. 12 und Tabelle 8 (linke Spalte) sind die tonuskorrigierten ACh-induzierten Dilatationen nach Blockade verschiedener Autakoid-Systeme in Prozent der ACh-Dilatation vor Blockade angegeben (Median  $\pm$  SE). Nach Blockade der  $K^+_{Ca}$ -Kanäle mit TBA ist die ACh-Dilatation auf  $59,1 \pm 5,0$  % der Kontrolle verringert. Vergleichbare Reduktionen wurden nach Blockade der Produktion von NO mit L-NNA ( $60,1 \pm 4,0$  %) bzw. von PG mit INDO ( $60,6 \pm 3,8$  %) gesehen (Mediane nicht signifikant verschieden). Die kombinierte Blockade von EDHF/NO, EDHF/PG und NO/PG reduzierte die ACh-Dilatation auf  $31,0 \pm 3,5$  %,  $34,4 \pm 3,4$  % bzw.  $37,0 \pm 2,1$  %. Diese Dilatationen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, aber von den Effekten nach Blockade einzelner Autakoid-Systeme. Die kombinierte Blockade von  $K^+_{Ca}$ -Kanälen (EDHF), NO und PG unterdrückt komplett die ACh-induzierte Dilatation ( $1,3 \pm 2,8$  %; nicht signifikant).



**Abbildung 11:**

ACh-induzierte Vasodilatationen (in % der maximal möglichen Dilatation) der Arteriolen unter Kontrollbedingungen (●) und für ausgewählte Autakoid-Blockaden (□ L-NNA; ◆ L-NNA, INDO; △ L-NNA, INDO, TBA). Die Daten wurden für den Tonus gruppiert (Intervallbreite 10%). Für jede Gruppe wurden aus den Mittelwerten der Intervalle lineare Regressionen berechnet und der gemittelte X-Achsenabschnitt bestimmt ( $T_X = 115,6 \%$ ).

Eingefügte Abbildung: Die ACh-induzierten Vasodilatationen nach Autakoid-Blockade wurden entsprechend dem Kontrolltonus vor Blockade korrigiert. Die Referenzdilatation ( $D_R$ ) gehört zum Ruhetonus unter Kontrollbedingungen ( $T_R$ ;  $D_R$  markiert die ACh-induzierte Dilatation unter Kontrollbedingungen). Nach Blockade eines Autakoid-Stoffwechselweges (hier für NO gezeigt) steigt der Tonus auf den Wert  $T_B$  mit der zugehörigen ACh-induzierten Dilatation  $D_B$  an. Das Extrapolieren zu  $T_R$  ergibt die Dilatation ( $D_K$ ), die für die Tonusänderung infolge der Autakoid-Blockade korrigiert ist.



**Abbildung 12:**

Inhibitorische Effekte der Autakoid-Blockade auf die tonuskorrigierte ACh-induzierte Vasodilatation in Prozent der entsprechenden Dilatation ohne Blockade (Median  $\pm$  SE, Quartile). Nach der kombinierten Blockade von K<sup>+</sup><sub>Ca</sub>-Kanälen (EDHF), NO und PG ist die ACh-induzierte Dilatation nicht mehr signifikant.

Die Tabelle 8 zeigt, daß die für den Tonus nicht korrigierten ACh-Dilatationen nach Autakoid-Blockade im Mittel nur ungefähr 50 % der korrigierten Werte betragen. Ohne diese Korrektur würden also ACh-induzierte Vasodilatationen falsch niedrig bestimmt.

**Tabelle 8:** Vergleich der für den Tonus korrigierten und nichtkorrigierten ACh-induzierten Vasodilatation nach Autakoid-Blockade

|  |          | <i>ACh-induzierte Vasodilatation<br/>nach Blockade der Autakoid-Systeme<br/>(% der Dilatationsreserve)</i> |           |                       |           |
|--|----------|--|-----------|-----------------------|-----------|
|  |          | tonuskorrigiert  |           | nicht-tonuskorrigiert |           |
| <i>Blockade von</i>                        | <i>n</i> | <i>Median</i>  | <i>SE</i> | <i>Median</i>         | <i>SE</i> |
| EDHF/K <sup>+</sup> <sub>Ca</sub>          | 105      | 59,1   | 5,0       | 32,3                  | 4,4       |
| NO   | 368      | 60,1   | 4,0       | 34,4                  | 2,0       |
| PG   | 288      | 60,6   | 3,8       | 31,1                  | 3,0       |
| EDHF/K <sup>+</sup> <sub>Ca</sub> , NO     | 110      | 31,0   | 3,5       | 14,4                  | 1,4       |
| EDHF/K <sup>+</sup> <sub>Ca</sub> , PG     | 112      | 34,4   | 3,4       | 13,8                  | 2,2       |
| NO, PG                                     | 430      | 37,0   | 2,1       | 15,3                  | 1,0       |
| EDHF/K <sup>+</sup> <sub>Ca</sub> , NO, PG | 234      | 1,3  | 2,8       | 0,8                   | 1,0       |

### 3.8. Blockade des alternativen EDHF-Stoffwechselweges mit Ba<sup>2+</sup> und Ouabain

In *Versuchsreihe F* betrug die Vasokonstriktion nach Applikation von Ba<sup>2+</sup> und Ouabain in Kombination mit L-NNA und INDO  $59,9 \pm 2,4$  % (MW  $\pm$  SEM). Die ACh-induzierte Vasodilatation war nach Applikation von L-NNA und INDO auf  $32,2 \pm 3,5$  % der Dilatationsreserve (Median  $\pm$  SE) vermindert, änderte sich aber nicht signifikant nach zusätzlicher Gabe von Ba<sup>2+</sup> plus Ouabain ( $39,5 \pm 3,8$  %).