

4. DISKUSSION

Der auf K^+_{Ca} -Kanäle wirkende endothelabhängige hyperpolarisierende Faktor (EDHF) scheint in der physiologischen Regulation des glatten Gefäßmuskeltonus zusammen mit Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandinen (PG) eine Rolle zu spielen.⁴¹ Während die tonusmodulierenden Effekte von NO und PG in der Literatur gut dokumentiert sind,^{17,18,36,45,47-49} liegen nur sehr wenige detaillierte Informationen über EDHF-Effekte in Widerstandsgefäßen im lebenden Gewebe vor. Außerdem ist bisher unklar, ob EDHF kontinuierlich vom Endothel freigesetzt wird und dadurch zur Modulation des arteriölen Ruhetonus beiträgt. Deshalb sollte die vorliegende Studie kohärente, quantitative Daten über den Einfluß von EDHF via K^+_{Ca} -Kanäle, NO und PG auf den Ruhetonus und auf die ACh-induzierte Vasodilatation *in vivo* liefern.

Die Mehrzahl der Studien über Autakoide wurden in Endothelzellen oder isolierten Gefäßen durchgeführt. Solche *in-vitro*-Modelle sind besonders zur Erforschung molekularer Mechanismen geeignet, weil einzelne Parameter gut kontrollier- bzw. standardisierbar sind. Zellkulturen bieten sehr gute Möglichkeiten zur Untersuchung intrazellulärer Abläufe, z.B. der Synthese der Autakoide und der durch sie angestoßenen Signaltransduktionskaskaden. An isolierten Gefäßen können im Organbad bei kontrolliertem transmuralen Druck und kontrollierter Strömung tonusmodulierende Einflüsse untersucht werden. Ein großer Nachteil ist jedoch, daß die Gefäße durch die Entnahme aus dem Gewebe in vielen Aspekten alteriert werden. Sie verlieren z.B. ihren Ruhetonus, da nervale, metabolische und hämodynamische Einflüsse (z.B. Pulsatilität des intravasalen Drucks) nicht mehr tonisierend wirken. Außerdem wird durch verschiedene Mechanismen, z.B. das elektrische Verletzungspotential an den Schnitt-rändern der Gefäße, eine Vasodilatation induziert. Deshalb müssen isolierte Gefäße im allgemeinen durch die Applikation von Vasokonstriktoren (z.B. Noradrenalin) präkonstringiert werden. Auch wenn eine Tonisierung nur durch den transmuralen Druck erreicht werden kann, entspricht dieser artifiziell geschaffene Tonus nicht der realen Situation *in vivo*. Mit *in-vitro*-Modellen ist es also unmöglich, die physiologische Bedeutung z.B. tonusmodulierender Effekte von EDHF und anderen Autakoiden auf den arteriölen Ruhetonus quantitativ zu ermitteln. Um derartige quantitative Daten zu liefern, die zur Einschätzung der physiologischen Relevanz tonusmodulierender Mechanismen Voraussetzung sind, wurden alle Experimente dieser Studie im intakten Organismus durchgeführt.

Von anderen Untersuchern wurde gefordert, die vaskulären Effekte eines einzelnen Autakoid-Systems nur bei bestehender Blockade der anderen Autakoide zu untersuchen.⁵⁰ Dadurch sollen mögliche Interaktionen zwischen den Stoffwechselwegen verhindert werden, insbesondere die direkte Aktivierung von K_{Ca}^+ -Kanälen durch NO.⁵¹ Um die Physiologie und Pathophysiologie der Durchblutungsregulation über endotheliale Mediatoren zu verstehen, müssen jedoch die Gefäßeffekte eines einzelnen Autakoid-Systems auch unter Berücksichtigung der Einflüsse anderer Autakoid-Stoffwechselwege quantifiziert werden, damit die funktionelle Relevanz möglicher Interaktionen *in vivo* geklärt wird. Die vorliegende Studie untersucht die Einflüsse von EDHF via K_{Ca}^+ -Kanäle, NO und PG auf den arteriolären Tonus durch Blockade der Stoffwechselwege in unterschiedlichen Reihenfolgen. Die große Zahl von Versuchsserien, bedingt durch die verschiedenen Reihenfolgen der applizierten Blocker, und die ausgeprägte biologische Variabilität *in vivo* erfordern große Untersuchungszahlen.

4.1. Methodendiskussion

Die korrekte Analyse des Tonus setzt die präzise Messung des inneren Gefäßdurchmessers voraus. Die erreichbare Präzision hängt zum einen von der optischen Abgrenzbarkeit der Gefäßwandstrukturen und zum anderen von der Genauigkeit der Messung durch den Auswerter ab. Zur Prüfung der Meßgenauigkeit wurden die Videoaufzeichnungen zufällig ausgewählter Versuche von einer Person zweimal im zeitlichen Abstand von mehreren Wochen ausgewertet. Zwischen beiden Messungen ergab sich bei einer Stichprobe von 220 Arteriolen unterschiedlichen Kalibers eine mittlere, nicht signifikante Abweichung von $+5,4 \pm 4,8$ % (MW \pm SD). Dieselben Versuche wurden schließlich von zwei Untersuchern unabhängig voneinander analysiert, wobei einer der beiden keine Routine in der Versuchsauswertung besaß. Die mittlere Abweichung war hier mit $+7,5 \pm 7,7$ % signifikant. Folglich waren für die Güte der Durchmessermessungen außer den optischen Bedingungen der Gefäßwand die Routine des Untersuchers und die Präzision der Auswertung entscheidend.

Die Effekte der Autakoide auf die Mikrozirkulation sollten, wie oben dargestellt, unter möglichst physiologischen Bedingungen untersucht werden, so daß exogen geschädigte Gefäße, z.B. durch die Präparation des Muskels, von der gesamten Auswertung ausgeschlossen wurden. Zum

Nachweis einer Schädigung der Arteriolen wurden in Vorversuchen zwei Kriterien definiert. Erstens durften die Arteriolen bei Versuchsbeginn auf die erste ACh-Applikation nicht mit einer signifikanten Vasokonstriktion ($\geq 10\%$ des Kontrolldurchmessers) reagieren. Diese "paradoxe Acetylcholin-Reaktion", die durch das Überwiegen der vasokonstriktorischen ACh-Wirkung am glatten Gefäßmuskel gegenüber dem endothelial vermittelten vasodilatatorischen Effekt hervorgerufen wird, diente als Indiz für eine Endothelschädigung. Zweitens mußte am Versuchsende unter der kombinierten Applikation der endothelabhängig bzw. -unabhängig wirkenden Vasodilanzien Acetylcholin, Papaverin, Adenosin und Nitroprussid-Natrium der Gefäßdurchmesser mehr als 90 % des im gesamten Versuchsverlauf maximal gemessenen Durchmessers erreichen, um die Funktionstüchtigkeit der Gefäße bis zum Versuchsende zu dokumentieren.

Die pharmakologischen Methoden zur Blockade der Produktion von NO bzw. PG sind für experimentelle Modelle *in vitro*⁵² und *in vivo*^{18,53} gleichermaßen gut etabliert. Die inhibitorischen Effekte von Autakoid-Blockern, die einem lebenden Gewebe verabreicht werden, können durch diffusible oder andere Prozesse abgeschwächt werden. Deshalb müssen die blockierenden Substanzen *in vivo* oft in höheren Konzentrationen als *in vitro* appliziert werden. Die Produktion von NO und PG kann durch die spezifische Hemmung der NO-Synthase mit N^G-Nitro-L-Arginin bzw. der Cyclooxygenase mit Indometacin in den verwendeten Konzentrationen vollständig unterdrückt werden. Dagegen sind die Untersuchungen von EDHF methodisch grundsätzlich problematisch, weil der Syntheseweg und die chemische Struktur von EDHF bisher nicht eindeutig aufgeklärt werden konnten. EDHF soll einer gängigen Theorie entsprechend kurzlebigen vasoaktiven Metaboliten entsprechen, die über Cytochrom P450-Enzyme,^{25,26} wahrscheinlich die Isoform 2C8,²⁷ aus Arachidonsäure synthetisiert werden.

Nach dieser Theorie ist schon die Wahl des Narkotikums für die Versuchstiere problematisch, weil zwischen der Cytochrom P450-abhängigen EDHF-Synthese und den in vielen tierexperimentellen Studien verwendeten Barbituraten spezifische Wechselwirkungen bestehen sollen. Erste Hinweise hierauf gab eine Untersuchung an isolierten Gefäßringen von Kaninchencarotiden, deren EDHF-vermittelte Vasodilatation durch die Narkose der Versuchstiere mit Thiopental und Methohexital abgeschwächt war.²⁰ In weiteren Experimenten an Arteriolen des quergestreiften Hautmuskels bzw. des M. cremaster und an isolierten Gefäßen von Hamstern wurden nach Gabe von Pentobarbital ebenfalls abgeschwächte EDHF-Effekte gezeigt.⁴¹ Deshalb wurden in

der vorliegenden Untersuchung im Hinblick auf die Quantifizierung der mikrovaskulären EDHF-Wirkungen alle Experimente an Tieren durchgeführt, die mit Urethan (Ethyl-Carbamat)⁵⁴ narkotisiert worden waren. Für Urethan sind keine Interaktionen mit dem EDHF-System bekannt.⁴¹ Dies gilt auch für das zusätzlich zur Narkoseeinleitung verabreichte Ketamin. Dieses nicht aus der Barbituratreihe stammende Anästhetikum hat hypnotische Eigenschaften und wurde wegen seiner schnell eintretenden starken Analgesie der Körperhülle⁵⁵ nur für die operativen Manipulationen, insbesondere die Halspräparation der Ratte, verwendet. Die Wirkungen, besonders die sympathomimetischen, des intramuskulär applizierten Ketamins waren wegen der kurzen Halbwertszeit bis zum eigentlichen Versuch abgeklungen, so daß Beeinflussungen des Arteriolentonus ausgeschlossen werden konnten.

Spezifische pharmakologische Inhibitoren der EDHF-Synthese existieren nicht, da EDHF chemisch bisher nicht eindeutig charakterisiert werden konnte. Leider sind die erhältlichen Cytochrom P450-Inhibitoren mit vielen Nebenwirkungen behaftet, z.B. Hemmung von K^+_{Ca} -Kanälen⁵⁶ und Abschwächung von Ca^{2+} -Signalen in Endothelzellen.⁵⁷ Jedoch sind EDHF-abhängige Effekte durch Blockade der K^+_{Ca} -Kanäle auf dem glatten Gefäßmuskel mit dem spezifischen Inhibitor Charybdotoxin,³⁸ einem aus dem Gift des Skorpions *Leiurus quinquestratus* isolierten Proteins, quantifiziert worden.⁵⁸ K^+_{Ca} -Kanäle gehören zu den dominierenden Ionenkanälen auf der Zellmembran glatter Gefäßmuskelzellen.⁴⁰ Unter Berücksichtigung von *in-vivo*-Studien⁴¹ wurde ChTX in der hohen Konzentration von 3 μ M angewendet. Dies entspricht der dreißigfachen Konzentration, die in Versuchsreihen an isolierten Gefäßen als wirksam beschrieben wurde,³⁹ bzw. der dreifachen Konzentration, die im Hamstercremaster *in vivo* verwendet wurde.⁴¹

Da ChTX nicht in den großen Mengen, die für eine kontinuierliche Superfusion in Experimenten *in vivo* benötigt werden, zur Verfügung stand, wurden weitere Versuchsserien mit den nicht-selektiven K^+ -Kanal-Blockern TBA und TEA durchgeführt. Die meisten in der Literatur angegebenen Konzentrationen für diese Tetraalkylammonium-Ionen stammen aus Experimenten *in vitro* und sind nicht ohne weiteres auf die Situation *in vivo* übertragbar. Außerdem sind für höhere Substanzkonzentrationen Gewebeveränderungen bekannt. In Dosis-Wirkungsexperimenten wurden die vaskulären Effekte von TBA und TEA an der ChTX-induzierten Vasokonstriktion kalibriert (Abb. 6). TBA 0,1 mM⁴³ und TEA 1 mM¹⁹ waren in der vorliegenden Studie

die niedrigsten Konzentrationen, die ähnlich große Gefäßantworten wie ChTX 3 μM hervorriefen. Diese Konzentrationen wurden für alle weiteren Experimente verwendet. TEA soll in Konzentrationen bis zu 1 mM hauptsächlich K^+_{Ca} -Kanäle auf dem arteriellen Gefäßmuskel blockieren.³⁰ Höhere TBA- und TEA-Konzentrationen waren von lichtmikroskopisch nachweisbaren ödematösen Gewebealterationen, unspezifischen Gefäßreaktionen und starker Vasomotion begleitet.

Die verwendeten Blocker könnten möglicherweise mit endothelialen Autakoid-Stoffwechselwegen durch Hemmung endothelialer K^+_{Ca} -Kanäle zusätzlich zur beabsichtigten Blockade der K^+_{Ca} -Kanäle auf dem glatten Gefäßmuskel interferieren. Bolz und Mitarbeiter⁵⁹ konnten jedoch an isolierten Widerstandsarterien des *M. gracilis* des Hamsters nachweisen, daß ChTX (1 μM) nur am glatten Gefäßmuskel wirkt. Außerdem zeigen die vorliegenden Daten *in vivo* keine Änderung der mittleren Gefäßantwort durch Blockade des NO- oder PG-Systems nach Gabe eines K^+_{Ca} -Kanal-Blockers (Tab. 7). Weiterhin wurde untersucht, ob der K^+ -Kanal-Blocker TBA bei fehlender endothelialer Funktion durch Anwendung der Light-dye-Technik^{44,45} den glatten Gefäßmuskel direkt beeinflusst. Eine relevante Änderung des TBA-Effekts wurde aber nicht gefunden. Das deutet darauf hin, daß TBA in der Abwesenheit von EDHF keinen signifikanten Effekt auf den glatten Gefäßmuskeltonus ausübt.

4.2. Arteriöler Ruhetonus

Im *M. cremaster* der Ratte streuten die Ruhetonuswerte intraindividuell stark und waren mit ca. 8 % im Mittel niedrig, d.h. viele Arteriolen waren submaximal dilatiert. Die Häufigkeitsverteilung und der Mittelwert des Ruhetonus (Abb. 5) sind signifikant unterschiedlich zu den Daten aus dem *M. spinotrapezius* der Ratte von Klotz⁶⁰ und Friebel.¹⁸ Die Arteriolen im Spinotrapeziusmuskel mit Durchmessern zwischen 11 und 90 μm ($35,9 \pm 15,2 \mu\text{m}$, MW \pm SD; n = 115) hatten einen mittleren Ruhetonus von $49,5 \pm 19,6 \%$ ($51,1 \pm 2,4 \%$, Median \pm SE). In beiden Studien des Spinotrapezius ergeben sich keine Hinweise auf schwächere Autakoid-Effekte, so daß der signifikant unterschiedliche mittlere Gefäßtonus im Spinotrapezius- und Cremastermuskel durch einen unterschiedlich starken Einfluß sympathisch-adrenerger Nervenfasern mitbedingt sein könnte.

Mit dem Spinotrapeziusmuskel der Ratte vergleichbar hohe Ruhetonuswerte um 55 % wurden von De Wit und Mitarbeitern^{17,61} für den M. cremaster des Hamsters berichtet. Entsprechend der vorliegenden Studie wurden nur reife Tiere untersucht (Hamster 80-160 g) und die Muskelpräparation nach der Methode von Baez³³ in der Modifikation von Hill und Mitarbeitern³⁴ durchgeführt. Sarelius und Mitarbeiter⁶² konnten jedoch im Muster der Muskelfasertypen des M. cremaster von Hamster und Ratte keine Differenzen finden, die unterschiedliche mikrovaskuläre Funktionen erklären könnten.

Ein potentieller Einflußfaktor auf den Ruhetonus einzelner Arteriolen könnte der strukturell determinierte, maximale Gefäßdurchmesser sein. Der Maximaldurchmesser wurde hier als Bezugsgröße für die Berechnung des arteriolen Tonus *in vivo* nach kombinierter Applikation endothelabhängiger und -unabhängiger Vasodilatoren ermittelt. Es zeigte sich eine geringe inverse Korrelation des Ruhetonus mit dem zugehörigen maximalen Gefäßdurchmesser, d.h. kleinere Arteriolen wiesen verglichen mit größeren einen etwas höheren Tonus auf. Eine ähnliche Durchmesserabhängigkeit des Tonus wurde auch für den Hamstercremaster beschrieben.⁶¹

4.3. Effekte von EDHF/ K^+_{Ca} -Kanäle, NO und PG auf den Ruhetonus

Der Ruhedurchmesser von Cremasterarteriolen wurde nach Applikation von ChTX, TBA oder TEA um ungefähr 13 % reduziert (Abb. 7, Tab. 7). Die vorliegende Studie demonstriert also zum ersten Mal, daß EDHF über die Aktivierung von K^+_{Ca} -Kanälen signifikant an der Modulation des Ruhetonus von Arteriolen unter *in-vivo*-Bedingungen bei Erhaltung aller tonusbeeinflussenden Mechanismen beteiligt ist. Außerdem veränderte die Hemmung von NO bzw. PG oder ihre kombinierte Blockade nicht signifikant die durch K^+_{Ca} -Kanäle vermittelten Gefäßreaktionen. Der experimentelle Befund, daß EDHF *in vivo* kontinuierlich freigesetzt wird, scheint von zwei Studien *in vitro* bestätigt zu werden: EDHF spielt bei der schubspannungsinduzierten, endothelabhängigen Relaxation via K^+_{Ca} -Kanäle in Mesenterialarterien der Ratte eine wichtige Rolle,⁶³ und die Synthese von EDHF wird in isolierten Schweinekoronarien durch eine pulsatile Gefäßdehnung erhöht.⁶⁴

Die EDHF-Wirkung nach Applikation von ChTX wurde von De Wit und Mitarbeitern⁴¹ nur nach kombinierter Blockade von NO und PG in einem anderen *in-vivo*-Modell untersucht. Sie beobachteten bei wachen Hamstern durch eine vorher präparierte Rückenhautkammer den quergestreiften Hautmuskel und fanden eine Durchmesserabnahme der Arteriolen von 11 %.

Der Einfluß der K^+_{Ca} -Kanäle auf den arteriolären Ruhedurchmesser war in den vorliegenden Resultaten quantitativ vergleichbar mit dem von NO (Abb. 7, Tabelle 7). Der Effekt von PG war gegenüber NO bzw. EDHF mehr als doppelt so groß. Der PG-Einfluß auf den Ruhetonus von Arteriolen ist im Rattencremaster verglichen mit anderen Modellen *in vivo*⁶¹ oder *in vitro*¹⁶ wesentlich höher. Aber im M. spinotrapezius der Ratte fanden Friebel und Mitarbeiter¹⁸ vergleichbar große PG-Effekte auf den arteriolären Ruhedurchmesser mit Durchmesserabnahmen zwischen 25 % und 40 % nach Applikation von INDO (30 μ M). In einer anderen Studie, die auch im Rattenspinotrapezius mit derselben INDO-Konzentration durchgeführt wurde, zeigte sich eine Vasokonstriktion von 28 %.³⁶

4.4. Additivität und Unabhängigkeit der Gefäßreaktionen von EDHF, NO und PG

Andere Untersucher haben aus experimentellen Ergebnissen gefolgert, daß starke Interaktionen zwischen dem NO- und PG-Stoffwechselweg bestehen, die zu nichtadditiven Reaktionen führen.⁶¹ Außerdem soll NO unter physiologischen Bedingungen die Bildung von EDHF durch Einwirken auf die produktionsbestimmenden Cytochrom P450-abhängigen Enzyme hemmen können.^{65,66} Im Gegensatz sind in der vorliegenden Studie die mittleren Antworten nach Hemmung der drei Autakoid-Systeme additiv: Die Effekte kombinierter Blockaden waren der Summe der Effekte nach individueller Autakoid-Blockade ähnlich (Abb. 7, Tab. 7). Jedoch zeigten die Reaktionen individueller Gefäßsegmente auf kumulative Blockade zweier Autakoid-Systeme eine inverse Korrelation, die eine direkte Abhängigkeit der beteiligten Stoffwechselwege vermuten läßt (Abb. 9). Dieser anscheinende Widerspruch wurde mit einem mathematischen Simulationsmodell untersucht. In diesem Modell wurden die Effekte eines hypothetischen zellulären Signals durch eine nichtlineare Transferfunktion in Änderungen des Gefäßdurchmessers überführt (s. Anhang). Die Ergebnisse dieses Verfahrens (Abb. 13) können die vorliegenden experimentellen Befunde einschließlich der beobachteten Verteilungen der Durchmesser-

änderungen nach Gabe verschiedener blockierender Substanzen und ihrer Kombinationen erklären, ohne daß direkte Verbindungen zwischen den beteiligten zellulären Stoffwechselwegen angenommen werden müssen.

Die kombinierte Hemmung der basalen Aktivität aller drei endothelialen Autakoid-Systeme induzierte eine mittlere Durchmesserabnahme von 67 % entsprechend einem über hundertfachen Anstieg des arteriolen Strömungswiderstandes. Bemerkenswert ist, daß diese Durchmesser- bzw. Widerstandsänderungen in einer Situation *in situ* auftreten, in der alle regulierenden Mechanismen (nerval, humoral, myogen etc.) aktiv sind. Die vorliegenden Daten verdeutlichen also, daß die kontinuierliche Freisetzung von EDHF (über eine Aktivierung von K^+_{Ca} -Kanälen), NO und PG entscheidend für die Aufrechterhaltung eines niedrigen arteriolen Tonus und Strömungswiderstandes im Skelettmuskel *in vivo* ist. Daher kann eine endotheliale Dysfunktion,⁶⁷ z.B. bei arterieller Hypertonie, Arteriosklerose, Hypercholesterinämie oder Diabetes mellitus, zu einem drastischen Anstieg des arteriolen Strömungswiderstandes führen, insbesondere wenn mehr als ein Autakoid-System betroffen ist. Signifikante Änderungen des arteriolen Strömungswiderstandes größerer Gefäßprovinzen können sich hämodynamisch auf den Gesamtkreislauf auswirken, da die terminalen Arterien und Arteriolen etwa 50 % des gesamten peripheren Widerstandes ausmachen.⁶⁸

4.5. Acetylcholin-induzierte Vasodilatation

In der vorliegenden Arbeit führte die lokale Applikation von ACh bei Arteriolen ohne pharmakologische Vorbehandlung zur Vasodilatation, die im Mittel ca. 95 % des maximalen Gefäßdurchmessers nach kombinierter Applikation der endothelunabhängigen Vasodilatoren Papaverin, Adenosin und Nitroprussid-Natrium erreichte. Diese nahezu maximale Dilatation wurde auch von Klotz und Mitarbeitern⁶⁰ nach Applikation von ACh in der Konzentration von 10 μ M in Arteriolen des M. spinotrapezius gefunden und scheint auch für das Gefäßbett des menschlichen Unterarms typisch zu sein.⁶⁹

Experimentelle Daten *in vitro* zeigen, daß nach Blockade von NO und PG die ACh-induzierte Vasodilatation nicht komplett verschwunden ist.^{19,20,41,58} Dieser NO/PG-unabhängige Dilatations-

anteil soll durch EDHF via Aktivierung von K^+_{Ca} -Kanälen vermittelt werden. In den vorliegenden Experimenten *in vivo* waren der Anteil von EDHF, NO und PG an der ACh-induzierten Vasodilatation ähnlich groß (Abb. 12). Der NO/PG-unabhängige Dilatationsanteil war durch Applikation von TBA komplett unterdrückt. De Wit und Mitarbeiter⁴¹ haben über ähnliche Ergebnisse aus Arteriolen des Hamstercremasters nach ChTX-Gabe berichtet. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, daß EDHF via Aktivierung von K^+_{Ca} -Kanälen für den Teil der ACh-induzierten Vasodilatation verantwortlich ist, der nicht von NO und PG vermittelt wird. Im Gegensatz zu anderen Geweben⁵⁸ korrelierte in den hier vorgelegten Daten aus dem M. cremaster der Ratte die EDHF-induzierte, über K^+_{Ca} -Kanäle vermittelte Vasodilatation nicht relevant mit der Gefäßgröße.

4.6. Struktur, Stoffwechselweg und Wirkung von EDHF

In den durchgeführten Experimenten wurde auf Grund der weitverbreiteten Theorie davon ausgegangen, daß EDHF eine diffusible Substanz ist, die auf K^+_{Ca} -Kanäle im glatten Gefäßmuskel wirkt (Abb. 1). Die Diskussionen zur chemischen Struktur und auch zur Wirkungsweise von EDHF sind jedoch immer noch nicht abgeschlossen. Verschiedene Untersucher halten EDHF z.B. nicht für einen transferierbaren Mediator. Yamamoto und Mitarbeiter⁷⁰ beobachteten in Arteriolen des Meerschweinchenmesenteriums, daß die Applikation von ACh zur Hyperpolarisation von Endothelzellen durch Aktivierung ChTX-sensitiver K^+_{Ca} -Kanäle führte. Diese Hyperpolarisation scheint über myoendotheliale Gap Junctions⁷¹ auf den glatten Gefäßmuskel fortgeleitet zu werden.

Sehr kontrovers wird zur Zeit auch eine andere Hypothese zur Identität von EDHF diskutiert. Edwards und Mitarbeiter³¹ applizierten ACh bei isolierten Leberarterien von Ratten und halten das vom Endothel über ChTX- und Apamin-sensitive K^+ -Kanäle freigesetzte Kalium für EDHF. Die K^+ -Ionen sollen eine Hyperpolarisation durch die Aktivierung Barium-sensitiver K^+_{IR} -Kanäle und der Na^+/K^+ -ATPase mit Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen auslösen (Abb. 1). Im Gegensatz hierzu zeigten Quignard und Mitarbeiter⁷² in isolierten Meerschweinchencarotiden und in Schweinekoronarien, daß Barium-sensitive K^+_{IR} -Kanäle und die Na^+/K^+ -ATPase nicht an der EDHF-vermittelten Hyperpolarisation beteiligt sind. Vanhoutte⁷³ bezweifelt außerdem, ob

Endothelzellen überhaupt genügend Kaliumionen freisetzen können, die auch durch die existierenden Diffusionsbarrieren wie Basalmembran und elastische Faserschicht zum Gefäßmuskel gelangen. Die Daten von Zygmunt und Högestätt,⁷⁴ die wie Edwards ihre Experimente an isolierten Leberarterien der Ratte durchführten, unterstützen die Ergebnisse der hier vorgelegten *in-vivo*-Studie, daß nämlich die ACh-induzierte, NO/PG-unabhängige Dilatation durch die Aktivierung von ChTX- bzw. TBA-sensitiven K_{Ca}^+ -Kanälen vermittelt wird (Abb. 12). Eine relevante Beteiligung der K_{IR} -Kanäle und der Na^+/K^+ -ATPase *in situ* konnte hier nicht nachgewiesen werden.