

Aus der Klinik für Neurologie
Abteilung für Experimentelle Neurologie
der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Das Zusammenspiel von Stickstoffmonoxid und Kaliumkanälen in der zerebrovaskulären Reaktion auf gesteigerte Kaliumkonzentrationen - eine in-vitro Studie

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Von

Elmar Lobsien

aus Bremen

Gutachter:

- 1) Prof Dr. U. Lindauer**
- 2) Prof. Dr. P. Vajkoczy**
- 3) Prof. Dr. Dr. L. Schilling**

Datum der Promotion: 14.06.2009

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente wurden mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 507), der Hermann und Lilly Schilling Stiftung, der Humboldt Universität zu Berlin sowie der GlaxoSmithKline Stiftung gefördert.

Teile dieser Arbeit erschienen in folgenden Publikationen:

1. Originalpublikationen:

Schuh-Hofer S, **Lobsien E**, Brodowsky R, Vogt J, Dreier JP., Klee R, Dirnagl U, Lindauer U

The cerebrovascular response to elevated potassium - role of nitric oxide in the in vitro model of isolated rat middle cerebral arteries
Neuroscience Letters 306 (2001) 61 – 63

2. Abstracts/Vorträge:

Lobsien E, Schuh-Hofer S, Dirnagl U, Lindauer U

Vasodilator application prevents vasoconstriction of the isolated middle cerebral artery to high extraluminal potassium concentrations following nitric oxide synthase inhibition

12th European Students Conference, Charité Berlin, Nov. 2001

3. Abstracts/Poster:

U. Lindauer, **E. Lobsien**, S. Schuh-Hofer, J.P. Dreier, U. Dirnagl

Cerebrovascular reactivity to pathophysiologically enhanced extraluminal potassium
Berlin Neuroscience Forum, Liebenwalde, April 2004

Lobsien E, Schuh-Hofer S, Brodowsky R, Vogt J, Dreier J P., Dirnagl U, Lindauer U
Nitric Oxide prevents vasoconstriction of isolated rat middle cerebral artery to high extraluminal potassium concentrations

31st Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, USA, Nov. 2001

Für Teile dieser Arbeit wurden folgende Preise und Stipendien vergeben:

MLP Future Award “Oral Presentation”, 12th European Students Conference, Berlin, Nov. 2001

Sessiongewinner “Cerebrovascular Disorders”, Chair: Prof. Pluta (NIH), 12th European Students Conference, Berlin, Nov. 2001

Reisestipendium der GlaxoSmithKline Stiftung für das „31st Annual Meeting of the Society for Neuroscience” San Diego, USA, Nov. 2001

Veronika, Bela, Donald, Ursula und Jens gewidmet

„We conclude... chemical products of cerebral metabolism... can cause variations of the calibre of the cerebral vessels”

Roy and Sherrington 1890

“... A number of relevant issues remain unsolved: ... What is the role of the many metabolites... discussed as mediators of [neurovascular] coupling?”

Villringer and Dirnagl 1995

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	9
Abstract	11
1. Einleitung	13
1.1. <i>Physiologie: zerebraler Blutfluss</i>	13
1.1.1. <i>Neurovaskuläre Kopplung</i>	14
1.2. <i>Pathophysiologie: zerebraler Blutfluss</i>	16
1.2.1. <i>Trauma</i>	17
1.2.2. <i>Subarachnoidalblutung</i>	18
1.3. <i>Anatomie zerebraler Arterien</i>	20
1.4. <i>Vasodilatator: NO</i>	21
1.4.1. <i>Der cGMP Weg</i>	22
1.4.2. <i>NO: Modulator neurovaskulärer Kopplung?</i>	23
1.5. <i>Kalium: Mediator neurovaskulärer Kopplung?</i>	25
1.5.1. <i>Kalium: Physiologie und Pathophysiologie</i>	27
1.5.2. <i>Vier Kaliumkanal-Familien</i>	28
1.5.3. <i>Calcium abhängige Kaliumkanäle</i>	29
1.5.4. <i>ATP abhängige Kaliumkanäle</i>	30
1.5.5. <i>Einwärts Gleichrichter Kaliumkanäle</i>	31
1.5.6. <i>Spannungsabhängige Kaliumkanäle</i>	33
1.6. <i>Zusammenfassung</i>	33
1.7. <i>Hypothesen</i>	35
2. Material und Methoden	36
2.1. <i>Vorteile und Nachteile der isolierten MCA</i>	36
2.2. <i>Versuchsaufbau</i>	38
2.3. <i>Angaben zu Pufferzusammensetzung und Lösungsmitteln</i>	43
2.4. <i>Statistik</i>	44
2.5. <i>Herkunft: Geräte, Pharmaka, Tiere</i>	45
2.6. <i>Experimentelles Design</i>	47
3. Ergebnisse	54
3.1. <i>Reaktion auf physiologische und pathophysiologische $[K]_e$</i>	54
3.2. <i>Beteiligung: NO/cGMP</i>	55
3.3. <i>NO: Modulator neurovaskulärer Kopplung</i>	57
3.4. <i>Beteiligung: Kaliumkanal-Familien</i>	60

3.5. Kontroll- und Vehikelversuche	67
4. Diskussion	70
4.1. Kontrollexperimente - Übersicht	70
4.1.1. Das Modell der MCA	70
4.1.2. Gefäßreaktion bei ansteigenden $[K]_e$	71
4.1.3. Lösungsmittel/Kontrollen	72
4.1.4. Zusammenfassung	72
4.2. Beteiligung: NO/cGMP - Übersicht	73
4.2.1. Beteiligung am basalen Tonus	74
4.2.2. Vasodilatation bei pathophysiologischen $[K]_e$	75
4.2.3. NO: Modulator	76
4.2.4. NO unabhängige Vasodilatoren	76
4.2.5. Zusammenfassung	77
4.3. Beteiligung: Kaliumkanal-Familien - Übersicht	78
4.3.1. Beteiligung am basalen Tonus	80
4.3.2. Physiologische $[K]_e$	81
4.3.3. Pathophysiologische $[K]_e$	81
4.3.4. Zusammenfassung	82
4.4. Interpretation und Ausblick	81
4.4.1. Zentrale Ergebnisse	81
4.4.2. Mechanismen der Vasodilatation	83
4.4.3. Relevanz für Cortical Spreading Ischaemia	83
4.4.4. Relevanz für andere Situationen	86
4.4.5. Ausblick	87
Anhang	89
Abkürzungen	89
Literatur	90
Danksagung	100
Lebenslauf	101
Publikationsliste	102
Eidesstattliche Erklärung	105

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: funktionelles MRT</i>	16
<i>Abb. 2: Subarachnoidalblutung</i>	19
<i>Abb. 3: Funktion: NO/cGMP</i>	22
<i>Abb. 4: Mediator/Modulator Konzept</i>	24
<i>Abb. 5: $[K]_e$ in Physiologie und Pathophysiologie</i>	26
<i>Abb. 6: Funktion: K_{ATP} und K_{Ca}</i>	30
<i>Abb. 7: Funktion: K_{IR} und K_V</i>	32
<i>Abb. 8: Vor/Nachteile isolierte MCA</i>	37
<i>Abb. 9: Versuchsaufbau isolierte MCA</i>	39
<i>Abb. 10: Beispiel Reaktion MCA</i>	42
<i>Abb. 11: Versuchsablauf</i>	42
<i>Abb. 12: Experimentelles Design</i>	52/53
<i>Abb. 13: Kaliumreihen Leerversuch</i>	55
<i>Abb. 14: Kaliumreihe unter NOS Inhibition</i>	55
<i>Abb. 15: Kaliumreihe unter sGC Inhibition</i>	56
<i>Abb. 16: Kaliumreihe unter NOS Inhibition und cGMP Gabe</i>	57
<i>Abb. 17: Kaliumreihe unter NOS Inhibition und NO Gabe</i>	58
<i>Abb. 18: Kaliumreihe unter NOS Inhibition und Nimodipin</i>	59
<i>Abb. 19: Inhibition isolierter Kaliumkanalfamilien</i>	60/61
<i>Abb. 20: Kaliumreihe unter $400\mu M$ $BaCl_2$</i>	63
<i>Abb. 21: kombinierte Inhibition K_{ATP} und K_{IR}</i>	64
<i>Abb. 22: kombinierte Inhibition von 3 und 4 Kaliumkanalfamilien</i>	65
<i>Abb. 23: Einfluß von DMSO/Ethanol auf die Gefäßreaktion</i>	67
<i>Abb. 24: Kontrollversuch zur Inhibition von K_{ATP} und K_{Ca}</i>	68

Zusammenfassung

Kalium und Stickstoffmonoxid (NO) werden als mögliche Vermittler neurovaskulärer Kopplung diskutiert. Die extrazelluläre Kaliumkonzentration ($[K]_e$) im Gehirn verändert sich situationsabhängig: Die basale $[K]_e$ liegt bei 3 mM, bei neuronaler Erregung steigt die Konzentration auf 12 mM, in pathophysiologischen Situationen auf > 60 mM. Hierbei verändert sich der zerebrale Blutfluss (z.B. Blutfluss-Anstieg nach neuronaler Erregung).

NO ist ein kurzlebiger Vasodilatator, der von NO Synthasen (NOS) produziert wird. NO ist im Gehirn für die Aufrechterhaltung eines basalen, vaskulären Tonus relevant und spielt eine Rolle als Vasodilatator in verschiedenen Situationen (z.B. permissive Rolle von NO bei der Vermittlung der zerebrovaskulären Reaktion auf Azidose).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von Stickstoffmonoxid und Kaliumkanalfamilien bei der zerebrovaskulären Reaktion auf veränderte Kaliumkonzentrationen untersucht. Experimentelles Modell war die isolierte A. cerebri media der Ratte.

Die Ergebnisse zeigen, dass kumulative Steigerung von $[K]_e$ zu einer Gefäßdilataion in physiologischen Bereichen (20 mM) führt, die bei pathophysiologischen Konzentrationen (80 mM) verschwindet. Bei (unspezifischer) NOS Blockade zeigt sich keine Änderung der Gefäßreaktion auf 12 und 20 mM $[K]_e$, die Reaktion auf > 40 mM $[K]_e$ wird jedoch inhibiert. Dasselbe Ergebnis zeigt sich bei Blockade der löslichen Guanylatcylcase (sGC). Es zeigt sich eine Abhängigkeit der Vasodilatation bei pathohysiologischen $[K]_e$ von NO/zyklischem Guanosin Monophosphat (cGMP). Bei Substitution eines basalen NO Spiegels unter NOS Inhibition kann die Gefäßdilataion bei 40 mM $[K]_e$ wiederhergestellt werden. NO/cGMP hat hier die Rolle eines Modulators. Bei Blockade einzelner Kaliumkanalfamilien zeigt sich nach K_{IR} -Blockade eine Inhibition der Reaktion auf 20 mM $[K]_e$. Die weiteren Gefäßreaktionen bleiben unbeeinflusst. Bei kombinierter Blockade unterschiedlicher Kaliumkanalfamilien zeigt sich bei Blockade von einwärts-Gleichrichter Kaliumkanälen und ATP-abhängigen Kaliumkanälen (K_{IR} und K_{ATP}) bzw. dreifach kombinierter (K_{IR} , K_{ATP} , Calcium-abhängige Kaliumkanäle (K_{Ca})) und vierfach kombinierter (K_{IR} , K_{ATP} , K_{Ca} , Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_V)) Kaliumkanalblockade eine Reduktion der Reaktion auf 40 mM $[K]_e$.

Zusammengefasst zeigt sich ein Wechsel des Mechanismus der Gefäßdilataion auf gesteigerte $[K]_e$ abhängig von der Höhe von $[K]_e$. NO/cGMP ist von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Vasodilatation bei pathophysiologischen $[K]_e$ und spielt dabei die Rolle eines Modulators. Für die Vermittlung der Gefäßreaktion auf physiologische $[K]_e$ spielt NO/cGMP keine erkennbare Rolle. Hier wird die Gefäßdilataion ausschließlich über K_{IR} vermittelt. Die Gefäßreaktion auf 40 mM $[K]_e$ lässt sich nicht durch Inhibition einzelner Kaliumkanalfamilien, jedoch durch kombinierte Inhibition mehrerer Kaliumkanalfamilien vermindern. Dies stellt möglicherweise einen Kompensationsmechanismus in pathophysiologischen Situationen dar. Die Ergebnisse tragen zum Verständnis der Mechanismen der Gefäßdilataion in physiologischen und pathophysiologischen Situationen mit veränderten $[K]_e$ bei. Dies ist von Relevanz für die Pathophysiologie der Cortical Spreading Depression und Cortical Spreading Ischaemia (CSD und CSI), die ein mögliches Korrelat verzögerter Vasospasmen nach Subarachnoidalblutung (SAB) darstellen, sowie für das Verständnis grundlegender Mechanismen neurovaskulärer Kopplung. Des Weiteren bilden diese Ergebnisse die Grundlage für weitere Studien zur Interaktion unterschiedlicher Kaliumkanalfamilien und des NO/cGMP Systems bei erhöhten $[K]_e$, die einen zentralen Mechanismus physiologischer und pathophysiologischer zerebrovaskulärer Reaktionen darzustellen scheint.

Abstract

Nitric Oxide (NO) and Potassium are discussed as important parts of the mechanisms of neurovascular coupling. Cerebral extracellular potassium concentrations $[K]_e$ depend on functional situations in the brain. Basal $[K]_e$ are around 3 mM but $[K]_e$ increases to 12 mM with neuronal activity and above 60mM in pathophysiological situations. This goes together with changes in cerebral bloodflow (Increase with neuronal activity etc.). NO is a shortliving bioradical that is produced by NO synthases (NOS). Vasodilation by NO is essential in many situations in the brain (maintaining basal vascular tone, modulation of cerebrovascular reaction to acidosis etc.).

The experiments presented here addressed the question of the role of NO and potassium channels in the cerebrovascular reaction to increased $[K]_e$. The experiments were performed using the model of the isolated middle cerebral artery.

The results show that increasing $[K]_e$ leads to vasodilation at 20 mM that vanishes at 80 mM. With NOS Inhibitor vasodilation to 20 mM does not change but vasodilation to > 40mM turns into vasoconstriction. The vasodilation by NO can be inhibited by blocking Soluble Guanylate Cyclase (sGC). By substituting a basal NO level during NOS Inhibition the vasodilation at 40 mM is restored. This shows a permissive role of NO in potassium dependent vasodilation at $[K]_e > 40$ mM. Vasodilation at 20mM $[K]_e$ is exclusively mediated via the inward rectifier potassium channel (K_{IR}). At $[K]_e > 40$ mM inhibition of isolated potassium channel families does not reduce vasodilation. However, combined inhibition of potassium channel families leads to a significant reduction of vasodilation at 40 mM.

The results show that the mechanism of vasodilation to increased $[K]_e$ changes depending on the amount of increase in $[K]_e$. While at physiological $[K]_e$ vasodilation is mediated via K_{IR} at pathophysiological $[K]_e$ NO/cGMP related mechanisms play an important role in maintaining vasodilation and different potassium channel families seem to have the ability to compensate for each other.

These findings are important in understanding the mechanisms of potassium related vasoreaction which possibly has a major contribution to vasodilation occurring with neuronal activity and the pathophysiological mechanisms behind clinical and experimental phenomenons like Cortical Spreading Depression/Cortical Spreading Ischaemia (CSD/CSI). It also stresses the need for further studies regarding the

interaction between NO and potassium channels at high $[K]_e$ to further understand their role in maintaining blood flow in pathophysiological situations.

Keywords:

Cerebral blood flow, isolated artery, vasodilation, potassium channels, NO, cGMP

1. Einleitung

1.1.

Die Bedeutung der zerebralen Durchblutung

Ein völliger Ausfall der Hirndurchblutung führt zum Tod des Organismus

Eine kontinuierliche Versorgung des Gehirns mit Sauerstoff (O₂) und Glucose ist von existentieller Bedeutung. Bei einem Anteil von ca. 2% des Körpergewichts dienen ca. 13% des Ruhe-Herzzeitvolumens der Hirndurchblutung; ca. 21% des O₂ Verbrauchs des Körpers in Ruhe entfallen auf das Gehirn (Silbernagl,S. und Lang,F. 1998b). 15-20 Sekunden sistierter Hirndurchblutung haben Bewusstlosigkeit, 7-10 Minuten irreversiblen Nervenzellschaden und den (Hirn)tod des Organismus zur Folge. Neben Niere, Verdauungstrakt und Myokard ist das Gehirn bezogen auf das Organgewicht eines der am Besten durchbluteten Organe des Körpers (Silbernagl,S. und Lang,F. 1998a).

Die zerebrale Durchblutung wird innerhalb bestimmter Grenzen konstant gehalten

Bei funktioneller Aktivität steigt die Durchblutung einzelner Organsysteme um ein Vielfaches an. In Gefäßgebieten mit stark schwankenden Anforderungen kommt es hierbei zu den relativ größten Durchblutungsänderungen (z.B. Skelettmuskulatur). Die Durchblutung lebenswichtiger Organe (z.B. Gehirn) ist hingegen nur geringfügigen Schwankungen ausgesetzt. Innerhalb bestimmter Grenzen wird die Durchblutung den gleich bleibend hohen Anforderungen entsprechend durch spezielle Regulationsmechanismen konstant gehalten (Busse,R. 1997).

Im Gehirn gewährleistet die zerebrale Autoregulation bei systemischen mittleren arteriellen Blutdrücken zwischen 60 und 150 mmHg die ausreichende Durchblutung (Paulson,O.B. et al. 1990).

Der grundlegende Mechanismus der Autoregulation im Gehirn beruht auf der myogenen Antwort (Bayliss Effekt). Bei Anstieg des transmuralen Drucks kommt es in terminalen Arterien und Arteriolen zu einer myogen bedingten Kontraktion, die einen Anstieg der Durchblutung weitestgehend verhindert (Bayliss 1902). Autonome

(sympathikoadrenerge) Mechanismen spielen für die zerebrale Autoregulation nur eine geringfügige Rolle (Busse,R. 1997).

Im Gegensatz zur im Wesentlichen gleich bleibenden Gesamtdurchblutung des Gehirns unterscheidet sich einerseits die generelle Durchblutung einzelner Hirnregionen (die Hirnrinde ist bspw. deutlich besser durchblutet als das Marklager), andererseits verändert sich die lokale Durchblutung situationsabhängig. Gründe hierfür sind physiologischer (z.B. neuronale Erregung) oder pathophysiologischer Natur (z.B. Vasospasmus nach Subarachnoidalblutung, Epilepsie).

1.1.1.

Der lokale Blutfluss im Gehirn ist an neuronale Erregung gekoppelt

Funktionelle Aktivierung kortikaler Areale führt zu einer verstärkten Blutflussantwort (Villringer,A. und Dirnagl,U. 1995). Diese sogenannte neurovaskuläre Kopplung bietet somit über die Messung des zerebralen Blutflusses die Möglichkeit der indirekten Untersuchung neuronaler Aktivität. Die Kopplung von neuronaler Aktivität und zerebralem Blutfluss bildet die Grundlage vieler funktionell-bildgebender Verfahren (z.B. funktioneller Kernspintomographie (fMRI)), die einen wichtigen Bestandteil neurologischer Diagnostik darstellen und die Grundlage funktioneller in-vivo Studien aus unterschiedlichsten Bereichen der Neurowissenschaften bilden (Villringer,A. und Dirnagl,U. 1995).

Die verstärkte Blutflussantwort nach funktioneller neuronaler Aktivierung wird durch eine Dilatation von Arteriolen des entsprechenden Hirnareals hervorgerufen. Lange wurde angenommen, dass der zerebrale Blutfluss an den lokalen Energie Metabolismus gekoppelt ist und der Anstieg des Blutflusses dem neuronalen Bedarf an Glucose und Sauerstoff entspricht oder aber dem Abtransport von Lactat dient.

Der genaue Mechanismus der neurovaskulären Kopplung ist jedoch nach wie vor nicht geklärt. Es mehren sich die Hinweise, dass der Blutfluß weniger direkt den Energieverbrauch der Neurone abbildet als vielmehr indirekt durch Glutamat vermittelte lokale neuronale Netzwerke und andere Neurotransmitter (z.B. Amine und Acetylcholin) kontrolliert wird (Attwell,D. und Iadecola,C. 2002).

Aufgrund der zunehmenden Bedeutung funktioneller Bildgebung mit unterschiedlichsten Methoden als Möglichkeit der nicht-invasiven Untersuchung neuronaler Aktivität am Menschen ist das genaue Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen neurovaskulärer Kopplung von größter Bedeutung für die

Interpretation der gewonnenen Daten und die hierauf beruhende klinische und wissenschaftliche Entscheidungsfindung (siehe Abb. 1). Dies wird umso deutlicher, da Erkrankungen, Medikamente und möglicher Weise Bestandteile der täglichen Ernährung einen Einfluß auf diese Mechanismen haben (Villringer, A. und Dirnagl, U. 1995). Als Beispiel seien fMRI Untersuchungen bei neuropsychiatrischen Erkrankungen genannt, die mit Veränderungen von Serotonin, Noradrenalin, Dopamin etc. einhergehen (Sabatini, U. et al. 2000; Vaidya, C.J. et al. 1998). Wenn neurovaskuläre Kopplung u.a. auf aminbasierten neuronalen Netzwerken beruht, ist dies bei der Interpretation dieser Daten zu berücksichtigen (Attwell, D. und Iadecola, C. 2002).

Mehr als ein Jahrhundert nach Formulierung der Theorie, dass Metaboliten des lokalen Stoffwechsels mögliche Vermittler zwischen Neuron und Gefäß darstellen könnten (Roy, C.S. und Sherrington, C.S., 1890), werden unterschiedlichste Mediatoren für diese Rolle diskutiert. Beispiele für Metaboliten, die im Focus der Untersuchungen standen und stehen sind unter anderem H^+ , K^+ , Adenosin, Lactat, CO_2 , Dopamin, GABA, Stickstoffmonoxid (NO) (Villringer, A. und Dirnagl, U. 1995; Girouard, H. und Iadecola, C. 2006). Es ist am wahrscheinlichsten, dass neurovaskuläre Kopplung aus dem Zusammenspiel vieler Faktoren in unterschiedlichen Situationen in Gesundheit und Krankheit resultiert und es nicht den „einen“ Mediator neurovaskulärer Kopplung gibt (Girouard, H. und Iadecola, C. 2006). Aus den genannten Metaboliten sind für die vorliegende Arbeit K^+ und NO von Bedeutung. Die Rolle dieser beiden Metaboliten in physiologischen und pathophysiologischen Situationen wird im Folgenden besprochen.

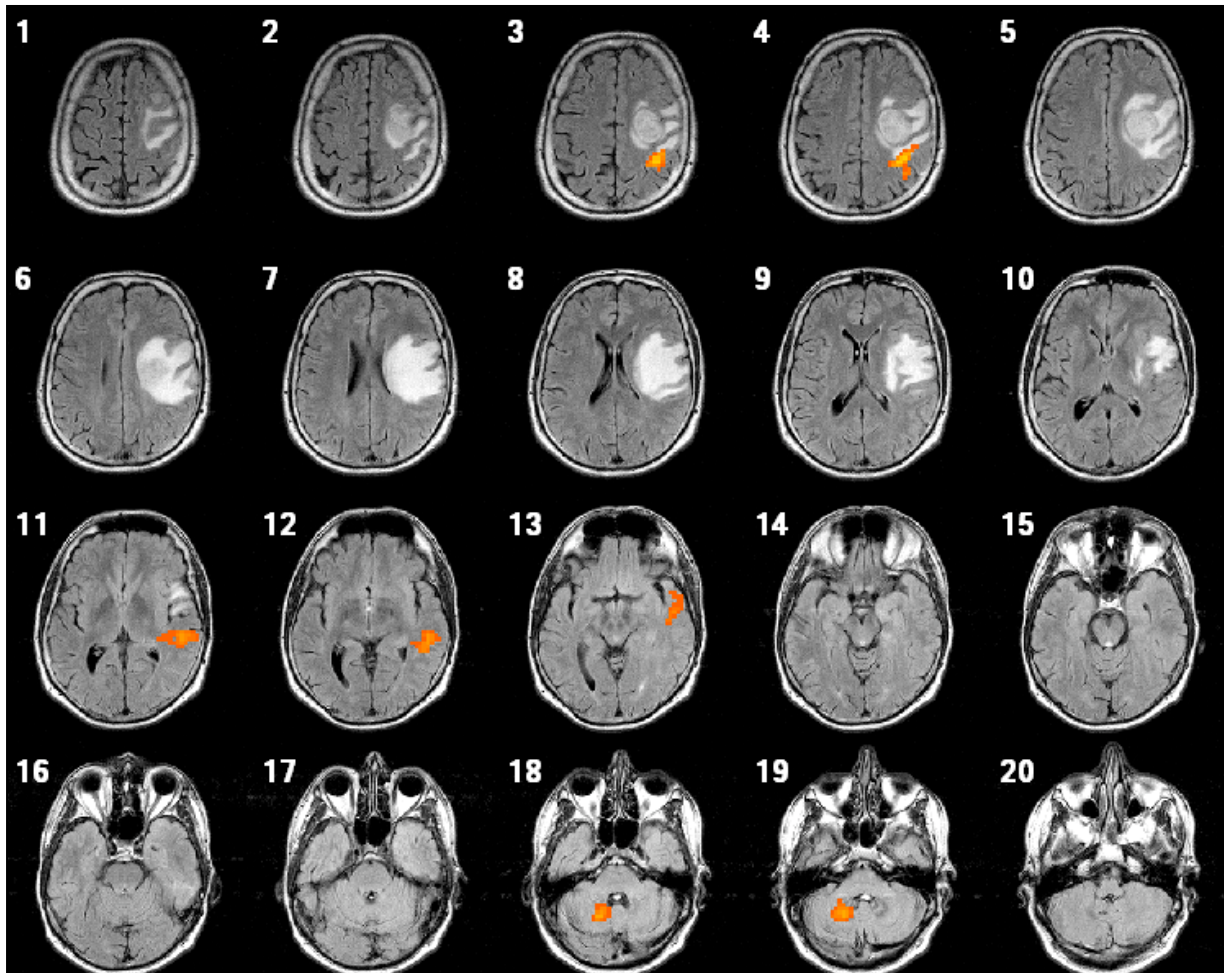


Abb.: 1

Beispiel einer klinischen Anwendung funktioneller Kernspintomographie (fMRI). Bei der präoperativen Bildgebung vor Resektion eines links parietal gelegenen Tumors zeigt sich bei Fingertapping rechts eine links kraniodorsal des perifokalen Ödems gelegene Aktivierung, am ehesten dem primärmotorischen Cortex entsprechend. Ebenfalls zu sehen ist die rechts zerebelläre Koaktivierung (Roth, J.H. und Lobsien, D. 2006, Abt. für Neuroradiologie Universität Leipzig, persönliche Mitteilung).

1.2.

Erkrankungen verändern den zerebralen Blutfluss

Viele häufige Erkrankungen können zu Veränderungen des zerebralen Blutflusses führen. Beispiele für Situationen und Erkrankungen bei denen experimentell Veränderungen zerebraler Gefäßreaktion gezeigt wurden sind u.a. Hypertonus, Hypercholesterinämie, Diabetes, Alterungsprozesse und Meningitis (Faraci, F.M. und Heistad, D.D. 1998). Beispiele für neurologische Erkrankungen, bei denen die pathologische Veränderung von Blutfluss und neurovaskulärer Kopplung von

maßgeblicher Bedeutung für den Krankheitsverlauf sind, sind Hirntrauma und die Subarachnoidalblutung als Unterform des Schlaganfalls.

1.2.1.

Hirntrauma führt zu einer Reduktion des zerebralen Blutflusses

In den USA erleiden jährlich 1.5-2 Millionen Menschen ein Schädel-Hirntrauma (SHT), das in vielen Fällen in Tod oder schwerwiegenden neurologischen Beeinträchtigungen resultiert. Trotz zunehmender Kenntnis pathophysiologischer Grundlagen über neuronalen und glialen Zellschaden, vaskuläre Veränderungen etc. sowie experimenteller therapeutischer bzw. neuroprotektiver Ansätze, sind viele pathophysiologische Vorgänge infolge eines SHT noch unverstanden. Es existieren diesbezüglich kaum kausale Therapieansätze und entsprechende klinische Studien zeigten sich bisher wenig erfolgreich (Golding, E.M. 2002; DeWitt, D.S. und Prough, D.S. 2003).

Bei einer traumatischen Schädigung des Gehirns kommt es neben einer Vielzahl an anderen Phänomenen auch zu einer Reduktion des zerebralen Blutflusses und es zeigen sich ischämische Veränderungen (DeWitt, D.S. und Prough, D.S. 2003; Graham, D.I. et al. 1989). Die Zufuhr von Sauerstoff und Glukose ist vermindert und Energie abhängige Prozesse zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials versagen. Es kommt zu einer Depolarisation von Neuronen und Glia, Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle und Ausschüttung exzitatorischer Transmitter wie Glutamat. Die Aktivierung glutamatabhängiger Rezeptoren führt zu einem neuronalen Einstrom von Kalzium und letztlich steigt der Ausstrom von Kalium. Der Natrium und Chlorid Einstrom in die Neuronen steigt an, passiv gefolgt von Wasser und es entwickelt sich ein zytotoxisches Ödem (Golding, E.M. 2002). Die Reduktion des Blutflusses nach Schädel-Hirn Trauma (SHT) geht mit schlechterem neurologischen Outcome einher und macht das Gehirn empfänglicher für Sekundärschäden.

Die Mechanismen, die zur Verminderung des Blutflusses führen sind nicht vollständig verstanden. Es wird eine Entkopplung von Hirnmetabolismus und zerebralem Blutfluß, eine Abnahme von lokalem Blutfluß und einer Zunahme des lokalen Glukoseverbrauchs beobachtet (Golding, E.M. 2002). Die Zunahme der Glykolyse wird als Korrelat für die Versuche der Neurone, energieabhängige Prozesse aufrecht

zu erhalten, interpretiert. Experimentell ist die vaskuläre Antwort auf Serotonin (Kontos,H.A. und Wei,E.P. 1992), Acetylcholin (Ellison,M.D. et al. 1989) und CO₂ (Golding,E.M. et al. 1999) in-vivo nach Trauma vermindert, in-vitro aber erhalten (Bukoski,R.D. et al. 1997). Dies weist auf Veränderungen der Kommunikation zwischen Gefäß und Parenchym hin und nicht auf einen gefäßintrinsic Prozess. Nach experimentellem Hirntrauma wird ein kurzzeitiger Anstieg der zerebralen NO Konzentration und Aktivität der konstitutiven NO Synthase (NOS) beobachtet, der im Verlauf auf subnormale Werte absinkt (DeWitt,D.S. und Prough,D.S. 2003).

Es zeigt sich des Weiteren eine Verminderung der Aktivität von ATP- und Kalzium-abhängigen Kaliumkanälen (K_{ATP},K_{Ca}) nach experimentellem Hirntrauma (Armstead,W.M. 1997a;Armstead,W.M. 1997b) sowie ein Anstieg der extrazellulären Kalium Konzentration über physiologische Werte kombiniert mit einer Zunahme der Osmolarität (Katayama,Y. et al. 1998).

Zusammengefasst werden also bei Hirntrauma u.a. eine Verminderung der zerebralen Durchblutung sowie Veränderungen des NO sowie Kalium Stoffwechsels beobachtet. Ein Einfluss durch die Veränderung von NO und Kalium bzw. der Aktivität von Kaliumkanälen auf den Blutfluss ist wahrscheinlich, bisher aber noch nicht eingehend untersucht (DeWitt,D.S. und Prough,D.S. 2003).

1.2.2.

Verzögerte Vasospasmen sind Komplikationen einer Subarachnoidalblutung

Der Schlaganfall ist die dritthäufigste Todesursache in Industrieländern. Es handelt sich hierbei entweder um Durchblutungsstörungen (Ischämie) oder Blutungen (Hämorrhagie). Eine spezielle Form der intrakraniellen Blutung ist die Subarachnoidalblutung (SAB), bei der es häufig durch Ruptur eines Aneurysmas der Gefäße der Hirnbasis zu einem Austritt von Blut in die basalen Liquorräume kommt. Bis zu 10 Prozent aller Schlaganfälle sind SABs. SAB resultiert in Tod oder schwerer Behinderung in über 50% der Fälle. Eine kritische klinische Komplikation der SAB ist der verzögerte Vasospasmus der basalen Hirnarterien, der mit einer Latenz von 2-3 Tagen in der Hälfte aller Patienten zu beobachten ist und unbehandelt in bis zu 20% zum Tode oder Behinderung führt, die über das ursprüngliche Ausmaß des Schadens hinaus geht (Dorsch,N.W. 2002;Sobey,C.G. und Faraci,F.M. 1998; Dietrich,H.H. und Dacey,R.G., Jr. 2000; Pluta,R.M. 2005).

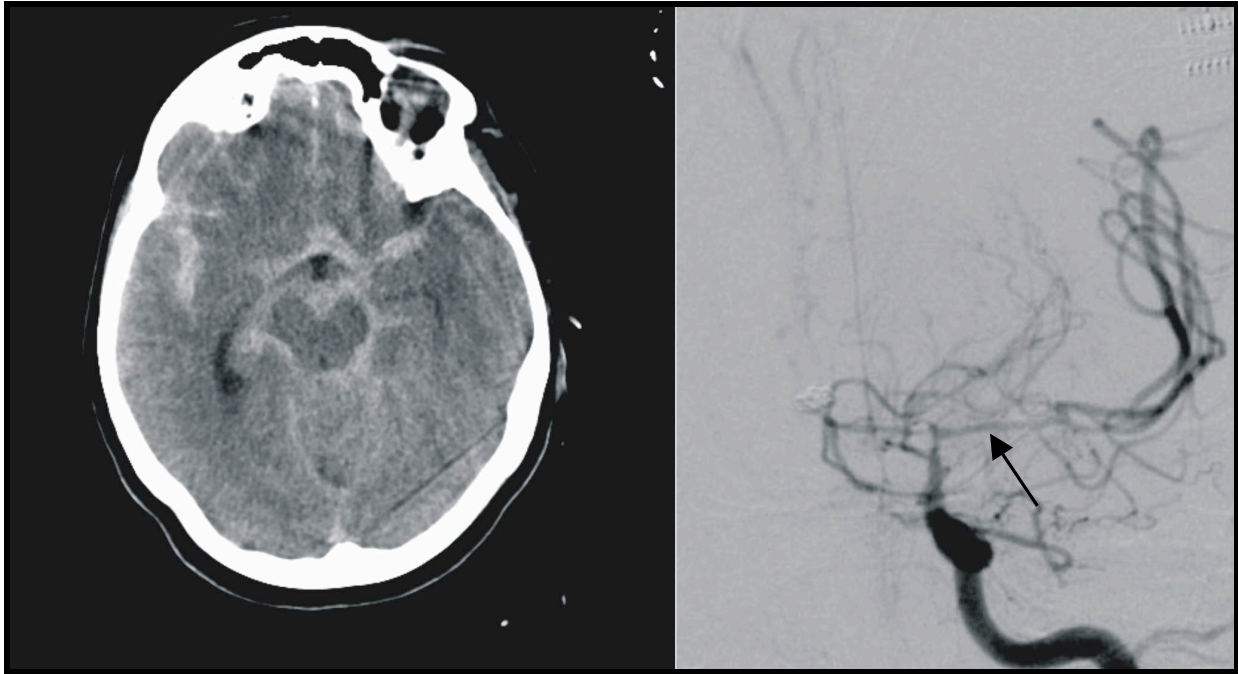


Abb.: 2

Klinisches Beispiel einer pathophysiologischen Gefäßreaktion. Links ist das cCT einer aneurysmatischen SAB gezeigt. Rechts ein angiographischer Befund eines verzögerten Vasospasmus der MCA (Pfeil) (Roth, J.H. und Lobsien, D. 2006, Abt. für Neuroradiologie Universität Leipzig, persönliche Mitteilung).

Die genauen pathophysiologischen Vorgänge, die zum Entstehen eines Vasospasmus führen sind nicht vollständig geklärt. Es sind Mechanismen assoziiert, die sowohl mit vermindertem Einfluß vasodilatativer Faktoren als auch verstärktem Einfluß vasokonstringierender Faktoren einhergehen. Pathophysiologische Mechanismen, die diskutiert werden, sind unter anderem die verminderte Bildung von NO im Endothel, bzw. Verminderung der NO Verfügbarkeit durch Oxyhämoglobin und dadurch vermindertes cGMP, verminderte Aktivität von Kaliumkanälen und vermehrte Produktion von Endothelin und vermehrte Aktivität der Proteinkinase C (Dietrich,H.H. und Dacey,R.G., Jr. 2000; Sobey,C.G. und Faraci,F.M. 1998).

Nach Subarachnoidalblutung werden vermehrt kortikale Nekrosen in Obduktionen gefunden (Birse,S.H. und Tom,M.I. 1960). Diese könnten Resultat über den Kortex wandernder Wellen von Ischämiezonen, sogenannter Cortical Spreading Ischaemias (CSI) sein (Windmuller,O. et al. 2005).

Experimentell lassen sich CSI in-vivo durch erhöhte subarachnoidale Kaliumkonzentrationen und NO vermindernde Substanzen beispielsweise NOS-

Inhibitoren wie LNNA (Verminderung der NO Produktion) oder Oxyhämoglobin (Bindung und damit Aktivitätsverlust von NO) auslösen (Windmuller,O. et al. 2005; Dreier,J.P. et al. 1998).

Hämoglobin und Kalium sind Hauptbestandteil von Erythrozyten. Bei einer Blutung und Zellschaden kommt es zu einem Austritt in den subarachnoidalen Raum und Steigerung der Hämoglobin- und extraluminalen Kalium Konzentration. Nach SAB zeigt sich außerdem eine verminderte Aktivität bestimmter Kaliumkanalfamilien (Sobey,C.G. und Faraci,F.M. 1998).

Die etablierte Therapie des Vasospasmus ist weitestgehend symptomatisch und besteht in der Gabe von NO unabhängigen Vasodilatoren (z.B. Nimodipin), Hypervolämie ggf. HHH Therapie (Hypervolämie, Hypertension, Hämodilution), sowie teilweise minimal invasiver Angioplastie. Experimentelle Therapiestudien untersuchten jedoch bereits in unterschiedlichen Tiermodellen und klinischen Fallserien (bzw. Studien) mit wechselndem Erfolg Ansätze, die die Aktivierung von Kaliumkanälen, Gabe von NO Donoren oder Antagonisierung von Endothelin beinhalten (Dorsch,N.W. 2002;Dietrich,H.H. und Dacey,R.G., Jr. 2000; Vajkoczy, P. et al. 2005).

Zusammengefasst stellt die Veränderung des Blutflusses nach SAB ein erhebliches klinisches Problem dar, das derzeit nur teilweise behandelt werden kann. Pathophysiologisch spielen erhöhte Kaliumkonzentrationen, Veränderung der Aktivität von Kalium Kanälen sowie Reduktion der Aktivität von NO zusammen mit vielen anderen Faktoren eine Rolle. Dies bildet bereits Grundlage experimenteller Therapieansätze, die genauen Zusammenhänge sind jedoch nur unzureichend verstanden.

1.3.

Kurze Darstellung der Anatomie von Arterien

Die innerste Schicht der Gefäße, Tunica Intima, besteht aus Endothelzellen sowie der Basalmembran und begrenzt das Lumen des Gefäßes. Die mittlere Schicht, Tunica Media, besteht aus den Gefäßmuskelzellen. Entsprechend der Größe der Gefäße variiert diese Schicht in der Ausdehnung. Kapillaren fehlt diese Muskelschicht. Die äußere Schicht, Tunica Adventitia, besteht aus umgebendem Bindegewebe und Nervenenden. Alle drei Schichten sind wichtig zur

Aufrechterhaltung des vaskulären Tonus. Ateriolen und Kapillaren sind von Astrozytenendfüßen umgeben, die die Kommunikation mit anderen Gefäßen und Neuronen erleichtern (Golding,E.M. 2002).

Unter Anderem besteht eine Funktion des Endothels in der Fähigkeit eine Reihe von Faktoren zu produzieren, die einen Einfluß auf die Gefäßmuskelzellen der Tunica Media haben und entweder Dilatationen oder Kontraktionen hervorrufen können. Diese Faktoren stehen unter physiologischen Bedingungen in einem Gleichgewicht, das unter pathophysiologischen Bedingungen gestört werden kann. Endothelabhängige vasokonstriktorische Faktoren sind unter anderem vasokonstriktorische Metaboliten der Arachidonsäure, Endothelin, Sauerstoff Radikale (ROS). Endothelabhängige vasodilatatorische Faktoren sind unter anderem NO (historisch als Endothelial Derived Relaxing Factor (EDRF) bezeichnet), vasodilatatorische Metaboliten der Arachidonsäure, Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF), ROS (Golding,E.M. 2002; Faraci,F.M. und Heistad,D.D. 1998).

1.4.

Stickstoffmonoxid ist ein starker Vasodilatator

Die Freisetzung relaxierender Faktoren aus dem Endothel wurde erstmalig 1980 beschrieben (Furchgott,R.F. und Zawadzki,J.V. 1980). Später wurde NO als der prominenteste Bestandteil der EDRFs identifiziert (Palmer,R.M. et al. 1987). NO ist ein starker, kurzlebiger Vasodilatator, der leicht zu den Zielzellen diffundieren kann. Obwohl zuerst im Gefäßendothel der Kaninchenaorta entdeckt, wird NO von vielen Zelltypen durch eine Familie von Isoenzymen, den NO Synthasen, aus der Aminosäure L-Arginin produziert (Faraci,F.M. und Heistad,D.D. 1998; Palmer,R.M. et al. 1988).

Drei Isoformen der NO Synthase sind bekannt: Neuronale NOS (nNOS) und endotheliale (eNOS), die die konstitutive Form der NOS darstellen, und die induzierbare NOS (iNOS). Die konstitutive NOS ist für die vorliegenden Experimente von Interesse. Zerebral wurden die konstitutiven NOS Isoformen in Neuronen, Glia und Gefäßendothel nachgewiesen (Faraci,F.M. und Heistad,D.D. 1998).

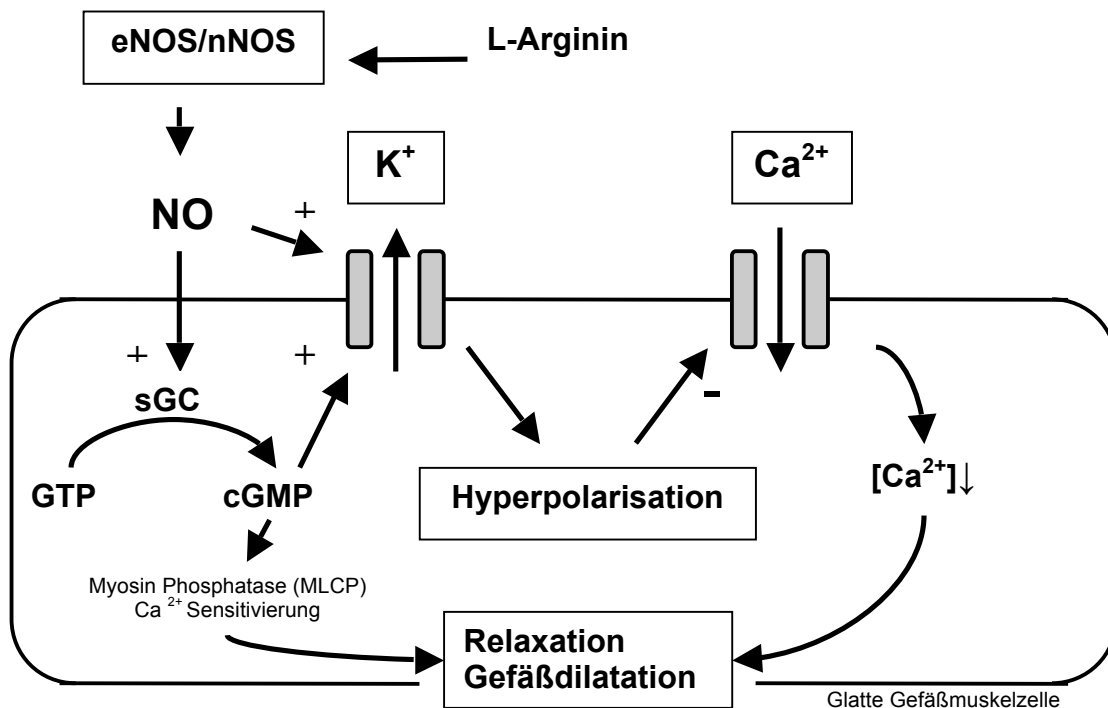


Abb.: 3

Schematische Darstellung der NO vermittelten Vasodilatation. NO wird durch NOS Isoformen gebildet, diffundiert in die glatte Muskelzelle, stimuliert dort die lösliche Guanylatcyclase, cGMP wird aus GTP gebildet. CGMP vermittelte oder direkte Aktivierung von Kaliumkanälen resultiert in Kaliumausstrom, Hyperpolarisation, Inhibition spannungsabhängiger Calcium Kanäle, Reduktion der intrazellulären Calcium Konzentration, Relaxation der Zelle und Vasodilatation (nach Faraci,F.M. und Heistad,D.D. 1998;Sobey,C.G. und Faraci,F.M. 1998).

1.4.1

Stickstoffmonoxid wirkt an der glatten Muskelzelle über einen cGMP vermittelten Mechanismus

Der bekannteste Weg auf dem NO seine vasodilatatorische Wirkung entfaltet ist über den second messenger cGMP vermittelt. Nach Freisetzung diffundiert NO in die Gefäßmuskelzelle und stimuliert dort eine lösliche Guanylat Cyclase (sGC), worauf es zu einem intrazellulären Anstieg von cGMP kommt, danach zu einer Aktivierung der cGMP abhängigen Proteinkinase und letztlich zur Relaxation der Gefäßmuskelzelle und Dilatation des Gefäßes, z.B. über die Phosphorylierung von Ionenkanälen (Faraci,F.M. und Heistad,D.D. 1998).

Die Aktivität der NOS kann durch L-Arginin Analoga wie z.B. L-NNA inhibiert werden. Die Inhibition durch L-Arginin Analoga betrifft nNOS und eNOS gleichermaßen (Faraci,F.M. und Heistad,D.D. 1998).

Eine weitere Möglichkeit den NO/cGMP Weg zu untersuchen ist die Blockade der sGC. Substanzen, die hierfür verwendet werden können, sind z.B. Methylenblau, von dem jedoch unspezifische Effekte auf die NO vermittelte Vasodilatation berichtet werden (Kontos,H.A. und Wei,E.P. 1993), oder die jüngere Substanz ODQ, die eine deutlich spezifischere Blockade der sGC erzeugt (Garthwaite,J. et al. 1995).

Zusätzlich zu diesem cGMP-abhängigen Mechanismus kann NO in glatten Gefäßmuskelzellen Reaktionen durch direkte Nitrosylierung vermitteln und somit ebenso die Aktivität von Kaliumkanälen verändern (Bolotina,V.M. et al. 1994; Archer,S.L. et al. 1994; Robertson,B.E. et al. 1993).

1.4.2.

NO: Ein Modulator neurovaskulärer Kopplung

Aufgrund der Kurzlebigkeit, starken vasodilatatorischen Wirkung und Produktion in Gefäßendothel und Neuronen ist NO ein guter Kandidat für einen möglichen Mediator neurovaskulärer Kopplung bzw. zerebraler Gefäßreaktion (Villringer,A. und Dirnagl,U. 1995). Viele Studien deuten jedoch daraufhin, dass NO bei einer Reihe von unterschiedlich induzierten zerebrovaskulären Reaktionen eher die Rolle eines Modulators als die eines Mediators zu spielen scheint. Dies scheint auch für kaliumvermittelte Gefäßantworten von Bedeutung zu sein.

Das Modulator/Mediator Konzept geht davon aus, dass NO als Vasodilatator auf prinzipiell zwei unterschiedlichen Wegen zur Vermittlung einer Gefäßreaktion beitragen kann. Im Sinne eines Mediators neurovaskulärer Kopplung würde man davon ausgehen, dass NO auf einen Stimulus hin freigesetzt wird, in die Gefäßmuskelzelle diffundiert und dort die Vasodilatation hervorruft. Abstrahiert formuliert, handelt es sich um eine lineare Aneinanderreihung von Ereignissen.

Im Sinne eines Modulators geht man davon aus, dass ein konstant vorhandener NO/cGMP Spiegel im Gewebe die vasodilatatorische Wirkung eines anderen Mediators im Sinne einer permissiven Wirkung ermöglicht. Bei parallelem Vorhandensein des basalen NO/cGMP Spiegels wird die vasodilatatorische Wirkung

des Mediators vermittelt, bei Fehlen des basalen NO/cGMP Spiegels wird sie verhindert.

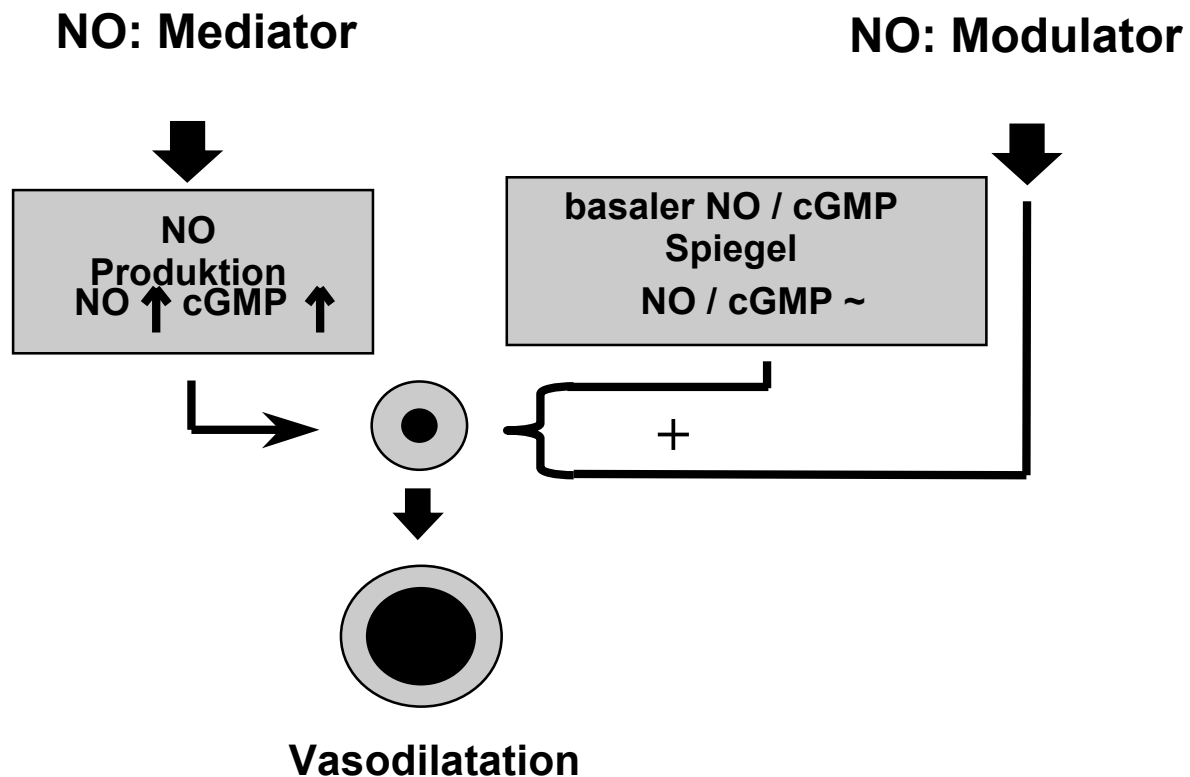


Abb.: 4

Schematische Darstellung des Mediator/Modulator Konzeptes. Als Mediator kaliumvermittelter Gefäßreaktion führt der Anstieg von Kalium zur Produktion von NO und cGMP. Als Modulator führt der Anstieg der Kaliumkonzentration zur Gefäßreaktion, wenn parallel ein basaler NO/cGMP Spiegel aufrechterhalten wird.

Die Funktion von NO/cGMP als Modulator zerebrovaskulärer Reaktion konnte für unterschiedliche vasodilatatorische Stimuli gezeigt werden. Unter anderem findet sich die modulatorische Rolle von NO in vivo bei Gefäßreaktionen auf Hyperkapnie (Iadecola, C. et al. 1994), in-vitro bei der Reaktion der isolierten MCA auf erniedrigte pH Werte (Lindauer,U. et al. 2001), in vivo bei der Gefäßantwort auf physiologisch erhöhte Kaliumkonzentrationen (Dreier,J.P. et al. 1995) und im somatosensorischen Kortex der Ratte bei Reaktion auf sensorische Stimulation (Lindauer,U. et al. 1999). Im Cerebellum hingegen wurde für NO die Rolle eines Mediators neurovaskulärer Kopplung gezeigt (Akgören, N. et al. 1996).

1.5.

Kalium: Ein möglicher Mediator neurovaskulärer Kopplung

Die extrazellulären Kaliumkonzentrationen im Gehirn sind nicht immer gleich bleibend. Vielmehr ändern sie sich in einer Vielzahl von Situationen.

In physiologischen Situationen führt neuronale Erregung zu einem Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration von einem Ruhelevel von 3-4 mM auf Konzentrationen von bis zu ca. 12 mM (Sykova, E. 1983). In pathophysiologischen Situationen wie traumatischer Hirnschädigung oder Schlaganfall wurde gezeigt, daß die extrazelluläre Kaliumkonzentration auf mehr als 60 mM ansteigt (Astrup, J. et al. 1980; Katayama, Y. et al. 1998). Dieser pathophysiologische, extrazelluläre Kaliumanstieg geht im Falle eines Traumas mit einem Anstieg der Osmolalität des extrazellulären Milieus einher (Katayama, Y. et al. 1998).

Diese Situationen sind von Veränderungen im lokalen Blutfluss begleitet. Kalium und die Veränderung der extrazellulären Kaliumkonzentrationen wird dementsprechend als ein möglicher Mediator neurovaskulärer Kopplung diskutiert (Villringer, A. und Dirnagl, U. 1995).

1972 wurde eine Zunahme des Durchmessers pialer Arterien auf erhöhte extraluminal Kaliumkonzentrationen beschrieben (Kuschinsky, W. et al. 1972). Seitdem wurde die Beteiligung von Kalium und veränderten Kaliumkonzentrationen für eine Vielzahl von Gefäßreaktionen in unterschiedlichen experimentellen Modellen und Gefäßbetten gezeigt werden (Faraci, F.M. und Heistad, D.D. 1998; Faraci, F.M. und Sobey, C.G. 1998; Nelson, M.T. und Quayle, J.M. 1995).

Die Rolle eines Mediators der neurovaskulären Kopplung wird durch die „Syphonhypothese“ unterstützt (Paulson, O.B. und Newman, E.A. 1987). Hiernach wird Kalium nach Freisetzung aus den Neuronen von Astrozyten aufgenommen. Der Kalium Einstrom depolarisiert die Zellen und bedingt einen passiven Ausstrom in anderen Regionen des Astrozyten oder in Astrozyten, die elektrophysiologisch an die Zelle gekoppelt sind. Die astrozytären Endfüße haben eine weitaus größere Kalium Leitfähigkeit, als der Rest der Zelle, vornehmlich vermittelt durch K_{Ca} (Newman, E.A. 1986). Es wird vermutet, daß deshalb ein großer Teil des Kaliums an den Endfüßen, in direkter Nähe der Gefäße ausgeschüttet wird (Paulson, O.B. und Newman, E.A. 1987).

Extrazelluläre Kaliumkonzentrationen

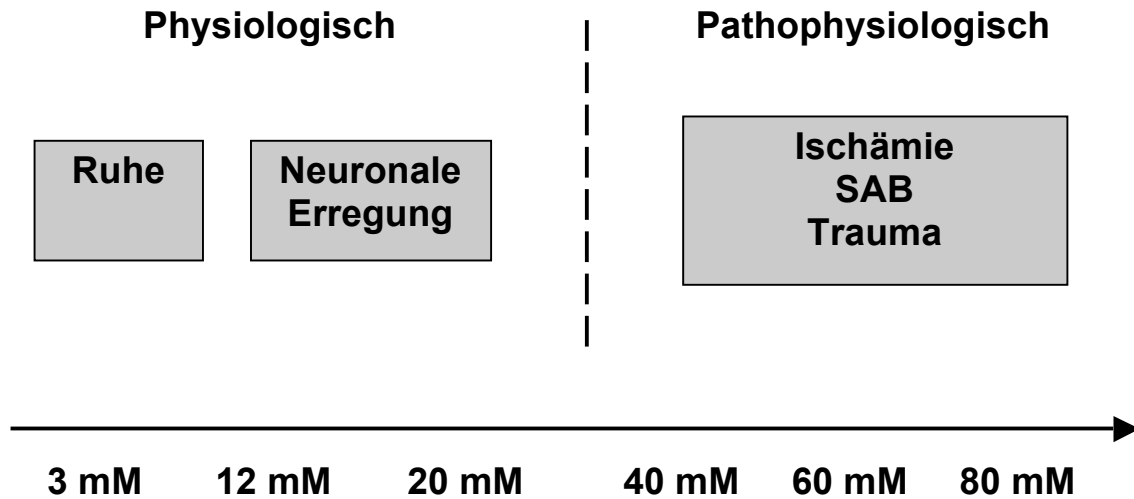


Abb.: 5

Schematische Darstellung extrazellulärer Kaliumkonzentrationen im Gehirn in unterschiedlichen physiologischen und pathophysiologischen Situationen.

Auf diesem Wege kommt es weitaus schneller zu höheren Kalium Konzentrationen im Bereich der Gefäße, als auf dem Wege der Diffusion allein, insbesondere wenn der Ort der Kaliumfreisetzung in einiger Entfernung der Gefäßwand liegt. Diese Hypothese wird experimentell durch den Nachweis eines interzellulären „K⁺ channel-to-K⁺ channel“ pathways gestützt: Neuronale Aktivität bewirkt einen Anstieg von Ca²⁺ in Astrocyten, es kommt zur Aktivierung von K_{Ca} der Astrocyten Endfüße und konsekutivem Kaliumausstrom mit Steigerung der extrazellulären Kaliumkonzentration in direkter Nähe zu den Gefäßmuskelzellen. Dies hyperpolarisiert die Gefäßmuskelzelle, es kommt zur Aktivierung von K_{IR} und folgend zur Gefäßdilataion (Filosa, J.A., et al. 2006). Andere Untersuchungen zeigen jedoch, dass im in-vitro Modell der isolierten Retina der Ratte die „Syphon-Hypothese“ allenfalls eine untergeordnete Rolle bei der Vermittlung neurovaskulärer Kopplung spielt (Meta, M.R., et al. 2007).

1.5.1

Kaliumkanalfamilien und die Na/K ATPase spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Membranpotentials

Wie in allen Zellen geschieht die Kommunikation zwischen extra- und intrazellulärem Milieu durch unterschiedliche teils aktive, teils passive Mechanismen. Hierzu gehört beispielsweise die Diffusion entlang eines Konzentrationsgefälles, die erleichterte Diffusion durch (Ionen)Kanäle in der Zellmembran oder der energieverbrauchende Transport über die Zellmembran.

Für Kalium besteht unter physiologischen Bedingungen ein starkes Konzentrationsgefälle zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Raum. Es ist für Kalium möglich die Zellmembran entlang dieses Gefälles durch passive Diffusion über spezielle Ionenkanäle zu überwinden, was abhängig von der Anzahl geöffneter Ionenkanäle ständig geschieht. Vier übergeordnete Gruppen von Kaliumkanälen sind bekannt, die nach unterschiedlichen Mechanismen funktionieren und in unterschiedlichen Situationen für einen Kaliumstrom durch die Zellmembran sorgen.

Für die Aufrechterhaltung des Konzentrationsunterschiedes und damit des Membranpotentials sorgt die Natrium-Kalium-ATPase, die Kalium entgegen des Konzentrationsgefälles im Austausch gegen Natrium energieabhängig in die Zelle transportiert (Dudel, J. 1998)

In zerebralen Gefäßen wurde die Expression aller vier Kaliumkanalfamilien, sowie des Enzyms Natrium-Kalium-ATPase nachgewiesen (Faraci, F.M. und Sobey, C.G. 1998; Johnson, T.D. et al. 1998).

Der Tonus der glatten Muskulatur in kleinen Arterien und Arteriolen ist eine wichtige Determinante in der Regulation des peripheren vaskulären Widerstandes. Das Membranpotential der glatten Muskelzellen wiederum ist ein wichtiger Regulator des Tonus und folglich auch des Durchmessers der Arterien. Kaliumkanäle spielen hierbei eine wichtige Rolle.

Öffnen sich Kaliumkanäle in der Membran glatter Muskelzellen in Arterien steigt der Kaliumausstrom entlang des Konzentrationsgradienten aus der Zelle und es kommt zur Hyperpolarisation der Zelle. Diese Hyperpolarisation schließt spannungsabhängige Calciumkanäle, der Calciumeinstrom sinkt, damit sinkt die intrazelluläre Calciumkonzentration und es kommt zur Entspannung der Muskelzelle und zur Vasodilatation. Eine Anzahl endogener Vasodilatoren (z.B. Calcitonin

Gene Related Peptide (CGRP) und Adenosin) wirkt durch Mechanismen, die eine Aktivierung, also die Öffnung von Kaliumkanälen einschließen.

Auf der anderen Seite ist ein recht häufiger Mechanismus von Vasokonstriktoren, daß sie eine Membrandepolarisation hervorrufen. Schließen von Kaliumkanälen resultiert in einer Verringerung des negativen Membranpotentials (Hypo- bzw. Depolarisation), dadurch folgend steigt der Calciumeinstrom und es kommt zur Anspannung der glatten Muskulatur und Konstriktion des Gefäßes. Es ist wahrscheinlich, daß die Inhibition von Kaliumkanälen wichtiger Bestandteil des Mechanismus Vasokonstriktor-vermittelter Membrandepolarisation ist (Nelson, M.T. und Quayle, J.M. 1995).

1.5.2.

Alle vier Hauptfamilien von Kaliumkanälen werden in glatten Muskelzellen zerebraler Arterien exprimiert

Neben den erst kürzlich entdeckten und bisher nicht hinreichend untersuchten Familie von „two-pore domain“ Kaliumkanälen (Bryan et al., 2006), auf die im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen wird, werden vier unterschiedliche, gut charakterisierte Hauptfamilien von Kaliumkanälen an glatten Gefäßmuskelzellen beschrieben:

- Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_v)
- Calciumabhängige Kaliumkanäle (K_{Ca})
- ATP-abhängige Kaliumkanäle (K_{ATP})
- Einwärts-Gleichrichter Kaliumkanäle (K_{IR})

Alle diese vier Kaliumkanaltypen werden an der glatten Muskulatur zerebraler Gefäße exprimiert (Faraci, F.M. und Sobey, C.G. 1998).

1.5.3.

Calciumaktivierte Kaliumkanäle sind die häufigsten Kaliumkanäle an zerebralen Gefäßmuskelzellen und können durch Tetraethylammonium inhibiert werden

Calciumaktivierte Kalium Kanäle werden durch erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentrationen aktiviert. Außerdem wird dieser Kaliumkanaltyp wie auch spannungsabhängige Kaliumkanäle durch Membrandepolarisation aktiviert.

Calciumabhängige Kaliumkanäle (K_{Ca}) sind wahrscheinlich die häufigsten Kaliumkanäle an glatten Muskelzellen zerebraler Gefäße mit bis zu 10 000 Kanälen pro Zelle (Nelson, M.T. und Quayle, J.M. 1995).

K_{Ca} können durch Tetraethylammonium in Konzentrationen von 1 mmol/l inhibiert werden. Andere Inhibitoren sind Iberiotoxin und Charybdotoxin, diese Toxine sind sehr selektiv für K_{Ca} (Nelson, M.T. und Quayle, J.M. 1995). Neben den pharmakologischen Inhibitoren der K_{Ca} werden auch pharmakologische Öffner in experimentellen Studien benutzt. Eine Substanz, die in vielen experimentellen Studien zum Aktivieren von K_{Ca} benutzt wird ist NS 1619.

In zerebralen Arterien ruft die Applikation von Inhibitoren dieser Kanäle in vitro und in vivo eine Kontraktion hervor, K_{Ca} scheinen also unter Ruhebedingungen aktiv zu sein. Insbesondere scheint der Einfluss in großen zerebralen Arterien wichtiger als in Arteriolen zu sein, weil hier durch Inhibitoren nur geringe Effekte hervorgerufen werden können (Faraci, F.M. und Heistad, D.D. 1998).

Neben der Beeinflussung des Ruhetonus scheinen diese Kanäle wichtig für die Vermittlung von Vasodilatation durch vielfältige andere Stimuli zu sein.

Adenylat-Cyclase vermittelte Vasodilatation kann durch die Inhibition von K_{Ca} verringert werden. Dies ist möglicherweise ein wichtiger Mechanismus in der Regulation des zerebrovaskulären Tonus, weil cAMP in Gefäßmuskelzellen durch vielfältige Stimuli erhöht wird, unter anderem Adenosin, Prostacyclin, CGRP, VIP und andere. Außerdem kann eine Relaxation der MCA durch Produkte des Arachidonsäure Metabolismus mit TEA inhibiert werden (Faraci, F.M. und Heistad, D.D. 1998).

Desweiteren wurde eine NO abhängige Modulation von K_{Ca} auf cGMP abhängigem und unabhängigem Weg gezeigt (Bolotina, V.M. et al. 1994; Archer, S.L. et al. 1994).

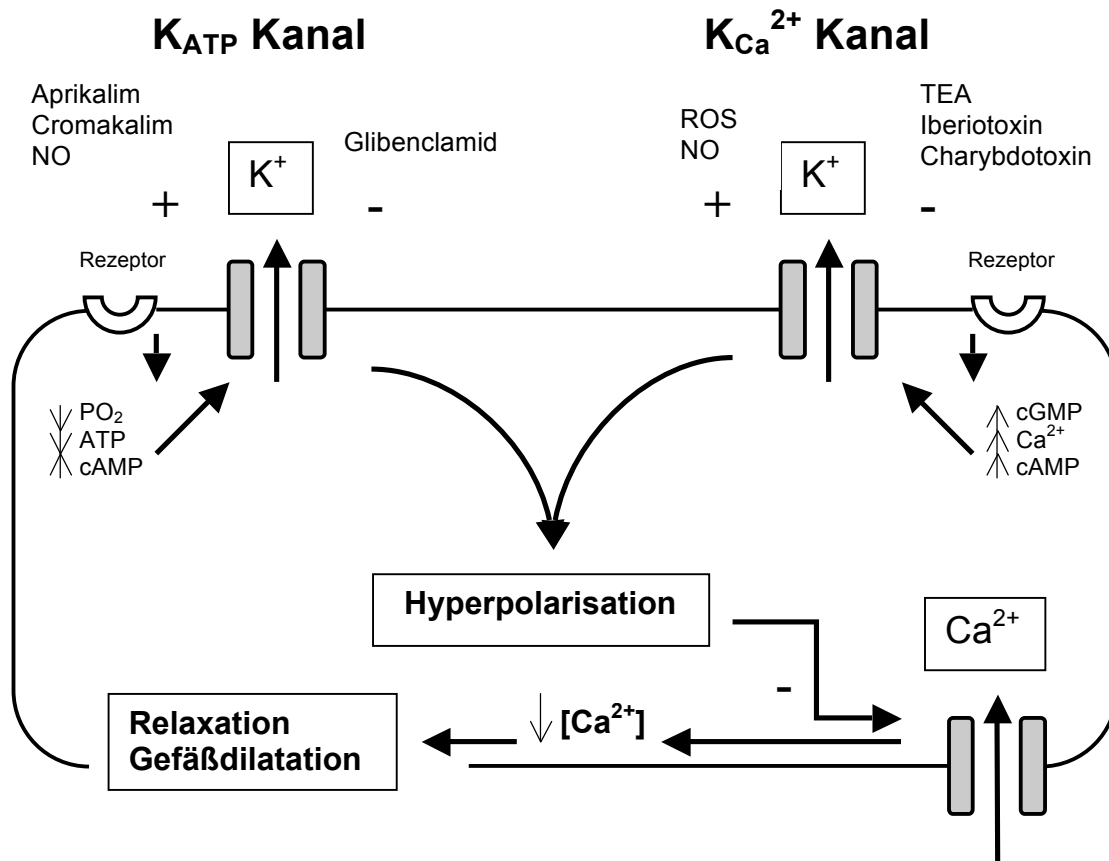


Abb.: 6

Schematische Darstellung der grundlegenden Funktionen von Calcium und ATP abhängigen Kaliumkanälen an der glatten Muskelzelle zerebraler Gefäße. Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit der Kaliumkanäle führt zur Hyperpolarisation der Zelle, Verminderung des Calcium Einstroms, konsekutiver Reduktion der intrazellulären Calcium Konzentration, Relaxation der Zelle und Dilatation des Gefäßes (nach Nelson, M.T. und Quayle, J.M. 1995; Faraci, F.M. und Heistad, D.D. 1998).

1.5.4.

ATP abhängige Kaliumkanäle repräsentieren den metabolischen Status der Zelle und können durch Sulfonylharnstoffe wie Glibenclamid inhibiert werden

ATP abhängige Kaliumkanäle (K_{ATP}) reagieren auf intrazelluläres ATP, das die Aktivität der Kanäle hemmt. Die Dissoziation von ATP vom Kanal resultiert in einer Öffnung des Kanals und damit in einer Hyperpolarisation der Membran. Außerdem öffnen andere metabolische Stimuli, wie Absinken von pH oder pCO_2 den Kanal und produzieren Vasorelaxationen. Es ist möglich K_{ATP} durch synthetische Stoffe wie Cromakalim und Aprikalim zu aktivieren (Faraci, F.M. und Heistad, D.D. 1998).

Die Aktivität von K_{ATP} kann durch Sulfonylharnstoffe, wie Glibenclamid inhibiert werden. In Konzentrationen unter $3 \mu\text{mol/l}$ ist Glibenclamid ein selektiver Inhibitor von K_{ATP} (Nelson, M.T. und Quayle, J.M. 1995).

Aktivierung von K_{ATP} verursacht Hyperpolarisation und Vasorelaxation von zerebralen Arterien, auch humanen Arterien in vitro. Diese Aktivierung ruft auch in vivo Dilatationen der A. basilaris und zerebraler Arteriolen hervor. Intraparenchymale Injektion von Cromakalim produziert eine Glibenclamid sensitive Steigerungen des lokalen zerebralen Blutflusses. Inhibition von K_{ATP} mit Glibenclamid hat keinen Einfluß auf den Ruhetonus zerebraler Arterien (Faraci, F.M. und Heistad, D.D. 1998). Zusammen mit K_{Ca} vermitteln K_{ATP} zerebrale Vasodilatation auf Azidose in vitro (Lindauer, U. et al. 2003). Im Gegensatz zu früheren Berichten zeigen jüngere Publikationen, dass K_{ATP} durch NO moduliert werden können (Han, J. et al. 2002; Shinbo, A. und Iijima, T. 1997). Möglicherweise spielen K_{ATP} eine Rolle in der Vermittlung zerebraler Vasodilatation nach Hypoxie, wenn es zu einer Reduktion des zellulären Metabolismus mit Absinken von intrazellulärem ATP kommt (wie z.B. nach zerebraler Ischämie).

1.5.5.

Einwärts Gleichrichter Kaliumkanäle vermitteln Vasodilatationen zerebraler Arterien auf physiologisch erhöhte Kaliumkonzentrationen und können durch Barium Ionen inhibiert werden

Einwärts Gleichrichter Kaliumkanäle (K_{IR}) werden im Gegensatz zu Calcium und spannungsabhängigen Kaliumkanälen durch Membranhyperpolarisation aktiviert. Diese Kaliumkanäle vermitteln einen auswärtsgerichteten hyperpolarisierenden Kaliumstrom und können durch Bariumionen inhibiert werden (Nelson, M.T. und Quayle, J.M. 1995; Faraci, F.M. und Heistad, D.D. 1998).

Wenig ist über die Funktion dieser Kanäle bekannt. K_{IR} spielen möglicherweise eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Vasodilatation auf geringe Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentrationen. Physiologische Erhöhungen der extrazellulären Kaliumkonzentration rufen eine Hyperpolarisation und Dilatation zerebraler Gefäße in-vitro hervor. Beide Effekte können durch Barium inhibiert werden, allerdings nicht durch eine Kombination aus TEA, 4-AP und Glibenclamid, sind also wahrscheinlich alleine durch K_{IR} vermittelt (Johnson, T.D. et al. 1998;

Quayle, J.M. et al. 1993; McCarron, J.G. und Halpern, W. 1990; Faraci, F.M. und Heistad, D.D. 1998).

Da Kaliumkonzentrationen bis 20 mM bei neuronaler Erregung auftreten spielen K_{IR} möglicher Weise eine wichtige Rolle in der Vermittlung neurovaskulärer Kopplung. K_{IR} sind außerdem an der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials beteiligt (Quayle, J.M. et al. 1993).

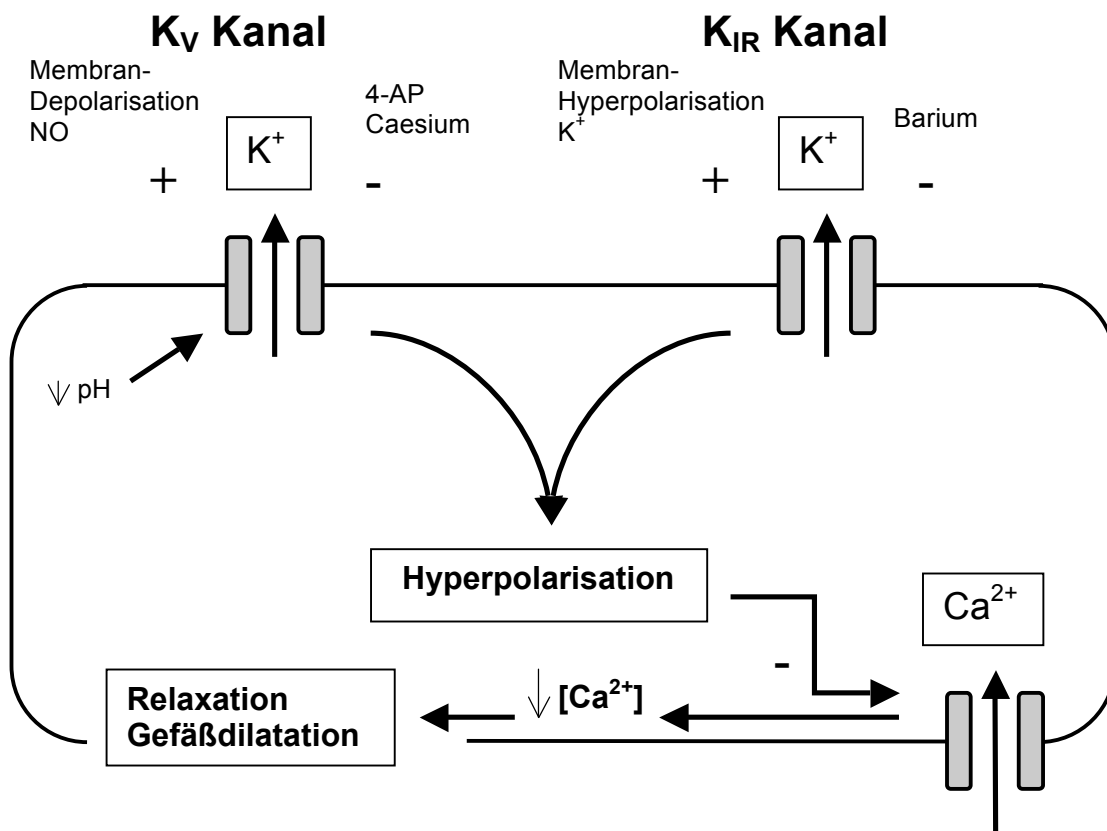


Abb.: 7
Schematische Darstellung der grundlegenden Funktionen von spannungsabhängigen und einwärts gleichrichtenden Kaliumkanälen an der glatten Muskelzelle zerebraler Gefäße (nach Nelson, M.T. und Quayle, J.M. 1995; Faraci, F.M. und Heistad, D.D. 1998).

1.5.6.

Spannungsabhängige Kaliumkanäle beeinflussen den Ruhetonus zerebraler Arterien und können durch 4-AP inhibiert werden

Über die genaue Funktion spannungsabhängiger Kaliumkanäle (K_v) ist vergleichsweise wenig bekannt. Die Öffnungswahrscheinlichkeit von K_v erhöht sich bei Membrandepolarisation mit dem Resultat eines Auswärtsstroms, wodurch das Membranpotential wieder zum Ruhepotential zurückkehrt. K_v scheinen also ein negativer Feedback Mechanismus zur Regulation des Membranpotentials zu sein (Faraci,F.M. und Heistad,D.D. 1998).

Wie K_{Ca} scheinen K_v an der Regulation des Ruhemembranpotentials und an der Gefäßantwort auf Veränderungen des arteriellen Drucks beteiligt zu sein. 4 AP, ein Antagonist der K_v , depolarisiert die glatte Muskelzelle zerebraler Gefäße und führt zu einer Vasokonstriktion. Dies läßt darauf schließen, daß die Aktivität von K_v für die Aufrechterhaltung des Ruhetonus in zerebralen Gefäßen eine wichtige Rolle spielt (Faraci,F.M. und Sobey,C.G. 1998). Die Reduktion des intrazellulären pH erhöht den Strom durch K_v . Eine Beteiligung an der Vasodilatation auf Azidose in-vitro konnte jedoch nicht gezeigt werden (Lindauer,U. et al. 2003). In pulmonaler Gefäßmuskulatur aktiviert NO die K_v . Es ist nicht bekannt, ob ähnliche Mechanismen zur NO vermittelten Vasodilatation zerebraler Gefäße beitragen (Faraci,F.M. und Heistad,D.D. 1998).

1.6.

Zusammenfassung

NO ist ein Vasodilatator und ein Modulator der zerebralen Gefäßreaktion. Ein basaler NO/cGMP Spiegel ist notwendig, um den Ruhetonus der zerebralen Arterien aufrechtzuerhalten. Die vasodilatative Wirkung von NO wird vornehmlich über den cGMP Weg vermittelt. NO kann die Aktivität bestimmter Kaliumkanal Gruppen jedoch auch über direkte Nitrosylierung oder über cGMP-abhängige Phosphorylierung verändern.

Kalium ist ein möglicher Mediator neurovaskulärer Kopplung. Extrazelluläre Kaliumkonzentrationen verändern sich in physiologischen und pathophysiologischen Situationen im Gehirn. Viele dieser Situationen gehen mit einer Änderung des

Durchmessers von Arteriolen und Arterien und des zerebralen Blutflusses einher - mit entscheidenden Konsequenzen:

Ein Anstieg des Blutflusses bedeutet eine verstärkte Versorgung der Nervenzellen mit Glucose und Sauerstoff und einen verbesserten Abtransport von Abfallprodukten des Stoffwechsels. Ein physiologischer Anstieg des Blutflusses ist als Korrelat neurovaskulärer Kopplung die Grundlage funktioneller Bildgebung. Eine Verminderung des Blutflusses kann einen Untergang von Neuronen bedeuten. Dies geschieht in bestimmten pathophysiologischen Situationen wie z.B. während SAB oder zerebralem Trauma. Unter anderem kommt es in diesen Situationen zu einem pathophysiologischen Anstieg extrazellulärerer Kalium Konzentrationen.

Die Vermittlung von Gefäßreaktionen bei physiologisch erhöhten Kaliumkonzentrationen ist wahrscheinlich ausschließlich durch K_{IR} vermittelt. Welche und ob Kaliumkanäle bei der Vermittlung der Reaktion auf pathophysiologische Kalium Konzentrationen eine Rolle spielen ist nicht bekannt. Desweiteren ist nicht bekannt, welche Rolle NO in der Vermittlung der Gefäßreaktion auf pathophysiologische Kaliumkonzentrationen spielt.

1.7.

Hypothesen

Auf der Grundlage dieser Kenntnisse lassen sich folgende Hypothesen formulieren, die in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung des Modells der isolierten MCA der Ratte auf ihre Gültigkeit hin überprüft wurden:

- 1) NO spielt eine Rolle in der zerebrovaskulären Reaktion auf physiologisch und pathophysiologisch erhöhte Kaliumkonzentrationen
- 2) Der Effekt von NO wird durch das cGMP System vermittelt
- 3) NO hat dabei die Rolle eines Modulators der neurovaskulären Kopplung und nicht die eines Mediators
- 4) Die zerebrovaskuläre Reaktion auf physiologisch erhöhte Kaliumkonzentrationen im Modell der isolierten Ratten MCA wird durch K_{IR} Kanäle vermittelt
- 5) Das Zusammenspiel weiterer Kaliumkanäle spielt eine Rolle in der Vermittlung der zerebrovaskulären Reaktion auf pathophysiologisch erhöhte Kaliumkonzentrationen

Anmerkung:

Zu Hypothese 1 und Hypothese 3 gab es zum Zeitpunkt der Durchführung der hier dargestellten Studien bereits Vorbefunde von der in der Abteilung arbeitenden Doktorandin Renate Brodowsky. Sie konnte in Pilotexperimenten zeigen, dass NO für die Vasodilatation auf pathophysiologisch erhöhte Kaliumkonzentrationen von Bedeutung ist, dass die reduzierte Dilatation auf 40mM K^+ unter NOS Blockade durch Zugabe eines NO-Donors wiederhergestellt werden kann und dass für die Vasodilatation auf die Kaliumkonzentration von 20mM alleinig K_{IR} -Kanäle verantwortlich sind. Die Dissertation ist bisher nicht eingereicht. Um die weiterführenden Untersuchungen, die wesentliche Grundlage der Beantwortung der oben dargestellten Hypothesen waren, sinnvoll durchzuführen und mit gründlichen Kontrollexperimenten auszustatten, wurden vom Autor vorliegender Arbeit alle relevanten Experimente wiederholt. Die im Ergebnisteil dargestellten Daten sind alleinig vom Autor dieser Arbeit erarbeitet worden und sind somit keine Kopien anderer Arbeiten.

2. Material und Methoden

2.1.

Das Modell der isolierten MCA eignet sich besonders zur Untersuchung lokaler Mechanismen der Vasoreaktivität

Für die vorliegenden Experimente zur Gefäßreaktivität auf physiologische und pathophysiologische Kaliumkonzentrationen wurde das Modell der isolierten MCA der Ratte gewählt. Das Modell wurde von Dacey und Duling entwickelt und von Bryan et. al modifiziert (Dacey, R.G., Duling, B.R., 1982; Bryan,R.M., Jr. et al. 1996). Es handelt sich um einen in-vitro Aufbau, bei dem die vom Gehirn isolierte Arterie ohne pharmakologische Beeinflussung allein durch den hydrostatischen Aufbau des transmuralen Druckes einen spontanen Ruhetonus entwickelt (Bryan,R.M., Jr. et al. 1996). Die Präparation trennt das Gefäß vom umgebenden Parenchym, bewahrt jedoch das perivaskuläre Nervengeflecht (Ignacio,C.S. et al. 1997; Lindauer,U. et al. 2001).

Zur Untersuchung der grundlegenden Mechanismen von Gefäßreaktionen auf unterschiedliche experimentelle Parameter eignen sich in-vitro Modelle besonders. Gegenüber in-vivo Modellen sind insbesondere zwei technische Vorteile dieses Modells zur Untersuchung der Fragestellung von Bedeutung:

Zum einen lassen sich aufgrund der Trennung vom Parenchym Gefäßreaktionen unabhängig vom umgebenden Gehirn untersuchen. Insbesondere für Untersuchungen, die das Zusammenspiel von Endothel, glatter Muskulatur und perivaskulären Nerven betreffen, lassen sich Einflüsse durch das umgebende Parenchym so ausschließen. Die Interaktion von Gliazellen, Neuronen und anderen Faktoren in in-vivo Modellen bereitet bei der Untersuchung grundlegender lokaler Mechanismen häufig Schwierigkeiten (Faraci,F.M. und Sobey,C.G. 1998).

Der zweite Vorteil gegenüber in-vivo Modellen besteht in der Möglichkeit der gezielten lokalen Änderung einzelner experimenteller Parameter. So können relativ einfache Änderungen der Elektrolytkonzentrationen vorgenommen werden oder intra- und extraluminal Pharmaka verabreicht werden, ohne die Beeinflussung der Experimente durch mögliche systemische Reaktionen.

Desweiteren bietet das Modell Vorteile gegenüber anderen in-vitro Modellen zur Untersuchung von Gefäßreaktionen. Als Beispiel seien die häufig verwendeten Arterienring-Präparate angeführt. Im Modell der isolierten und kannülierten MCA baut das Gefäß durch den hydrostatischen Aufbau des transmuralen Druckes einen spontanen Ruhetonus auf (Johnson, T.D. et al. 1998). Es ist keine pharmakologische Vorkontraktion notwendig, wie dies bei Arterienringpräparaten der Fall ist (bspw. durch bestimmte Prostaglandine). Durch die Perfusion des Gefäßes bleibt außerdem die Trennung von intra- und extraluminalen Raum erhalten, was die intra- und extraluminal getrennte Gabe von Pharmaka ermöglicht.

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none">• Spontaner Ruhetonus• Keine pharmakologische Vorkontraktion• Isoliert vom Hirnparenchym• Perivaskuläre Neurone erhalten• Möglichkeit intra-/extraluminale Pharmaka-Applikation	<ul style="list-style-type: none">• Isoliert vom Hirnparenchym

Abb.: 8

Vor- und Nachteile des Modells der isolierten MCA der Ratte.

Aus den Vorteilen des Modells folgt der Nachteil nämlich ebenfalls die Trennung vom umgebenden Hirnparenchym. Es lassen sich nur Mechanismen, die die lokale Regulation der Vasoreaktivität betreffen, untersuchen.

Da in den vorliegenden Experimenten lokale Mechanismen der Vasoreaktivität untersucht wurden, ist dieser Nachteil hier von untergeordneter Bedeutung, spielt jedoch eine Rolle für die Interpretation der Ergebnisse vor dem Hintergrund der Gesamtsituation.

Durch die Einordnung der Ergebnisse in den Kontext von in-vivo Experimenten, ergänzen sich die Methoden in Ihren Vorteilen. Es können durch die lokal-mechanistischen Erkenntnisse der in-vitro Versuche Erklärungsmodelle für (patho)physiologische Phänomene aus dem in-vivo Modell generiert werden.

2.2.

Ziel des experimentellen Aufbaus ist die Isolierung und Perfusion der MCA unter Erhaltung der Gefäßreaktivität

Der Versuchsaufbau lässt sich in vier Schritte einteilen. Ziel ist eine isolierte, kontinuierlich perfundierte MCA, die einen spontanen Ruhetonus aufbaut und positiv auf Standardstimuli reagiert:

1. Hirnpräparation
2. Präparation der Arterie
3. Druckaufbau und Äquilibration
4. Standardstimuli/Reaktionen

Zusammensetzung des intra- und extraluminalen Puffers

Intra- und extraluminal bzw. für die Präparation wurde eine 3-(N-morpholino)propanosulfonsäure (MOPS) gepufferte Salzlösung verwendet, bestehend aus folgenden Substanzen (in mM):

144 NaCl; 3,0 KCl; 2,5 CaCl₂; 1,5 MgSO₄; 1,21 NaH₂PO₄; 0,02 EDTA; 2,0 Pyruvat; 2,0 MOPS; 5,0 Glucose

Der intraluminale bzw. zur Präparation verwendete Puffer enthielt zusätzlich 1 % dialysiertes, bovines Serumalbumin („Albuminpuffer“). Dies dient dem Schutz des Endothels und der zellulären Matrix (Duling, R.M., Rivers, R.J. 1986). Die Pufferlösung wurde vor jedem Experiment mit bidestilliertem Wasser angesetzt. Vor Beginn der Experimente erfolgte die Titrierung mit NaOH auf einen PH von $7,4 \pm 0,02$.

Anschließend an eine tiefe Halothan Narkose erfolgt die Entnahme des Gehirns in einem Zeitfenster < 5 min.

Männliche Wistar Ratten (260-350g) wurden in 4 % Halothan narkotisiert und nach Erreichen der notwendigen Narkosetiefe mittels einer Kleintierguillotine dekapitiert.

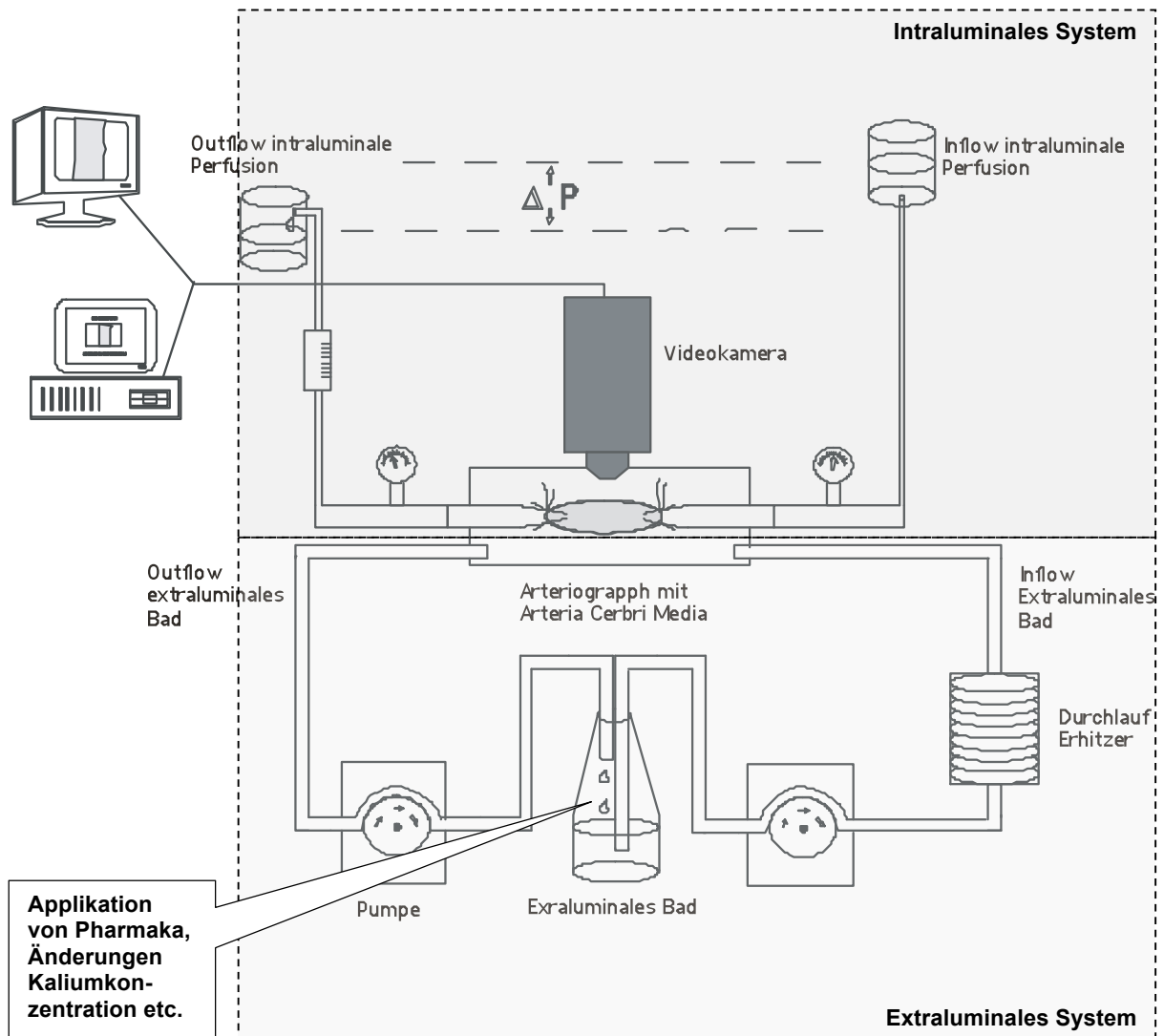


Abb.: 9

Versuchsaufbau:

Ein ca. 1-2 mm langes, abgangsfreies Stück der MCA befindet sich in der Kammer des Arteriographen, aufgezogen auf zwei Glaspipetten und befestigt durch die Ligatur auf jeder Seite. Die Glaspipetten sind verbunden mit einem Schlauchsystem, in dem sich der **intraluminale** Puffer befindet; MOPS gepufferte Salzlösung mit 1 % dialysiertem bovinem Serum Albumin. Über dieses Schlauchsystem läßt sich der intraluminale Fluß, sowie der transmurale Druck im Gefäß hydrostatisch aufbauen und kontrollieren, indem inflow und outflow Gefäße entsprechend hoch über das Niveau der Arterie gebracht werden und der Druck über eine Drucksonde gemessen wird. Der **extraluminale** Puffer gelangt über ein zweites Schlauchsystem in die Kammer. In diesem System zirkuliert der Puffer mit Hilfe einer Pumpe und wird über einen Durchlauferhitzer entsprechend erwärmt. Je nach Versuchsdesign ist es möglich, Pharmaka extraluminal bzw. Intraluminal zu applizieren, bzw. die Zusammensetzung der Puffer zu variieren und damit das Milieu im oder um das Gefäß zu verändern. Der Arteriograph wird auf einem inversen Mikroskop plaziert, das an eine Videokamera gekoppelt ist, die wiederum mit einem Monitor und einem Computer verbunden ist. Die Reaktion der Arterie wird anhand des luminalen Durchmessers direkt am Bildschirm gemessen bzw. können Bilder einzelner Reaktionen für spätere Analysen im Computer gespeichert werden.

Die Kopfschwarte wurde mit einem Skalpell durchtrennt und das gesamte Neurokranium von der Muskulatur befreit. Mit einer von kaudal eingeführten Knochenzange wurde die Occipitalschuppe entfernt. Mit zwei von dorsal eingeführten Klemmen erfolgte die Entfernung der Parietalknochen nach lateral und Exposition des Großhirns. Das Gehirn wurde mit einer anatomischen Pinzette vom Hirnstamm und Kleinhirn aus mobilisiert und direkt in eine Petrischale mit 4°C kaltem Albuminpuffer überführt. Das gesamte Gewebe war von Pufferlösung bedeckt.

Das Großhirn und die beiden Aa. cerebri mediae wurden während der Präparation nicht berührt. Die Dauer der Präparation von Dekapitation bis Überführung in 4 °C kalte Lösung lag bei allen verwendeten Arterien unter 5 min.

Die Präparation der Arterie erfolgte mikrochirurgisch unter dem Präparationsmikroskop in 4°C kaltem Albuminpuffer

Nach Präparation des Gehirns erfolgte die Präparation eines ca. 2 mm langen Arterienstückes. Es wurde nur der Hauptstamm der A. cerebri media verwendet. Sämtliche folgende Arbeitsschritte erfolgten mikrochirurgisch unter dem Präparationsmikroskop.

Mit einer Mikroschere wurde beginnend am Circulus arteriosus Willisii das umliegende piale Bindegewebe in gebührendem Abstand zum Gefäß vom Parenchym sowie die Arterie selber von den distalen und proximalen Gefäßverbindungen getrennt.

Mit einer Pinzette erfolgte die Mobilisation des Gefäßes zusammen mit dem umliegenden Bindegewebe. In einer mit Pufferlösung gefüllten Petrischale wurde das Gefäß stumpf vom Bindegewebe befreit und daraufhin mit einer großlumigen Pipette in die ebenfalls mit 4 °C Albuminpuffer gefüllte Kammer des Arteriographen überführt. Entsprechend der Fließrichtung wurden proximal und distal Glaskapillaren zur Perfusion eingeführt, sodass zwischen den Kapillaren ein abgangsfreier Messbereich von ca. 1-2 mm entstand. Das Gefäß wurde distal und proximal mit einer Ligatur befestigt.

Während einer einstündigen Äquilibrationsphase baute die Arterie einen spontanen Ruhetonus auf

Im Anschluß an die Präparation der Arterie wurde der transmurale Druck im Gefäß über ca. 15 min. bis auf 80 mmHg hydrostatisch aufgebaut, indem Inflow und Outflow Gefäße langsam unter kontinuierlicher Druckmessung über das Niveau der Arterie erhöht wurden. Mit einem Durchlauferhitzer wurde anschließend das extraluminale Pufferbad auf 37°C erwärmt und mit einer Rate von ca. 20 ml/min. erneuert.

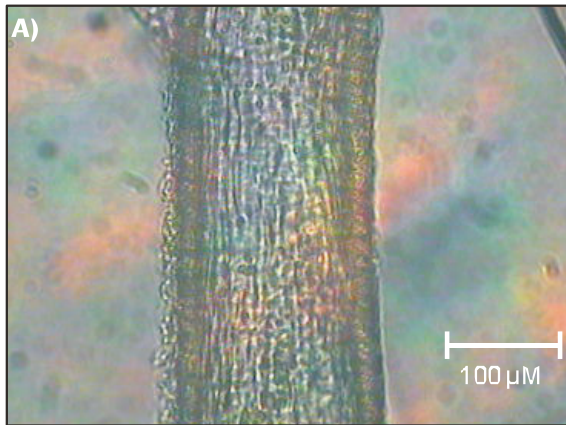
Während der folgenden Äquilibrationsphase von 1 h erholte sich das Gefäß von der Präparation und entwickelte unter hydrostatischem Druckaufbau ohne pharmakologische Beeinflussung einen spontanen Ruhetonus. Es wurden nur Gefäße für Experimente zugelassen, die eine Reduktion des Durchmessers von mindestens 30% verglichen mit dem Durchmesser direkt vor der Äquilibrationsphase aufwiesen.

Die Funktion jedes für Experimente verwendeten Gefäßes wurde mit Testreaktionen überprüft

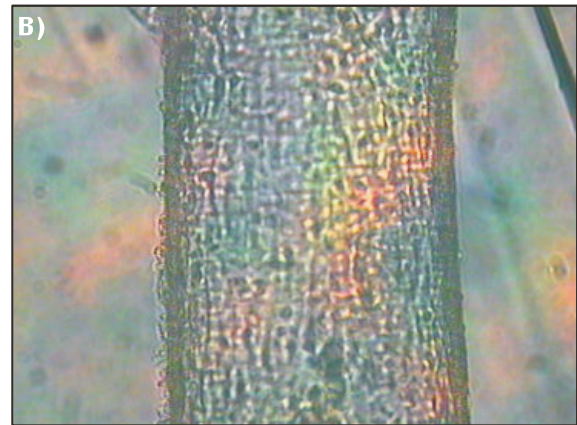
Messparameter bei allen folgenden Experimenten war der intraluminale Durchmesser der Gefäße in Mikrometern. Vor Beginn der Experimente wurde die Funktion jedes Gefäßes anhand der Reaktion auf eine Erhöhung der extraluminale Kaliumkonzentration auf 20 mM über einen Zeitraum von 10 min. überprüft. Die Testreaktion wurde 1-2 Mal mit intermittierender 15 min. Auswaschphase durchgeführt.

Es wurden nur Gefäße zum Experiment zugelassen, die in der Testreaktion auf 20 mM K⁺ eine Dilatation von mind. 30% verglichen mit dem Ruhetonus zeigten.

Tonusaufbau und Reaktion auf 20 mM K⁺ sind in der Literatur anerkannte Merkmale einer intakten Gefäßfunktion (Bryan, R.M., Jr. et al. 1996b; Johnson, T.D. et al. 1998)



Arteria Cerebri Media
Extraluminale Kaliumkonzentration 3 mM



Arteria Cerebri Media
Extraluminale Kaliumkonzentration 20 mM

Abb.: 10

Bildschirmfotos einer MCA während der Testreaktion auf erhöhte extraluminale Kaliumkonzentrationen. Bild A zeigt das Gefäß nach Abschluß der Äquilibrationsphase. Die extraluminale Kaliumkonzentration beträgt 3 mM, das Gefäß hat einen spontanen Ruhetonus aufgebaut. In Bild B sieht man das Gefäß nach Erhöhung der extraluminale Kaliumkonzentration auf 20 mM. Es kommt zu einer deutlichen Dilatation der Arterie. Spontane Ausbildung eines Ruhetonus sowie Dilatation auf erhöhte Kaliumkonzentrationen sind Zeichen der erhaltenen Vasoreaktivität nach der Präparation.

t/min.

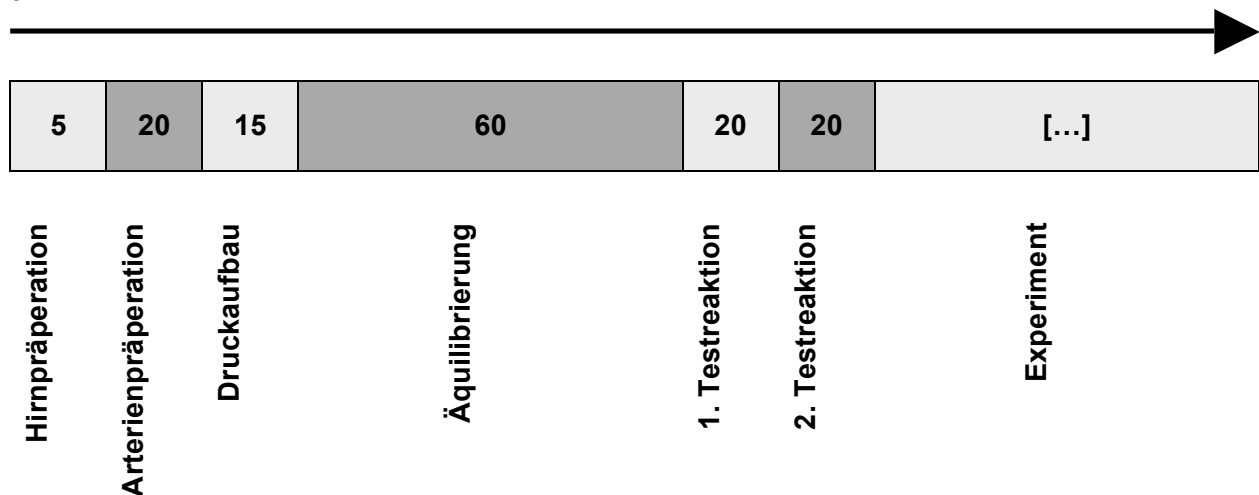


Abb.: 11

Dargestellt ist der schematische zeitliche Ablauf von Präparation, Testreaktion und Experiment. Präparation und Testreaktionen sind als Teil des Versuchsaufbaus für jedes Experiment identisch während das eigentliche Experiment je nach Ablauf und Fragestellung in der zeitlichen Ausdehnung variiert. Die Zahlenwerte stellen Zeit in min. dar.

2.3.

Angaben zu den verwendeten Puffersubstanzen sowie den Lösungsmitteln Ethanol und DMSO

Sämtliche Substanzen, die in den folgenden Experimenten verwendet wurden, wurden extraluminal appliziert. Experimenteller Parameter war der intraluminale Durchmesser des Gefäßes. Die Messung erfolgte jeweils am Ende der Ein/Auswaschphase. Die Dauer der einzelnen Kaliumkonzentrationsstufen betrug jeweils 10 min. bzw. unter Ruhebedingungen (3 mM K^+) 15 min.. Pharmaka wurden jeweils 20 min. vor Beginn einer Kaliumreihe eingewaschen, falls nicht anders angegeben. Während Erhöhung der Kaliumkonzentration erfolgte keine gleichartige Reduktion der Natriumkonzentration. Die Messungen erfolgten also unter hyperosmolaren Bedingungen, wie sie unter pathologischen Situationen beobachtet werden (Golding, E.M. et al. 2000; Katayama, Y. et al. 1990). Während der gesamten Experimente wurden Temperatur, Druck, intraluminale Flußgeschwindigkeit und pH kontinuierlich überwacht und konstant gehalten.

Die benutzten Pharmaka wurden in der MOPS Pufferlösung bzw. destilliertem Wasser, Ethanol oder DMSO gelöst.

In früheren Arbeiten wurde ein möglicher Effekt von MOPS in höheren Konzentrationen (5mM) auf die Reaktion glatter Gefäßmuskelzellen beschrieben (Altura, B.M. et al. 1980). Die in diesem Modell verwendete Konzentration 2 mM führte zu einem vergleichbaren Aufbau des Ruhetonus verglichen mit Bikarbonat-gepufferten Systemen, sodaß die mögliche Abschwächung vaskulärer Reaktionen durch MOPS in diesem Modell nicht zu beobachten war.

Einige verwendete Substanzen wurden in Ethanol (0,1%) gelöst. In anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass Ethanol in geringen Konzentrationen (0.01-0.075%) zu einem inhibitorischen Effekt auf K_{ATP} führen kann, der bei höheren Konzentrationen wieder verschwindet (Rosenblum, W.I. et al. 2001b). Auf Grund der in den vorliegenden Experimenten höheren Ethanolkonzentrationen sowie der zu Literaturdaten vergleichbaren Reaktion der Gefäße auf Pinacidil (ein spezifischer K_{ATP} Öffner) spielt dieser Effekt hier keine Rolle (Zimmermann, P.A. et al. 1997).

Analog wurde von DMSO eine Inhibition auf Hydroxyl vermittelte Dilatation pialer Arterien sowie Beeinflussung der Aktivität von K_{ATP} beschrieben (Rosenblum, W.I. et al. 2001b; Rosenblum, W.I. 1983). In den Vehikelversuchen zeigte sich keine

Beeinflussung der Reaktion auf Veränderungen der extraluminale Kaliumkonzentration nach Einwaschen von DMSO in beschriebener Konzentration. Eine Beeinflussung der Experimente durch DMSO ist demnach ausgeschlossen.

2.4.

Statistik

Es wurde von jedem Tier nur eine MCA verwendet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte bei normalverteilten Daten mit einer Repeated Measures ANOVA, gefolgt von einem post-hoc Test nach Bonferroni im Falle statistisch signifikanter Unterschiede ($P < 0,05$). Im Falle nicht normalverteilter Daten wurde eine Friedmann'sche Varianzanalyse nach Rängen angewandt, gefolgt von einem post-hoc Test nach Student Newman Keuls bei signifikanten Unterschieden. Unabhängige Versuchsreihen wurden mit einer ANOVA für unabhängige Strichproben untersucht, bei signifikanten Unterschieden ebenfalls gefolgt von einem post-hoc Test nach Student Newman Keuls. Die Auswertung erfolgt mit der Software Sigma Stat 2.03 (SPSS).

2.5.

Materialien, Pharmaka, Chemikalien, Tiere

Herkunft der verwendeten Pharmaka, Chemikalien, Tiere und Materialien

Chemikalien

Natriumchlorid	}	Sigma
Kaliumchlorid		
Calciumchlorid		
Pyruvat		
Glucose		
Natriumphosphat		
EDTA		
Magnesiumsulfat		
3-(N-morphosolino)propansulfonsäure (MOPS)		
DMSO		
Ethanol	Merck	
dialysiertes bovines Serumalbumin	Sigma	
Aqua bidest.	Braun	

Tiere

Männliche Wistar Ratten (260-350g); Die Tiere wurden von Charles River Labs (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und bis zur Tötung in der Tierhaltung der experimentellen Neurologie gehalten (AZ der Behörde: ZH106). Die Tötung erfolgte nach Anzeige beim Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (AZ der Behörde: T0032/99).

Narkose	Halothan 4%, Sauerstoff 96% durch Halothan Vapor, Dräger
---------	--

Pharmaka

TEA	}	Sigma
Glibenclamid		
Bariumchlorid		
4-AP		
8-Bromo-cGMP		
ODQ		
LNNA		
Papaverin		
Nimodipin		
Pinacidil		
NS1619		
SNAP	RBI	

Materialien, Geräte

Schläuche	Novodirekt und Cole Palmer
Arteriograph	Living Systems
Mikroskop	Leica
Arbeitsmikroskop	Leica M3Z
Glaskapillaren	World Precision Instruments
Präparationsbesteck	Fine Science Tools
Kamera, Monitor	JVC und Sony
Pumpe	Cole Palmer
Durchlauferhitzer	MLW
Druckmesser	Hellige
Micropipette puller	Sutter Instr. Co

2.6.

Experimentelles Design

Gruppe I-II: Reaktion des Gefäßes auf physiologische und pathophysiologische Kaliumkonzentrationen:

Kontrollgruppen/Zeitkontrollen:

I) Reaktion auf kumulativ ansteigende extraluminale $[K^+]$

Es wurde die Reaktion des Gefäßes auf extraluminale Erhöhung der Kaliumkonzentration untersucht. Die Erhöhung der Kaliumkonzentrationen erfolgte kumulativ, d.h. zwischen den einzelnen Schritten erfolgte keine Rückkehr zu Ruhebedingungen. Jede Konzentrationsstufe wurde für 10 min. eingewaschen, die Messung erfolgte am Ende der Einwaschphase.

Dieses Vorgehen wurde bei sämtlichen hier vorliegenden Kaliumreihen gewählt. $[K^+]_e$: 3 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM; n=5

II) Reaktion auf repetitive Kaliumreihen

Zum Ausschluß einer Veränderung der Gefäßreaktion durch repetitive Experimente wurde zweimal aufeinanderfolgend eine kumulative Kaliumreihe nach oben beschriebenem Schema am gleichen Gefäß durchgeführt. Zwischen beiden Reihen lag eine Äquilibrierungsphase von 15 min. $[K^+]_e$: 3 mM, 12 mM, 20 mM, 40 mM; n=6 (Zeitkontrollgruppe)

Gruppe III-IV: Beteiligung des NO/cGMP Systems:

Hypothese: „NO spielt eine Rolle in der zerebrovaskulären Reaktion auf physiologisch und pathophysiologisch erhöhte Kaliumkonzentrationen“

III) Unspezifische NOS-Blockade durch LNNA

Es wurde eine Kaliumreihe unter gleichzeitiger NOS-Blockade mit LNNA (Konzentration=10 µM) durchgeführt. Die Substanz wurde in MOPS Puffer gelöst. Mit LNNA wird eine irreversible, suffiziente, unspezifische Blockade der NOS Isoformen erreicht (Faraci,F.M. und Heistad,D.D. 1998). Vor Beginn der Kaliumreihen wurde die Substanz für 20 min. extraluminal eingewaschen und verblieb für den Rest des Experimentes im System. $[K^+]_e$: 3 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM; n=5

Hypothese: „Der Effekt von NO wird durch das cGMP System vermittelt“

IV) Spezifische Inhibition der löslichen Guanylatcyclase mit ODQ

Im Anschluß an eine Kontrollreihe wurde eine Kaliumreihe unter Inhibition der sGC mit ODQ (Konzentration 10 µM) durchgeführt. Die Substanz wurde in 0,5 ml DMSO gelöst. ODQ erzeugt eine spezifische Blockade der sGC (Zhao,Y. et al. 2000; Sobey,C.G. und Faraci,F.M. 1997). $[K^+]_e$: 12 mM, 20 mM, 40 mM: n=6

Gruppe V-VII: Mediator/Modulatorfunktion von NO

Hypothese: „NO hat dabei die Rolle eines Modulators der neurovaskulären Kopplung und nicht die eines Mediators“

V) Applikation von 8-Bromo-cGMP während unspezifischer NOS-Blockade

Im Anschluß an eine Kontrollreihe wurde eine Kaliumreihe unter NOS-Blockade durchgeführt und darauf unter weiter bestehender NOS Blockade 8-Bromo-cGMP (Konzentration 3-7,5 µM) hinzugefügt. Es wurde hierbei die Konzentration gewählt, die notwendig war, um den durch NOS Blockade verminderten Ruhetonus wiederherzustellen. Die Konzentration wurde hierzu individuell angepasst. In 6 Experimenten wurde der Ruhetonus durch eine Konzentration von 3 µM wiederhergestellt in 3 Experimenten war die höhere Konzentration von 7,5 µM

notwendig. 8-Bromo-cGMP wurde jeweils 20 min. vor Beginn der Kaliumreihe eingewaschen und verblieb für die Dauer des Experimentes im System.

[K⁺]_e: 20 mM, 40 mM; n=9

VI) Applikation von NO durch SNAP während unspezifischer NOS-Blockade

VII) Applikation von Nimodipin während unspezifischer NOS-Blockade

Im Anschluß an eine Kontrollreihe wurde eine Kaliumreihe unter unspezifischer NOS Blockade durchgeführt und darauf unter weiter bestehender NOS Blockade NO durch die Substanz SNAP (NO-Donor, Konzentration= $2,5 \times 10^{-7}$ M; Experiment VI) appliziert bzw. der NO unabhängige Vasodilatoren Nimodipin (Konzentration 30 nM; Experiment VII) hinzugefügt. Die Konzentration wurde anhand der Wiederherstellung des durch NOS Blockade verminderten Ruhetonus titriert. Die Lösung von Nimodipin erfolgte in Ethanol. In Experiment VI wurde durch kontinuierliche Erneuerung der Substanz ein gleichbleibender NO Spiegel aufrechterhalten.

[K⁺]_e: 20 mM, 40 mM; VI n=5; VII n=7;

Gruppe VIII-XVIII: Beteiligung einzelner sowie Kombinationen unterschiedlicher Kaliumkanalfamilien

Hypothese: „Die zerebrovaskuläre Reaktion auf physiologisch erhöhte Kaliumkonzentrationen im Modell der isolierten MCA wird durch K_{IR} vermittelt“

Hypothese: „Das Zusammenspiel weiterer Kaliumkanäle spielt eine Rolle in der Vermittlung der zerebrovaskulären Reaktion auf pathophysiologisch erhöhte Kaliumkonzentrationen“

VIII) Blockade von K_{ATP} mit Glibenclamid

IX) Blockade von K_V mit 4-AP

X) Blockade von K_{Ca} mit TEA

XI) Blockade von K_{IR} mit BaCl₂

XII) Blockade K_{IR} mit 400µM BaCl₂

XIII) Kombinierte Blockade von K_{ATP} und K_{IR}

- XIV) Kombinierte Blockade von K_{ATP} und K_{Ca}**
- XV) Kombinierte Blockade von K_{ATP} und K_V**
- XVI) Kombinierte Blockade von K_{Ca} und K_V**
- XVII) Kombinierte Blockade von K_{Ca} , K_{ATP} und K_{IR}**
- XVIII) Kombinierte Blockade von K_{Ca} , K_{ATP} , K_V und K_{IR}**

Im Anschluß an eine Kontrollreihe wurde eine Kaliumreihe unter Blockade unterschiedlicher einzelner Kaliumkanalfamilien durchgeführt.

TEA ist in einer Konzentration von < 10 mM ein spezifischer Inhibitor von K_{Ca} . In den vorliegenden Experimenten wurde die Konzentration 1 mM verwendet, in der ein suffizienter Block von K_{Ca} zu erwarten ist ohne Inhibition anderer Kaliumkanalfamilien. 4-AP ist in der hier verwendeten Konzentration von 1 mM ein spezifischer Inhibitor von K_V . Eine zusätzliche Inhibition von K_{ATP} ist jedoch nicht vollständig auszuschließen (Nelson, M.T. und Quayle, J.M. 1995). Glibenclamid ist ein spezifischer Inhibitor von K_{ATP} . Es wurde die Konzentration 10 μ M verwendet, die Lösung erfolgte in Ethanol. $BaCl_2$ ist in der hier verwendeten Konzentration von 140 μ M ein weitestgehend spezifischer Inhibitor von K_{IR} . Eine geringfügige Inhibition von K_{ATP} ist in dieser Konzentration jedoch nicht vollständig auszuschließen (Nelson, M.T. und Quayle, J.M. 1995). Nach Blockade einzelner Kaliumkanalfamilien erfolgten Experimente unter kombinierter Blockade mehrerer Kaliumkanalfamilien. Ablauf und Konzentration der Pharmaka wurde (außer in Experiment XIII [$BaCl_2$]) nicht verändert. Experimente XIV-XVI stellen mit je $n=1$ Screening Versuche zu einzelnen, kombinierten Kanal inhibitionen dar. Die Versuche wurden der Vollständigkeit wegen dargestellt. Es erfolgte keine weitere Auswertung der Experimente XIV-XVI.

$[K^+]_e$: 12 mM, 20 mM, 40 mM; IX-XII je $n=6$; XIII $n=3$; XIII $n=4$; XIV-XVI je $n=1$; XVII und XVIII je $n=5$.

Gruppe XIX-XXII: Vehikelversuche und Nachweis Kaliumkanalblockade

- XIX) Einfluss von DMSO auf die Gefäßreaktion**
- XX) Einfluss von Ethanol auf die Gefäßreaktion**
- XXI) Nachweis der spezifischen Blockade ATP abhängiger Kaliumkanäle durch Glibenclamid mit Pinacidil**

XXII) Nachweis der spezifischen Blockade calciumabhängiger Kaliumkanäle durch TEA mit NS1619

Die in den Gruppen XIX-XXII durchgeführten Experimente dienten zum Ausschluß möglicher Effekte durch die verwendeten Lösungsmittel auf die Gefäßreaktion sowie zum Nachweis der Kaliumkanalblockade unter Verwendung spezifischer Kanalöffner. DMSO wurde in einer Konzentration von 0,5‰ zur Lösung von ODQ verwendet. Ethanol wurde in einer Konzentration von 1‰ zur Lösung von Nimodipin und Glibenclamid verwendet. Im Anschluß an eine Kontrollreihe erfolgte die Durchführung einer Kaliumreihe unter DMSO bzw. Ethanol.

[K⁺]_e: 12 mM, 20 mM, 40 mM; XIX u. XX je n=3

Zum Nachweis der spezifischen Blockade von K_{ATP} durch Glibenclamid wurden Kontrollversuche mit dem K_{ATP} - Öffner Pinacidil durchgeführt. Im Anschluß an einen Kontrollversuch erfolgte das Einwaschen von Pinacidil (Konzentration 10µM) bei Ruhebedingungen (Kaliumkonzentration 3 mM). Die K_{ATP} Aktivierung war an der Zunahme des Gefäßdurchmessers zu erkennen. Unter Beibehaltung von Pinacidil erfolgte das Einwaschen von Glibenclamid (Konzentration 10 µM). Nach gleichem Schema erfolgten Kontrollversuche mit dem K_{Ca} -Öffner NS 1619 (Konzentration 10µM) zum Nachweis einer spezifischen Blockade von K_{Ca} durch TEA (Konzentration 1mM). Pinacidil und NS 1619 sind in der Literatur häufig verwendete Kaliumkanalöffner (Lindauer,U. et al. 2003; Long,W. et al. 2000).

XXI u. XXII je n=3.

Experimentelles Design

Insgesamt: n=99

Gruppe I-II: Reaktion auf physiologische und pathophysiologische Kaliumkonzentrationen:

I)

3 20	3 20 30 40 60 80
------	------------------

Kumulativ aufsteigende Kaliumreihe; n= 5

II)

3 20	3 12 20 40	3 12 20 40
------	------------	------------

Zeitkontrolle kumulative Kaliumreihe; n= 6

Gruppe III-IV: Beteiligung des NO/cGMP Systems:

III)

3 20	3	20 30 40 60 80
------	---	----------------

↑*

Kaliumreihe + LNNA (*); n=5

IV)

3 20	3	12 20 40	3	12 20 40
------	---	----------	---	----------

↑*

Kaliumreihe + ODQ (*); n=6

Gruppe V-VII: Mediator/Modulatorfunktion von NO

VI, VII, VIII)

3 20	3	20 40	3	20 40	3	20 40
------	---	-------	---	-------	---	-------

↑*

↑°

Kaliumreihe + LNNA (*) + 8-Bromo-cGMP (°); n=9

Kaliumreihe + LNNA (*) + SNAP (°); n=5

Kaliumreihe + LNNA (*) + Nimodipin (°); n=7

Gruppe VIII-XVIII: Beteiligung einzelner sowie Kombinationen unterschiedlicher Kaliumkanalfamilien

VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII)

3	20	3	12	20	40	3	12	20	40
---	----	---	----	----	----	---	----	----	----

↑ * ° ** °°

- Kaliumreihe + Glib (*); n=6
- Kaliumreihe + BaCl₂ (*); n=6
- Kaliumreihe + TEA (*); n=6
- Kaliumreihe + 4-AP (*); n=6
- Kaliumreihe + 400μM + BaCl₂ (*); n=3
- Kaliumreihe + BaCl₂ (*) + Glib (°); n=4
- Kaliumreihe + Glib (*) + TEA (°); n=1
- Kaliumreihe + Glib (*) + 4-AP (°); n=1
- Kaliumreihe + TEA (*) + 4-AP (°); n=1
- Kaliumreihe + TEA (*) + BaCl₂ (°) + Glib (**); n=5
- Kaliumreihe + TEA (*) + BaCl₂ (°) + Glib (**)+ 4-AP (°°); n=5

Gruppe XIX-XXII: Vehikelversuche

XIX, XX)

3	20	3	12	20	40	3	12	20	40
---	----	---	----	----	----	---	----	----	----

↑ *

- Kaliumreihe + DMSO (*); n=3
- Kaliumreihe + Ethanol (*); n=3

XXI, XXII)

3	20	3	3	3
---	----	---	---	---

↑ * ↑ °

- Ruhebedingungen + Pinacidil (*) + Glibenclamid (°); n=3
- Ruhebedingungen + NS 1619 (*) + TEA (°); n=3

Abb.: 12

Schematische Darstellung des experimentellen Designs. Dargestellt ist die zeitliche Abfolge der Applikation der unterschiedlichen $[K^+]_e$ und der verwendeten Pharmaka. Applikation der Pharmaka erfolgte für alle Experimente extraluminal. Ein einmal verwendetes Pharmakon verblieb für den Rest des Experimentes im System. Einzelne $[K^+]_e$ wurden für je 10 min beibehalten, Ruhebedingungen und Einwaschen von Pharmaka erfolgte über 15-20 min. Die Zahlenwerte stellen die extraluminale $[K]_e$ in mM dar. Erläuterungen/Details siehe Text.

3. Ergebnisse

3.1.

Gruppe I-II: Reaktion auf physiologische und pathophysiologische Kaliumkonzentrationen

Reaktion auf kumulativ ansteigende $[K^+]_e$
Reaktion auf repetitive Kaliumreihen

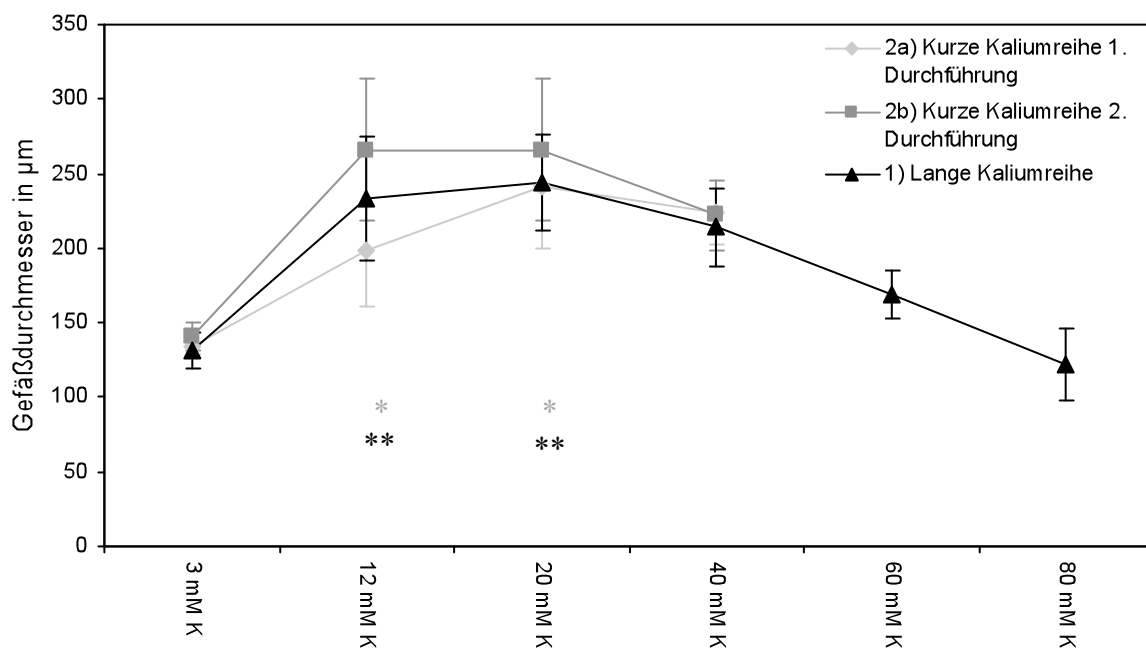


Abb.13: Dargestellt sind 2 Versuchsreihen: 1 zeigt die Reaktion des Gefäßes auf extraluminal erhöhte $[K^+]_e$. Die Steigerung von $[K^+]_e$ erfolgte kumulativ, d.h. zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen erfolgte keine Äquilibrationsphase; (n=5). 2 a und b zeigt die Reaktion des Gefäßes auf repetitiv durchgeführte Kaliumreihen. Die erste Reihe a und die zweite Reihe b sind getrennt durch eine 15 min. Äquilibrationsphase; (n=6). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

- I) Reaktion auf kumulativ ansteigende $[K^+]_e$
- II) Reaktion auf repetitive Kaliumreihen

In der kumulativen Kaliumreihe zeigt sich bei Steigerung der extraluminalen Kaliumkonzentration auf 12 mM und 20 mM eine signifikante Dilatation des Gefäßes im Vergleich zum Ruhetonus ($P < 0,01$). Diese ist auch bei Kaliumkonzentrationen von 40 mM noch vorhanden. Bei 80 mM zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Bei einzelnen Versuchen ist sogar eine leichte Gefäßkonstriktion bei 80 mM zu

beobachten. Bei repetitiver Durchführung zweier Kaliumreihen (2a, 2b) zeigt sich bei der zweiten Reihe eine signifikante Zunahme des Gefäßdurchmessers bei Kaliumkonzentrationen von 12 mM und 20 mM ($P < 0,05$), jedoch kein Unterschied bei 40 mM.

3.2. Gruppe III-IV: Beteiligung des NO/cGMP Systems

Unspezifische NOS-Blockade durch LNNA

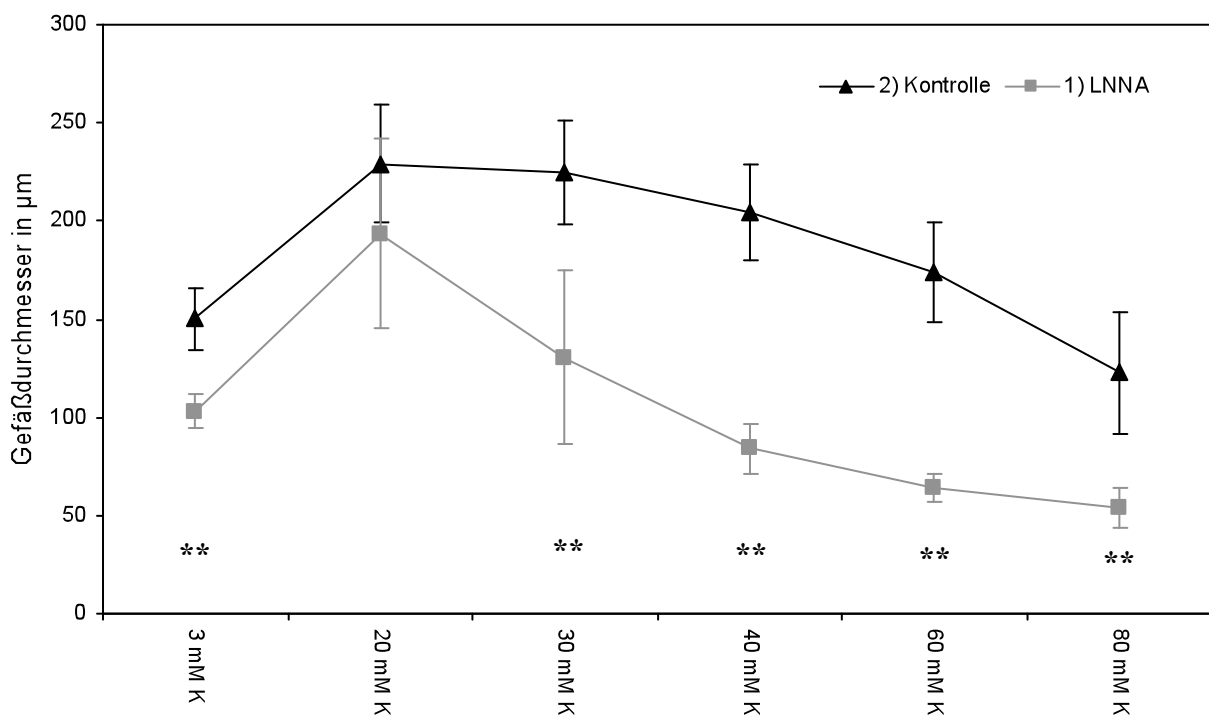


Abb.14: 1 zeigt die Reaktion des Gefäßes auf kumulativ ansteigende $[K^+]$ unter gleichzeitiger unspezifischer NOS Blockade mit LNNA (Konzentration=10 μM). 2 zeigt zum Vergleich die kumulative Kaliumreihe ohne NOS Blockade aus Abb.1; ($n=5$). $**P < 0,01$

III) Unspezifische NOS-Blockade durch LNNA

Unter unspezifischer NOS Blockade zeigt sich eine signifikante Abnahme des Ruhedurchmessers. Die Gefäßdurchmesser unter einer Kaliumkonzentration von 20 mM K^+ stellen sich unter NOS Blockade vermindert da. Bezogen auf den jeweiligen Ruhetonus zeigt sich jedoch kein Unterschied im Ausmaß der prozentualen Gefäßreaktion auf 20 mM K^+ verglichen mit der Kontrollreihe ohne NOS Inhibition.

Deutliche Veränderungen zeigen sich in der Gefäßreaktion auf pathophysiologisch gesteigerte Kaliumkonzentrationen (>30mM). Die Gefäßreaktion auf 40 mM ist im Vergleich zur Kontrolle signifikant vermindert ($p < 0,01$). Ab 40 mM ist keine Dilatation des Gefäßes unter NOS Blockade zu sehen, während sie in der Kontrollsituation noch vorhanden ist. Bei 60 und 80 mM kommt es zu einer Konstriktion des Gefäßes unter NOS Blockade.

Spezifische Inhibition der löslichen Guanylatcyclase mit ODQ

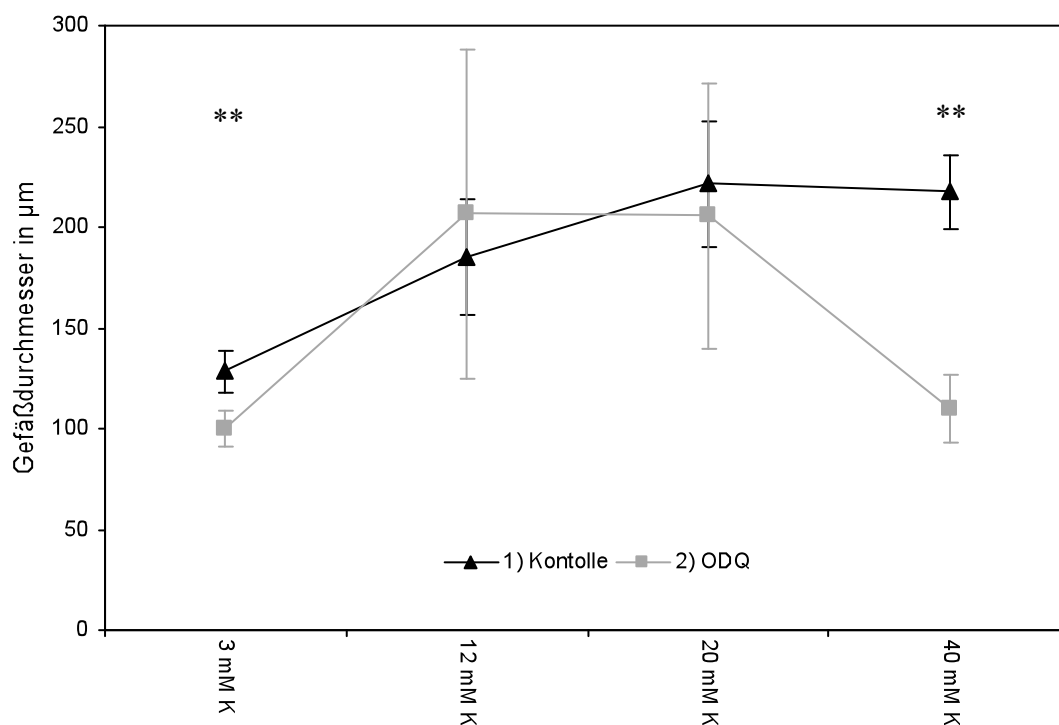


Abb.15: Dargestellt sind zwei repetitiv durchgeführte Kaliumreihen. 1 zeigt die Kontrollreihe. 2 zeigt die Kaliumreihe unter gleichzeitiger Inhibition der sGC mit ODQ (Konzentration= 10 μ M); ($n=6$). $*p < 0,01$

IV) Spezifische Inhibition der löslichen Guanylatcyclase mit ODQ

Unter Blockade der sGC zeigt sich eine signifikante Abnahme des Ruhedurchmessers sowie ein Ausbleiben der Gefäßreaktion unter 40 mM ($p < 0,01$) (Gefäßdilatation unter Kontrollbedingungen). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Reaktion auf Kaliumkonzentrationen von 12mM und 20 mM.

3.3. Gruppe V-VIII: Modulatorfunktion von NO

Substitution von 8-Bromo-cGMP während unspezifischer NOS-Blockade

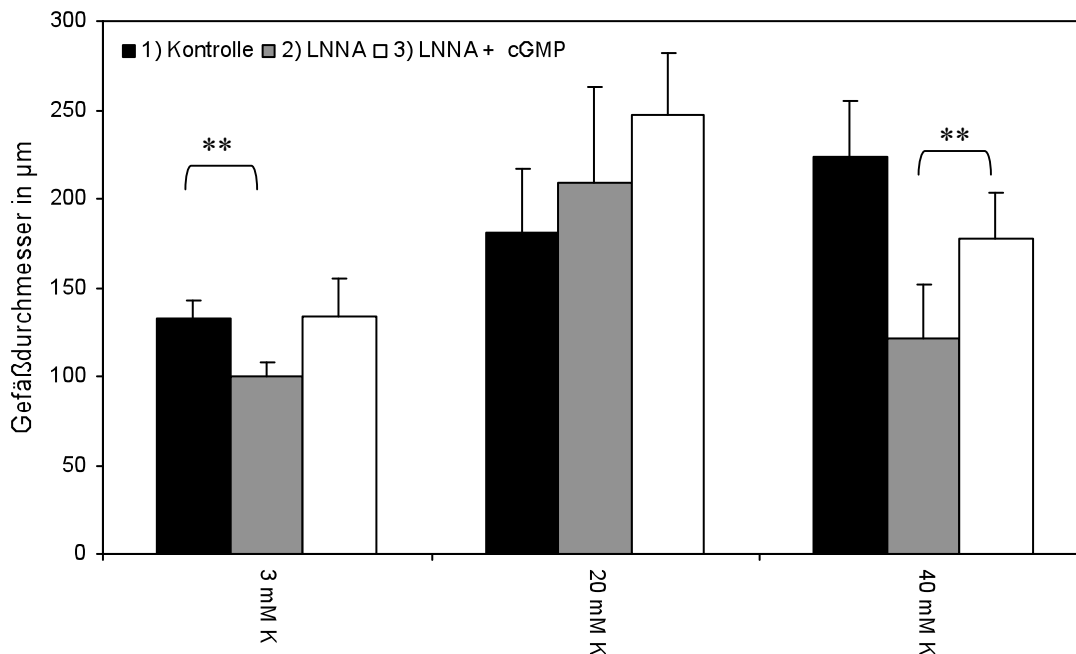


Abb.16: Dargestellt sind drei repetitiv durchgeführte Kaliumreihen. 1 zeigt die Kontrollreihe. 2 zeigt die Kaliumreihe unter unspezifischer NOS Blockade mit LNNA (Konzentration=10 µM). 3 zeigt die Kaliumreihe unter NOS Blockade und gleichzeitigem Einwaschen von 8-Bromo-cGMP (Konzentration=3-7,5 µM); (n=9). **p<0,01

V) Substitution von 8-Bromo-cGMP während unspezifischer NOS-Blockade

Unter unspezifischer NOS Blockade zeigt sich eine signifikante Abnahme des Ruhedurchmessers. 8-Bromo-cGMP wurde in der Konzentration hinzugegeben, die es ermöglichte, den Ruhedurchmesser wiederherzustellen. Unter 8-Bromo-cGMP zeigt sich eine zum Teil wiederhergestellte Gefäßdilatation auf 40 mM (unter NOS Blockade Verschwinden der Gefäßdilatation). Die Gefäßdurchmesser unter NOS-Blockade und Hinzugabe von 8-Bromo-cGMP wie auch die Gefäßdurchmesser der Kontrolle und unter 8-Bromo-cGMP sind signifikant unterschiedlich (p<0,01). Es zeigt sich desweiteren eine signifikante Zunahme der Gefäßreaktion auf 20 mM K unter NOS Blockade und gleichzeitigem Einwaschen von 8-Bromo-cGMP im Vergleich zur Kontrolle (p<0,01).

Substitution von NO durch SNAP während unspezifischer NOS-Blockade

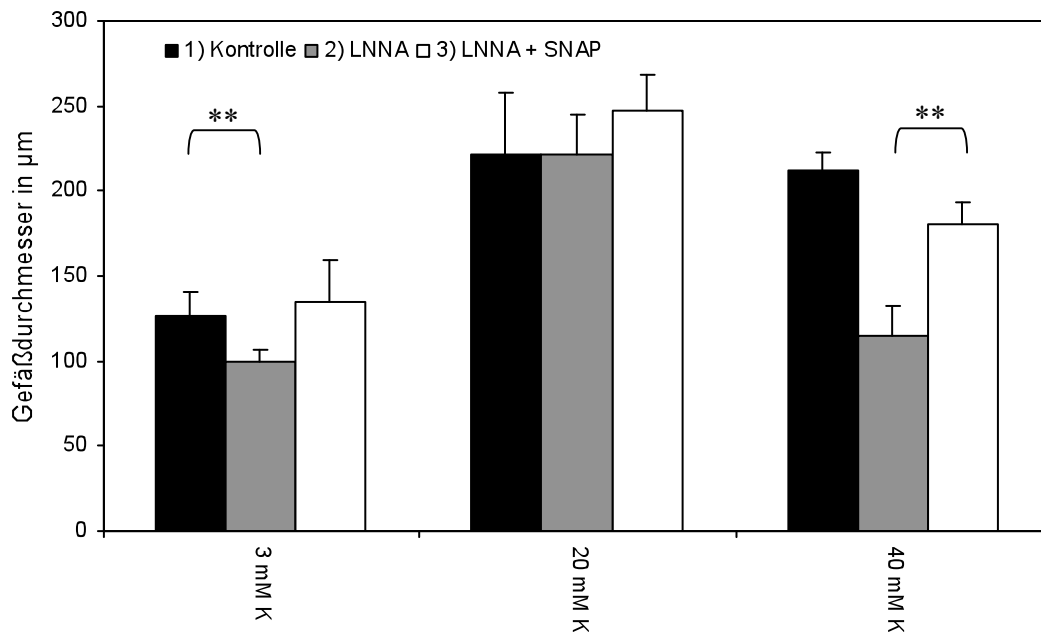


Abb.17: Dargestellt sind drei repetitiv durchgeführte Kaliumreihen. 1 zeigt die Kontrollreihe. 2 zeigt die Kaliumreihe unter unspezifischer NOS Blockade. 3 zeigt die Kaliumreihe unter NOS Blockade und gleichzeitigem Einwaschen von SNAP (Konzentration= $2,5 \times 10^{-7} M$); ($n=5$). $**p < 0,01$

VI) Substitution von NO durch SNAP während unspezifischer NOS-Blockade

Unter unspezifischer NOS Blockade zeigt sich eine signifikante Abnahme des Ruhedurchmessers (3 mM K^+). SNAP, der NO-Donor, wurde in der Konzentration hinzugegeben, die es ermöglichte, den Ruhedurchmesser wiederherzustellen (Konzentration= $2,5 \times 10^{-7} M$). Unter SNAP zeigt sich eine zum Teil wiederhergestellte Gefäßdilatation auf 40 mM (unter NOS Blockade Verschwinden der Gefäßdilatation). Der Unterschied zwischen NOS-Blockade und Hinzugabe von SNAP wie auch der Unterschied zwischen Kontrolle und SNAP ist signifikant ($P < 0,01$). Es zeigt sich kein Unterschied der Gefäßreaktion auf 20 mM unter NOS Blockade und gleichzeitigem Einwaschen von SNAP im Vergleich zur Kontrolle.

Nimodipin während unspezifischer NOS-Blockade

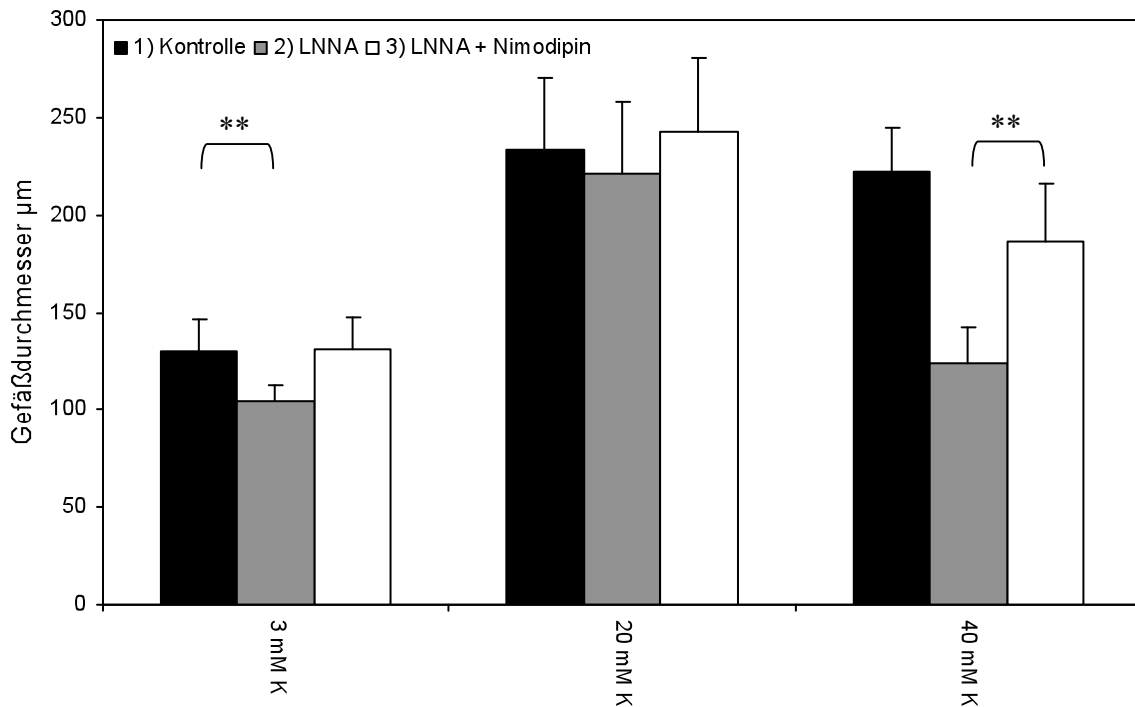


Abb.18: Dargestellt sind drei repetitiv durchgeführte Kaliumreihen. 1 zeigt die Kontrollreihe. 2 zeigt die Kaliumreihe unter unspezifischer NOS Blockade. 3 zeigt die Kaliumreihe unter NOS Blockade und gleichzeitigem Einwaschen von Nimodipin (Konzentration=30 nM); (N=7). ** $p < 0,01$

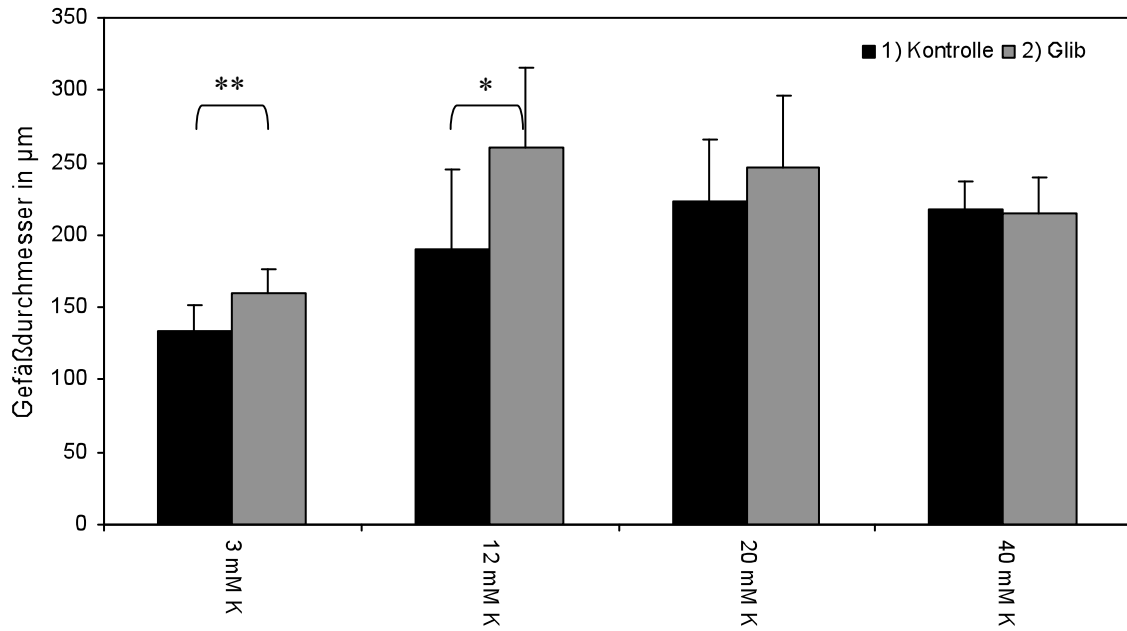
VII) Nimodipin während unspezifischer NOS-Blockade

Unter unspezifischer NOS Blockade zeigt sich eine signifikante Abnahme des Ruhedurchmessers (3 mM K^+). Nimodipin wurde in der Konzentration hinzugegeben, die es ermöglichte, den Ruhedurchmesser wiederherzustellen (Konzentration=30 nM). Unter Nimodipin zeigt sich eine zum Teil wiederhergestellte Gefäßdilatation auf 40 mM (unter NOS Blockade Verschwinden der Gefäßdilatation). Die Gefäßdurchmesser unter NOS-Blockade und nach Hinzugabe von Nimodipin wie auch die Gefäßdurchmesser der Kontrolle und nach Hinzugabe von Nimodipin sind signifikant unterschiedlich ($P < 0,01$). Es zeigt sich kein Unterschied der Gefäßreaktion auf 20 mM K unter NOS Blockade und gleichzeitigem Einwaschen von Nimodipin im Vergleich zur Kontrolle.

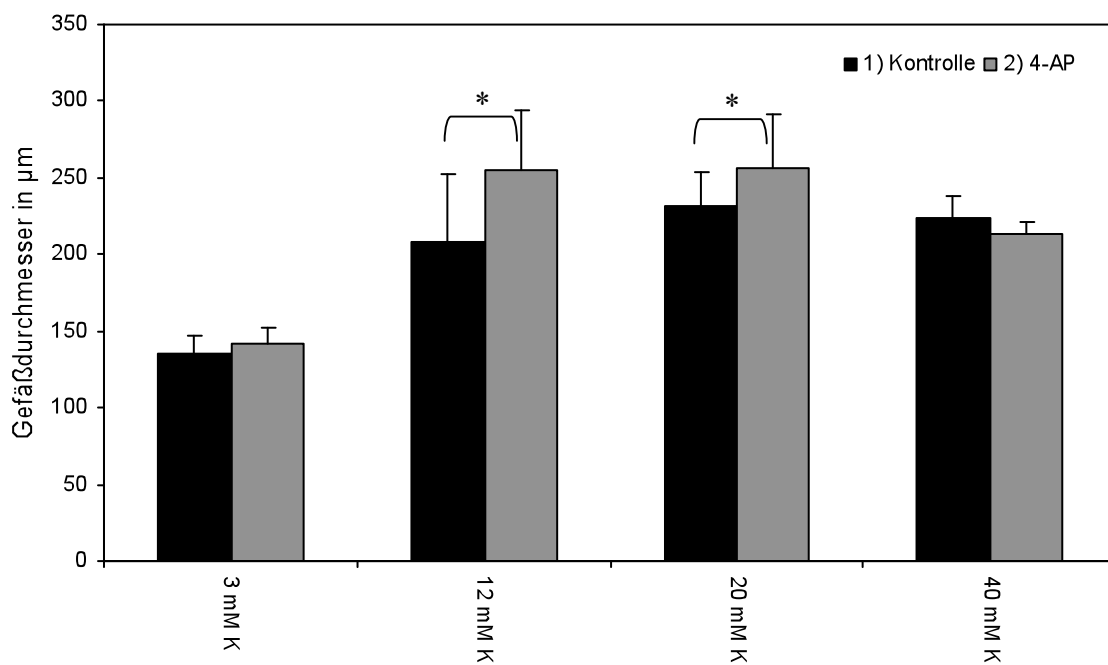
3.4.

Gruppe IX-XVIII: Beteiligung einzelner sowie Kombinationen unterschiedlicher Kaliumkanalfamilien

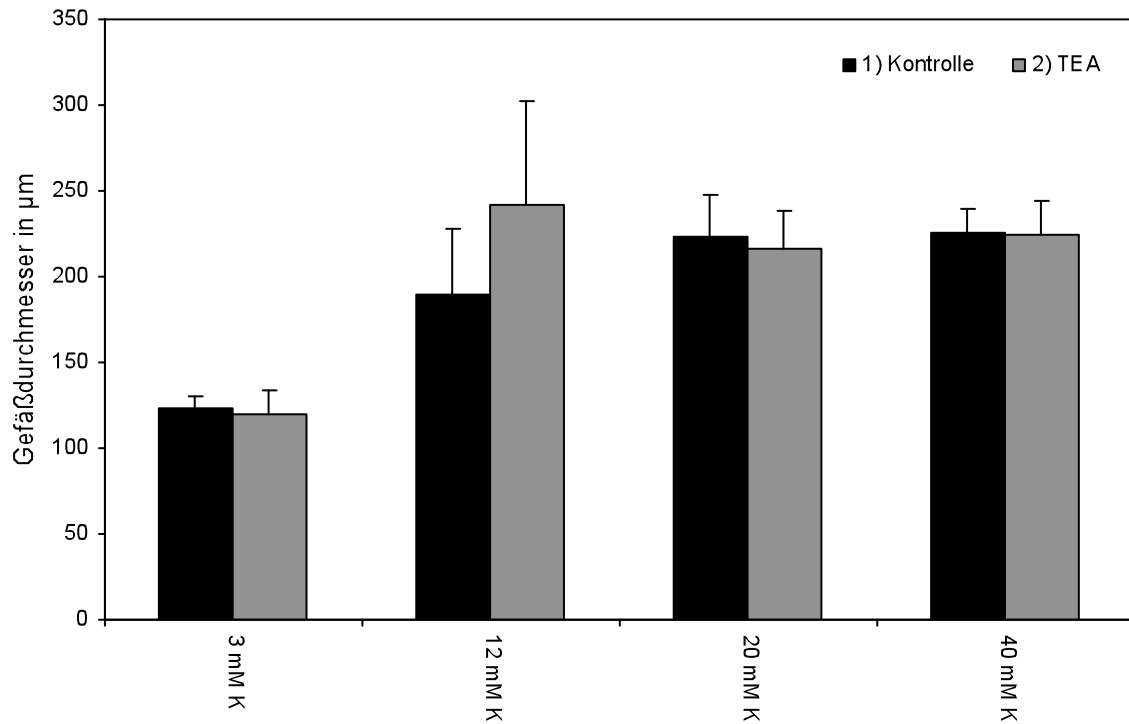
Blockade von K_{ATP} mit Glibenclamid



Blockade von K_V mit 4-AP



Blockade von K_{Ca} mit TEA



Blockade von K_{IR} mit $BaCl_2$

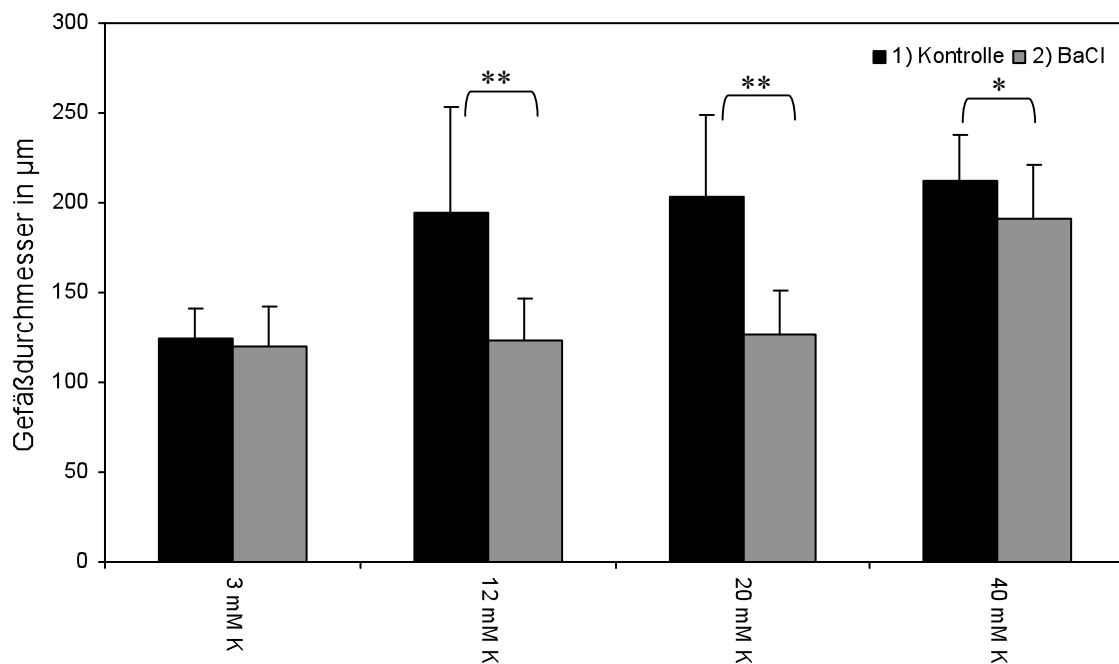


Abb.19: Dargestellt sind 4 Versuchsreihen mit jeweils 2 repetitiv durchgeführten Kaliumreihen. 1 zeigt die Kontrollreihe. 2 zeigt die Kaliumreihe unter spezifischer Blockade einer Kaliumkanal-Familie. (Konzentrationen: Glib=10µM; 4-AP=1 mM; TEA=1 mM; $BaCl_2$ =140 µM; je Versuchsreihe n=6). ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

- IX) Blockade von K_{ATP} mit Glibenclamid
- X) Blockade von K_V mit 4-AP
- XI) Blockade von K_{Ca} mit TEA
- XII) Blockade von K_{IR} mit $BaCl_2$

Bei Blockade der K_{ATP} mit Glibenclamid zeigt sich im Vergleich zur Kontrollreihe eine signifikante Zunahme des Ruhedurchmessers ($P < 0,01$) sowie des Gefäßdurchmessers unter $12 \text{ mM } K^+$ ($P < 0,05$). Der Gefäßdurchmesser unter $20 \text{ mM } K^+$ sowie unter $40 \text{ mM } K^+$ bleibt unbeeinflusst. Bei der Blockade der K_V mit 4-AP zeigt sich eine signifikante Zunahme des Gefäßdurchmessers unter $12 \text{ mM } K^+$ und $20 \text{ mM } K^+$ ($P < 0,05$). Der Ruhedurchmesser sowie die Reaktion auf $40 \text{ mM } K^+$ bleiben unbeeinflusst. Bei Blockade der K_{Ca} mit TEA zeigt sich bei sämtlichen Kaliumkonzentrationen kein signifikanter Unterschied des Gefäßdurchmessers im Vergleich zur Kontrolle. Bei Blockade der K_{IR} mit $BaCl_2$ zeigt sich keine Zunahme des Gefäßdurchmessers unter $12 \text{ mM } K^+$ und $20 \text{ mM } K^+$. Die Zunahme des Gefäßdurchmessers unter $40 \text{ mM } K^+$ ist geringfügig aber signifikant vermindert ($P < 0,05$). Es zeigt sich trotz K_{IR} -Blockade eine signifikante ($P < 0,01$) Gefäßdilatation unter $40 \text{ mM } K^+$ im Vergleich zum Ruhedurchmesser. Der Ruhedurchmesser selbst bleibt unbeeinflusst.

Blockade K_{IR} mit $400\mu\text{M BaCl}_2$

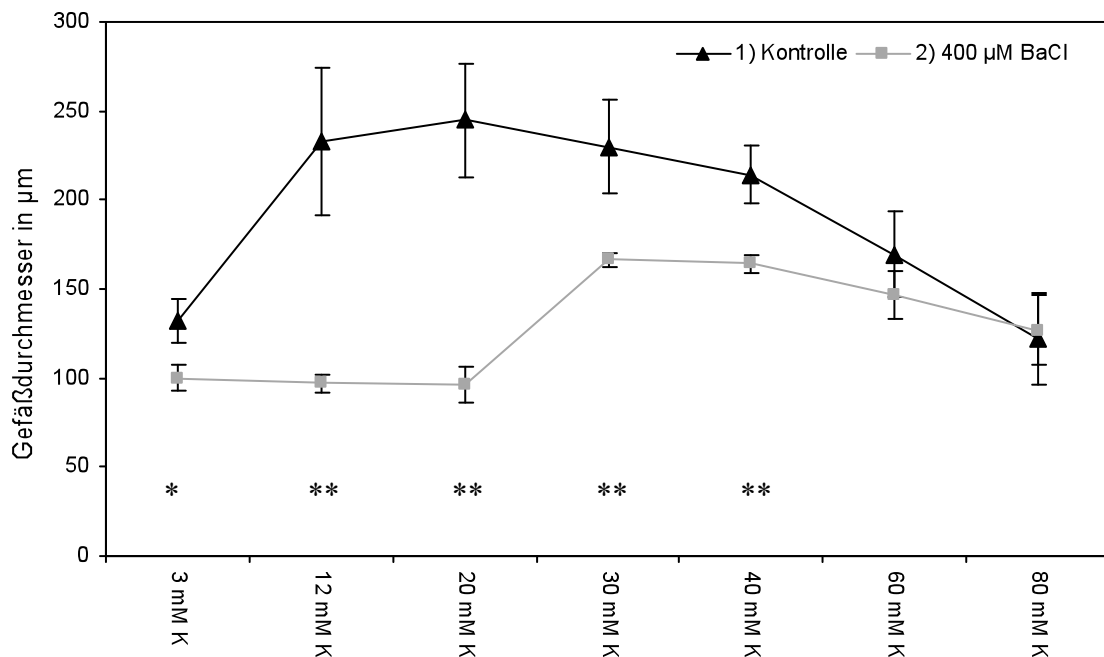


Abb.20: Dargestellt ist eine kumulative Kaliumreihe unter K_{IR} Blockade mit $400\mu\text{M BaCl}_2$ (2). Als Vergleich ist die additive Kaliumreihe ohne Blockade (1) aus Abb.1 dargestellt. (Konzentration: $\text{BaCl}_2=400\mu\text{M}$; $n=3$). ** $P<0,01$; * $P<0,05$

XIII) Blockade K_{IR} mit $400\mu\text{M BaCl}_2$

Bei der höheren Konzentration $400\mu\text{M BaCl}_2$ zeigt sich in der additiven Kaliumreihe eine Reduktion des Ruhedurchmessers ($P<0,05$). Die Gefäßdilatation unter 12 mM K^+ und 20 mM K^+ ist vollständig verschwunden. Bei höheren Kaliumkonzentrationen (30 mM , 40 mM) ist eine signifikante Gefäßdilatation im Vergleich zum Ruhedurchmesser vorhanden ($P<0,05$). Im Vergleich zur Kontrolle zeigt sich jedoch auch bei den höheren Kaliumkonzentrationen ein hochsignifikanter Unterschied in der Ausprägung der Gefäßdilatation ($P<0,01$).

Dieser Unterschied in der Gefäßdilatation auf 40 mM K^+ ist deutlicher ausgeprägt als in Reihe XII (Kaliumreihe unter $140\mu\text{M BaCl}_2$). Bei Konzentrationen von 60 mM K^+ und 80 mM K^+ zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollreihe und der Kaliumreihe unter $400\mu\text{M BaCl}_2$.

Kombinierte Blockade von K_{ATP} und K_{IR}

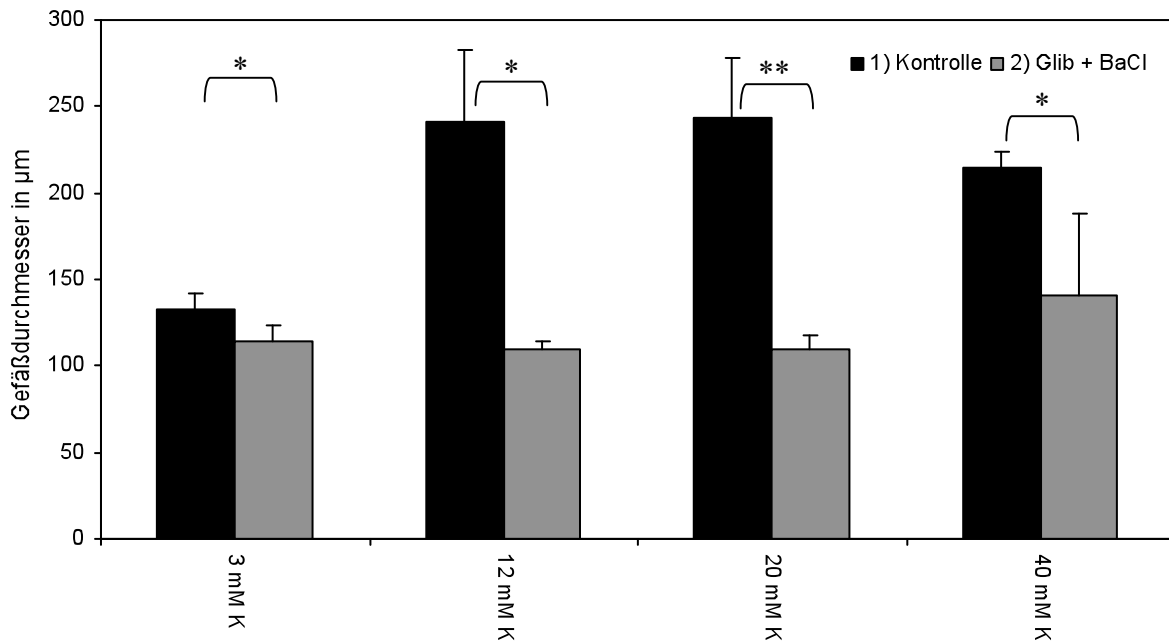


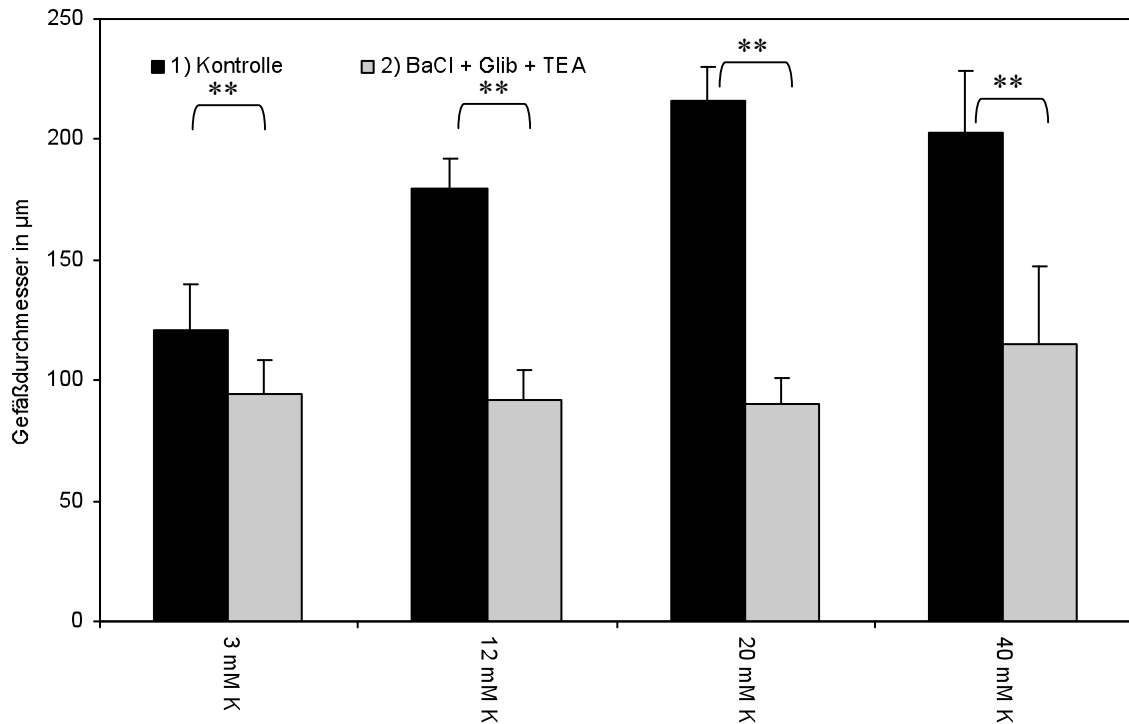
Abb.21: Dargestellt ist eine additive Kaliumreihe unter Blockade von K_{ATP} und K_{IR} (Konzentration: Glib=10µM; BaCl₂=140 µM; n=4). **P<0,01; *P<0,05

XIII) Kombinierte Blockade von K_{ATP} und K_{IR}

Bei gleichzeitigem Hinzufügen von BaCl₂ (140µM) und Glibenclamid (10µM) zeigt sich in der additiven Kaliumreihe eine signifikante Reduktion des Ruhedurchmessers (P<0,05). Die Gefäßdilatation bei 12 mM und 20 mM ist im Vergleich zur Kontrolle verschwunden. Bei 40 mM zeigt sich keine signifikante Gefäßdilatation im Vergleich zum Ruhedurchmesser (im Gegensatz zu Reihe IX und XII bei alleinigem Hinzufügen von Glibenclamid oder BaCl₂)

Es wurden desweiteren einzelne Versuche zu anderen kombinierten Kaliumkanalblockaden durchgeführt (Reihe XIV-XVI; Ergebnisse nicht dargestellt). In diesen einzelnen „Screening“ Versuchen zeigen sich keine deutlichen Unterschiede des Gefäßdurchmessers unter 40 mM K⁺ bei kombinierter Gabe von Glib/TEA (XIV), Glib/4-AP (XV) oder TEA/4-AP (XVI).

Kombinierte Blockade von K_{Ca} , K_{ATP} und K_{IR}



Kombinierte Blockade von K_{Ca} , K_{ATP} , K_V und K_{IR}

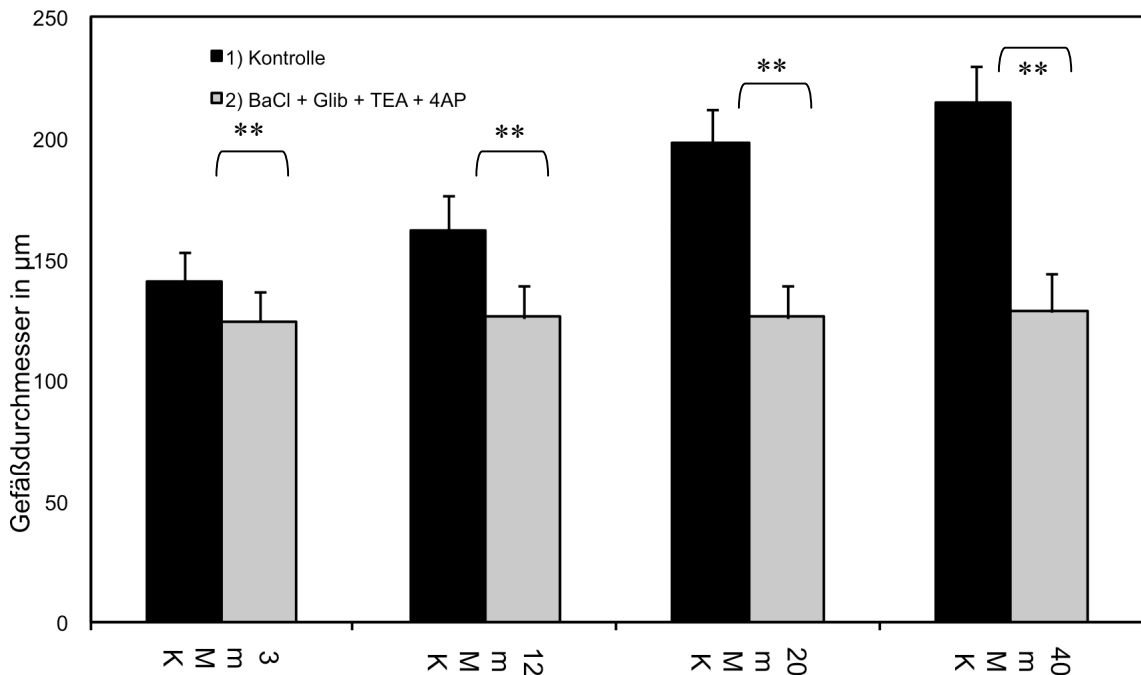


Abb.22: Dargestellt sind 2 additive Kaliumreihen unter Blockade unterschiedlicher Kombinationen von Kaliumkanalfamilien. 1 stellt jeweils die Kontrollreihe 2 die Reihe unter Kaliumkanalblockade dar. XVII: Blockade von K_{Ca} , K_{ATP} und K_{IR} . XVIII: Blockade von K_{Ca} , K_{ATP} , K_V und K_{IR} (Konzentrationen: Glib=10µM; 4-AP=1 mM; TEA=1 mM; BaCl₂=140 µM; jeweils n=5) **P<0,01;*P<0,05

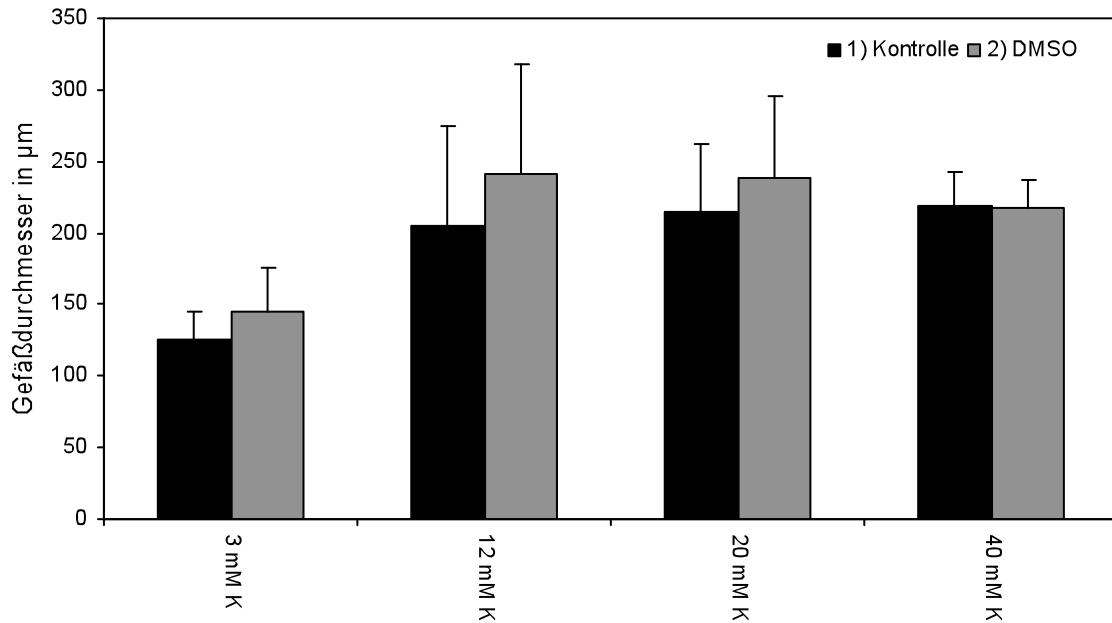
XVII) Kombinierte Blockade von K_{Ca} , K_{ATP} und K_{IR}

XVIII) Kombinierte Blockade von K_{Ca} , K_{ATP} , K_V und K_{IR}

In der Drei- (Blockade von K_{Ca} , K_{ATP} und K_{IR}) und Vierfachblockade (Blockade von K_{Ca} , K_{ATP} , K_V und K_{IR}) zeigt sich in der additiven Kaliumreihe eine signifikante Reduktion des Gefäßdurchmessers unter Ruhebedingungen sowie eine signifikante Reduktion des Gefäßdurchmessers unter den getesteten Kaliumkonzentrationen (12mM, 20 mM, 40 mM) ($p < 0,01$ für alle Reaktionen). Hierbei hat die zusätzliche Blockade von K_V keinen zusätzlichen Einfluß auf die Änderung des Gefäßdurchmessers.

3.5. Gruppe XIX-XXII: Kontroll und Vehikelversuche

Einfluss von DMSO auf die Gefäßreaktion



Einfluss von Ethanol auf die Gefäßreaktion

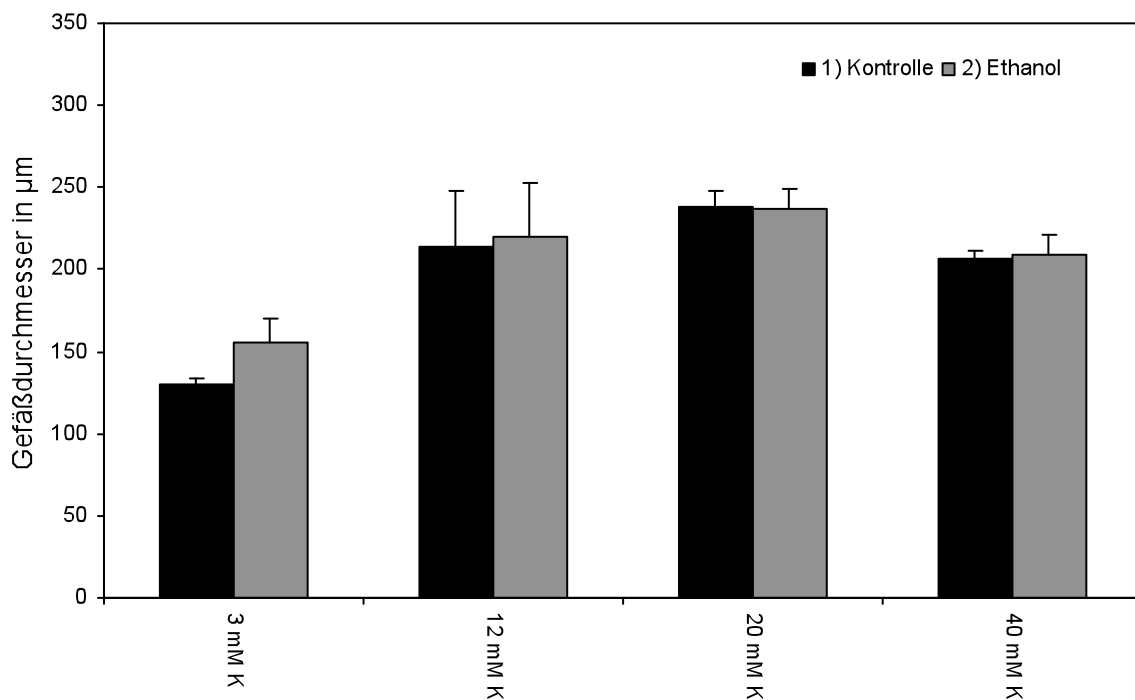
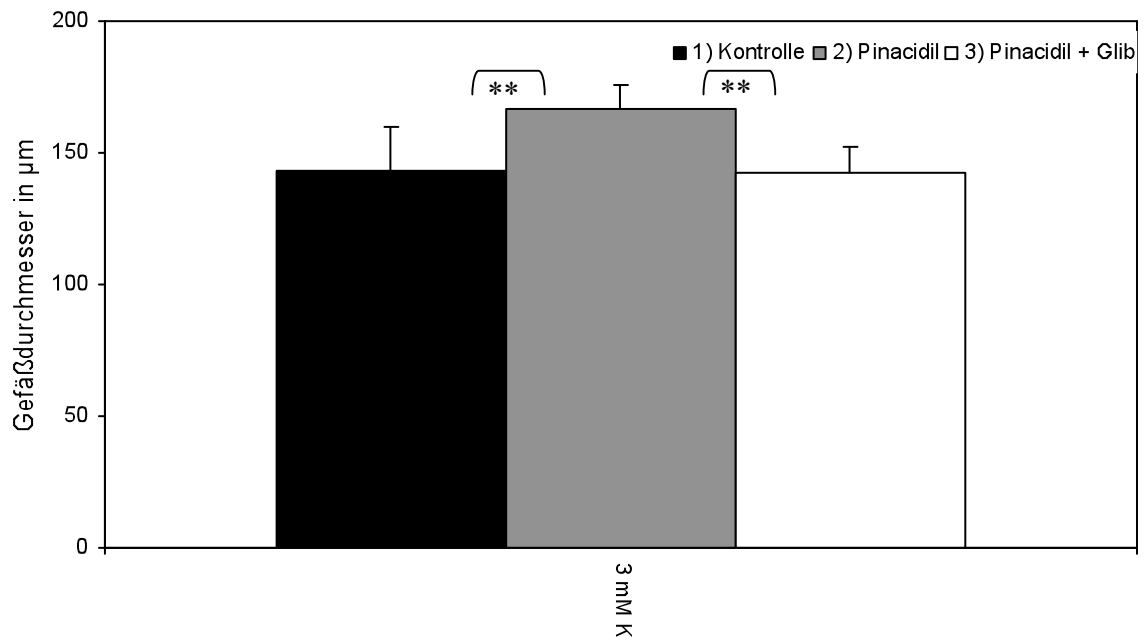


Abb.23: Dargestellt sind 2 Vehikelversuche zur Untersuchung eines möglichen Einflusses der Lösungsmittel Ethanol und DMSO auf die Gefäßreaktion. 1 stellt die Kontrollreihe, 2 die additive Kaliumreihe unter Einwaschen des jeweiligen Lösungsmittels dar. (Konzentrationen: DMSO=0,5‰; Ethanol=1‰; jeweils n=3).

Nachweis der spezifischen Blockade von K_{ATP} durch Glibenclamid mit Pinacidil



Nachweis der spezifischen Blockade von K_{Ca} durch TEA mit NS1619

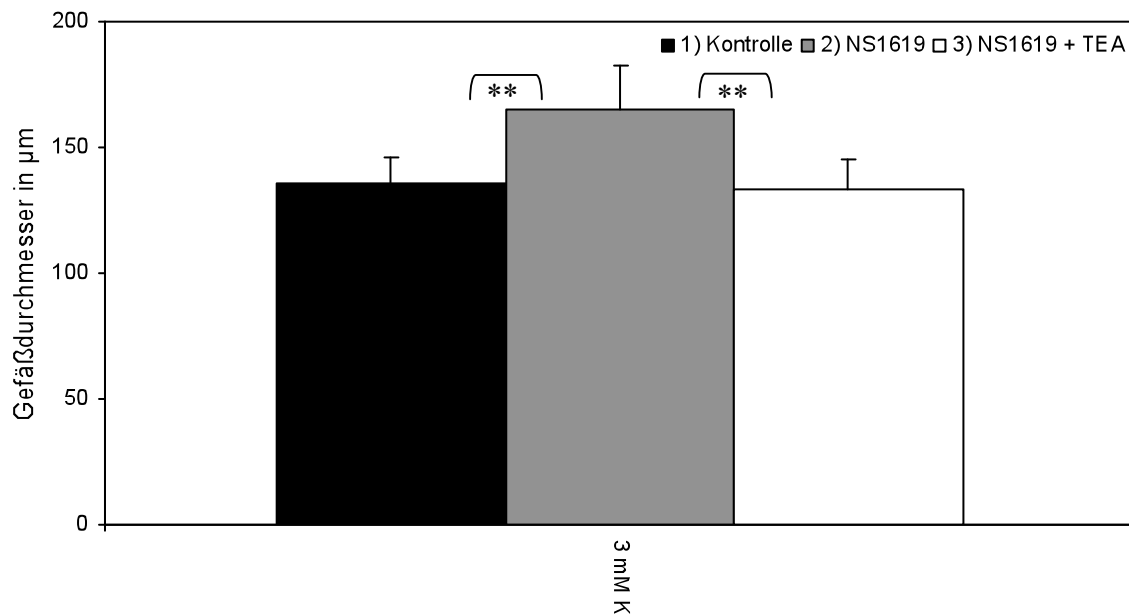


Abb.24: Dargestellt sind 2 Kontrollversuche zur spezifischen Blockade von K_{ATP} und K_{Ca} . 1 stellt das Gefäß bei Ruhebedingungen, 2 unter Einwaschen des Kaliumkanalöffners, 3 unter gleichzeitigem Einwaschen von Kaliumkanalöffner und Blocker dar. (Konzentrationen: Glib=10 μM ; TEA=1 mM; Pinacidil=10 μM ; NS1619=10 μM ; XXI: n=4, XXII n=3). **P<0,01

- XIX) Einfluss von DMSO auf den Gefäßdurchmesser
- XX) Einfluss von Ethanol auf den Gefäßdurchmesser

In einigen Versuchen wurde DMSO als Lösungsmittel eingesetzt. Im Vehikelversuch mit DMSO zeigt sich in der kumulativen Kaliumreihe kein signifikanter Einfluß auf den Gefäßdurchmesser unter Ruhebedingungen oder bei Kaliumkonzentrationen von 12 mM, 20 mM und 40 mM im Vergleich zur Kontrolle. Ebenso wurde ein Vehikelversuch mit Ethanol durchgeführt. Es zeigt sich der Hinweis auf eine leichte Zunahme des Ruhedurchmessers, die bei $n=3$ jedoch nicht signifikant wird ($P=0,085$). Die Gefäßdurchmesser bei Kaliumkonzentrationen von 12 mM, 20 mM und 40 mM zeigen keinen Unterschied im Vergleich zu Kontrolle.

- XXI) Nachweis der spezifischen Blockade von K_{ATP} durch Glibenclamid mit Pinacidil
- XXII) Nachweis der spezifischen Blockade von K_{Ca} durch TEA mit NS1619

Zum Nachweis der spezifischen Blockade von K_{ATP} durch Glibenclamid in der verwendeten Dosis von $10\mu\text{M}$ wurde eine Kontrollreihe mit Einwaschen des K_{ATP} Öffners Pinacidil durchgeführt. Nach Einwaschen von Pinacidil ($10\mu\text{M}$) bei einer Kaliumkonzentration von 3 mM zeigt sich eine signifikante Zunahme des Ruhedurchmessers ($P<0,01$), die nach Hinzufügen von Glibenclamid aufgehoben wird. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Ruhedurchmesser und Gefäßdurchmesser bei gleichzeitigem Hinzufügen von Pinacidil und Glibenclamid. Das gleiche Experiment wurde mit TEA und NS1619 zum Nachweis einer spezifischen Blockade von K_{Ca} durch TEA 1 mM durchgeführt. Nach Einwaschen von NS 1619 ($10\mu\text{M}$) zeigt sich eine signifikante Zunahme des Ruhedurchmessers ($P<0,01$), die nach Hinzufügen von TEA aufgehoben wird. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Ruhedurchmesser und Gefäßdurchmesser bei (gleichzeitigem) Hinzufügen von TEA und NS1619.

4. Diskussion

4.1.

Kontrollexperimente

Übersicht über die Ergebnisse aus den Kontrollexperimenten und Standardreaktionen:

- 1) *Bei kumulativ ansteigenden Kaliumkonzentrationen zeigt sich eine signifikante Gefäßdilatation bis zu 60mM: Die Dilatation ist bei 12mM und 20 mM am stärksten ausgeprägt. Bei sehr hohen Kaliumkonzentrationen (80 mM) ist keine Gefäßdilatation zu beobachten.*
- 2) *Werden zwei Kaliumreihen konsekutiv durchgeführt zeigt sich eine leichte Zunahme der Dilatation bei physiologisch gesteigerten Kaliumkonzentrationen (12 mM, 20 mM).*
- 3) *Die Lösungsmittel DMSO (0,5%) und Ethanol (0,1%) haben keinen Einfluß auf die Gefäßreaktion.*
- 4) *Glibenclamid (10µM) und TEA (1mM) erzeugen eine effektive Inhibition von K_{ATP} und K_{Ca} : Eine Gefäßdilatation, hervorgerufen durch spezifische Öffner von K_{ATP} und K_{Ca} (Pinacidil / NS1619) wird durch Glibenclamid und TEA vollständig aufgehoben.*

4.1.1

Die isolierte MCA ist ein etabliertes Modell zur Untersuchung zerebrovaskulärer Reaktion

Das Modell der isolierten MCA der Ratte stellt ein etabliertes Modell für Untersuchungen zerebrovaskulärer Reaktion unabhängig vom umgebenden Parenchym dar (Bryan,R.M., Jr. et al. 1996). Es werden MOPS oder Bikarbonat gepufferte Systeme verwendet, die vergleichbare Ergebnisse zeigen (Golding,E.M. et

al. 2000; Lindauer,U. et al. 2001). Der Aufbau eines spontanen Ruhetonus (ohne pharmakologische Beeinflussung) sowie die Reaktion auf gesteigerte extraluminale Kaliumkonzentrationen stellen Standardparameter zur Beurteilung der intakten Gefäßreaktion dar (Lindauer,U. et al. 2001; Bryan,R.M., Jr. et al. 1996). Es wurden nur Gefäße verwendet, deren Ruhetonus $\leq 30\%$ im Vergleich zum maximalen Durchmesser (Äquibrierung) lag und die eine $\geq 30\%$ Dilatation auf eine extraluminale Kaliumkonzentration von 20 mM zeigten.

4.1.2.

Bei physiologischen und pathophysiologischen Kaliumkonzentrationen besteht eine Dilatation der isolierten MCA

Da insbesondere auch die Mechanismen der Gefäßreaktion auf pathophysiologische Kaliumkonzentrationen getestet werden sollten, wurden Kontrollreihen mit kumulativ ansteigenden Kaliumkonzentrationen durchgeführt (d.h. ohne intermittierende Rückkehr auf die Baseline-Kaliumkonzentration). Bis zu einer Konzentration von 60 mM K^+ zeigt sich eine signifikante Vasodilatation mit einem Maximum bei 12 und 20 mM K^+ . Bei einer Konzentration von 80 mM K^+ ist die Vasodilatation nicht mehr signifikant bzw. es stellt sich sogar in einzelnen Experimenten eine leichte Vasokonstriktion ein. Dies steht im Einklang zu Daten aus anderen Arbeiten (Golding,E.M. et al. 2000; Golding,E.M. et al. 2002). Werden zwei Kaliumreihen aufeinander folgend durchgeführt (mit intermittierender Rückkehr auf die Baseline Kaliumkonzentration), so ändert sich die Vasoreaktion bei physiologisch gesteigerten Kaliumkonzentrationen. Es kommt zu einer leichten, aber doch signifikanten Zunahme der Gefäßdilatation bei 12 und 20 mM K^+ . Da die Ausprägung der Reaktionsverstärkung aber gering ist, wird ihr im weiteren Verlauf keine wesentliche Bedeutung beigemessen. Möglicher Weise handelt es sich hierbei um eine Form der Bahnung der Gefäßreaktion bei 2 repetitiven Stimuli. Unverändert bleibt hingegen die Gefäßreaktion auf die als pathophysiologisch einzuordnende Kaliumkonzentration von 40 mM K^+ .

4.1.3.

Die verwendeten Lösungsmittel haben keinen Einfluß auf die Gefäßreaktion; Glibenclamid und TEA erzeugen eine suffiziente Inhibition von K_{ATP} und K_{Ca}

In einigen Experimenten wurden die Lösungsmittel DMSO und Ethanol verwendet. In den Vehikelversuchen zeigte sich kein Einfluß auf die Gefäßreaktion durch DMSO oder Ethanol. Wie vorangehend beschrieben wurden in anderen Arbeiten mögliche Beeinflussungen insbesondere der Aktivität von K_{ATP} durch DMSO bzw. Ethanol gesehen (Rosenblum, W.I. et al. 2001a; Rosenblum, W.I. 1983). In den vorliegenden Experimenten zeigte sich hierfür kein Hinweis.

Für einige Kaliumkanalfamilien existieren spezifische Kanalöffner. Zwei häufiger verwendete Substanzen sind Pinacidil (K_{ATP}) und NS1619 (K_{Ca}) (Zimmermann, P.A. et al. 1997; Lindauer, U. et al. 2003a; Long, W. et al. 2000). Diese wurden zum Nachweis einer spezifischen Blockade von K_{ATP} und K_{Ca} eingesetzt. Unter Pinacidil und NS1619 zeigte sich eine mit Literaturdaten vergleichbare Vasodilatation, die durch Glibenclamid bzw. TEA zu unterdrücken war. In diesem Modell und den hier verwendeten Konzentrationen erzeugen Glibenclamid und TEA dementsprechend eine suffiziente Blockade von K_{ATP} und K_{Ca} . Für K_V existiert kein routinemäßig verwendeter Kanalöffner. Der Nachweis der erfolgreichen Blockade von K_{IR} erfolgte im Rahmen der Applikation von 12 bzw. 20 mM K^+ in der entsprechenden Versuchreihe.

4.1.4.

Zusammenfassung

In der kumulativen Kaliumreihe kommt es zu einer reproduzierbaren Vasodilatation, die bei höheren Kaliumkonzentrationen abnimmt und bei sehr hohen Kaliumkonzentrationen (80 mM K^+) verschwindet. Bei wiederholter Durchführung zeigt sich hierbei keine wesentliche Veränderung der Gefäßdilatation auf physiologische bzw. pathophysiologisch gesteigerte Kaliumkonzentrationen. Die Gefäßreaktion bleibt durch die verwendeten Lösungsmittel unbeeinflusst. Die verwendeten Kanal Inhibitoren erzeugen, soweit testbar, eine suffiziente Kanalblockade in den hier verwendeten Konzentrationen.

4.2.

Beteiligung des NO/cGMP Systems

Übersicht über die Ergebnisse der Experimente zur Beteiligung des NO/cGMP Systems an der Gefäßreaktion der isolierten MCA auf physiologisch und pathophysiologisch gesteigerte extraluminale Kaliumkonzentrationen:

- 1) *Der Ruhetonus zerebraler Gefäße ist NO abhängig:* Durch NOS Blockade zeigt sich eine signifikante Abnahme des Ruhedurchmessers der Gefäße.
- 2) *Die Aufrechterhaltung des Ruhedurchmessers durch NO wird über den cGMP Weg vermittelt:* Durch NOS Blockade und sGC Blockade ist eine identische Abnahme des Ruhedurchmessers zu beobachten.
- 3) *Die Reaktion des Gefäßes auf physiologische Steigerung der extraluminale Kaliumkonzentration ($\leq 20\text{mM}$) ist nicht NO abhängig:* Es zeigte sich kein Unterschied der Gefäßreaktion unter NOS Blockade im Vergleich zur Gefäßreaktion ohne NOS Blockade. Dasselbe Ergebnis ist unter sGC Blockade zu beobachten.
- 4) *Die Gefäßreaktion auf pathophysiologische Steigerung der extraluminale Kaliumkonzentration ($\geq 30\text{ mM}$) ist NO abhängig:* Es zeigte sich eine signifikante Verminderung der Gefäßreaktion unter NOS Blockade. Ab 40 mM K^+ verschwindet die unter Kontrollbedingungen vorhandene Gefäßdilataion und wandelt sich bei höheren Kaliumkonzentrationen in eine Gefäßkonstriktion um.
- 5) *Die Aufrechterhaltung der Gefäßreaktion bei pathophysiologischen extraluminale Kaliumkonzentrationen durch NO ist über den cGMP Weg vermittelt:* Es zeigt sich eine identische Abnahme der Gefäßreaktion nach sGC Blockade und nach unspezifischer NOS Blockade.

- 6) *Bei Vermittlung der Gefäßreaktion auf pathophysiologische Kaliumkonzentrationen hat NO die Rolle eines Modulators:* Nach Einwaschen des NO-Donors SNAP während NOS Blockade kommt es zu einer nahezu wiederhergestellten Gefäßdilataion auf pathophysiologische extraluminale Kaliumkonzentrationen. Des Weiteren kommt es nach Substitution von cGMP durch 8-Bromo-cGMP unter NOS Blockade ebenfalls nahezu zu einer Wiederherstellung der Gefäßreaktion.
- 7) *Die Aufrechterhaltung der Gefäßreaktion auf pathophysiologische Kaliumkonzentrationen ist auch durch NO-unabhängige Vasodilatoren möglich:* Nach Einwaschen des NO-unabhängigen Vasodilators Nimodipin zeigt sich ebenso eine nahezu wiederhergestellte Gefäßreaktion auf pathophysiologische Kaliumkonzentrationen. Dabei zeigt sich keine signifikante Änderung der Reaktion auf physiologische Kaliumkonzentrationen.

4.2.1.

NO/cGMP ist wichtig für die Erhaltung des Ruhetonus

In den vorliegenden Experimenten zeigt sich, dass NO an der Aufrechterhaltung eines basalen Gefäßtonus beteiligt ist und dieser Effekt über den cGMP-Weg vermittelt ist. Da sich kein wesentlicher Unterschied im Ausmaß der Reduktion des Durchmessers unter NOS-Inhibition und sGC-Inhibition findet, scheinen nicht cGMP-abhängige Mechanismen hierbei allenfalls eine untergeordnete Rolle zu spielen. Dies konnte auch im vergleichbaren, aber nicht MOPS-gepufferten System gezeigt werden (Golding, E.M. et al. 2001). Des Weiteren ist aus anderen Arterien-Modellen eine Beteiligung des NO/cGMP-Systems am Ruhetonus bekannt (Faraci, F.M. und Heistad, D.D. 1998; Lindauer, U. et al. 2001; Lindauer, U. et al. 1999). In den vorliegenden Gefäßen zeigte sich die Reduktion des Ruhedurchmessers durch unspezifische NOS-Blockade. Andere Arbeiten zeigen jedoch, dass insbesondere NO aus dem Gefäßendothel an der Aufrechterhaltung des basalen Tonus beteiligt zu sein scheint (Alonso, M.J. et al. 1992; Cosentino, F. et al. 1993). So findet sich z.B. bei eNOS-Knock-Out-Mäusen keine Reduktion des basalen Tonus auf unspezifische NOS-Blockade (Ma, J. et al. 1996). Im Unterschied dazu spielt für die

zerebrovaskuläre Reaktion auf Azidose NO aus perivaskulären Nerven eine wesentliche modulatorische Rolle (Lindauer,U. et al. 2001).

4.2.2.

NO/cGMP ist wichtig für die Erhaltung der Vasodilatation bei pathophysiologischen Kaliumkonzentrationen

Es wurde desweiteren die Rolle von NO bei extraluminal erhöhten Kaliumkonzentrationen untersucht, wie sie in physiologischen und pathophysiologischen Situationen vorkommen (Sykova,E. 1983; Astrup,J. et al. 1980; Katayama,Y. et al. 1990; Hansen,A.J. und Zeuthen,T. 1981). Wird die extraluminale Kaliumkonzentration auf physiologische Werte (<20mM) gesteigert, zeigt sich unter NOS Blockade keine Veränderung der Gefäßreaktion. Ebenfalls zeigte sich unter sGC Blockade keine Änderung der Gefäßreaktion. Dies konnte auch in anderen Arbeiten in vergleichbaren Modellen bestätigt werden (Golding,E.M. et al. 2001). In vivo finden sich im Gegensatz dazu Hinweise auf eine modulatorische Rolle von NO/cGMP in der zerebrovaskulären Reaktion auf erhöhte Kaliumkonzentrationen bis 20 mM (Dreier,J.P. et al. 1995).

Hiervon unterscheidet sich die Reaktion auf pathophysiologisch gesteigerte Kaliumkonzentrationen. Unter unspezifischer NOS Blockade zeigt sich eine signifikante Minderung der Gefäßdilataion bei Kaliumkonzentrationen von 30-40 mM. Bei höheren extraluminalen Kaliumkonzentrationen verschwindet die Gefäßdilataion bzw. kehrt sich bei einzelnen Versuchen in eine Gefäßkonstriktion um. Diese Ergebnisse lassen sich unter sGC Inhibition reproduzieren. Zusammengefasst zeigt sich, dass das NO/cGMP System eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gefäßdilataion und des Blutflusses bei pathophysiologisch gesteigerten Kaliumkonzentrationen spielt. Diese Ergebnisse zeigten sich auch in nicht MOPS gepufferten in-vitro Modellen und in in-vivo Experimenten (Golding,E.M. et al. 2001; Dreier,J.P. et al. 1998; Windmüller, O. et al. 2005).

4.2.3.

NO/cGMP ist ein Modulator der Gefäßdilatation auf pathophysiologische Kaliumkonzentrationen

NO wird als zentraler Bestandteil neurovaskulärer Kopplung diskutiert (Dirnagl,U. et al. 1993; Iadecola,C. et al. 1994; Faraci,F.M. und Heistad,D.D. 1998; Lindauer,U. et al. 1999). Wie eingangs erwähnt scheint NO jedoch auf unterschiedliche Art und Weise eine Rolle bei der Vermittlung zerebrovaskulärer Gefäßreaktionen zu spielen. Während im Zerebellum eine Mediator-Rolle für NO diskutiert wird (Li,J. und Iadecola,C. 1994), spielt NO in vielen anderen Bereichen die Rolle eines Modulators neurovaskulärer Kopplung (z.B. zerebrovaskuläre Reaktion auf Azidose) (Lindauer,U. et al. 1999; Lindauer,U. et al. 2001; Dreier,J.P. et al. 1995). In den vorliegenden Experimenten sollte untersucht werden, ob NO bei der Beteiligung der zerebrovaskulären Reaktion auf pathophysiologische Kaliumkonzentrationen die Rolle eines Mediators oder Modulators spielt. Unter NOS- Inhibition und gleichzeitiger Gabe von SNAP (NO Donor) zeigte sich eine teilweise wiederhergestellte Gefäßreaktion auf 40 mM Kalium. Dies zeigt sich auch unter NOS Inhibition und gleichzeitiger Gabe von 8-Bromo-cGMP. Unter der Vorstellung, dass für eine Funktion im Sinne des Modulator Konzeptes eine gleich bleibende Konzentration von NO/cGMP im Gewebe zu erwarten ist, die aufgrund einer permissiven Wirkung für die Vermittlung der vasodilatativen Effekte anderer Vasodilatoren (z.B. Kalium) die Voraussetzung ist, sprechen diese Ergebnisse für eine modulatorische Rolle von NO in der Vermittlung von Gefäßreaktionen auf pathophysiologische Kaliumkonzentration. Aufgrund der nur teilweise hergestellten Dilatation sind neben cGMP andere Mechanismen jedoch nicht auszuschließen. Andere Arbeiten postulieren eine mögliche Rolle von cAMP basierten Mechanismen bzw. einer Interaktion beider Systeme (Golding,E.M. et al. 2001).

4.2.4.

Andere Vasodilatoren haben einen NO/cGMP ähnlichen Effekt

Es stellt sich die Frage, ob die Wiederherstellung der Gefäßreaktion auf 40 mM K^+ durch NO bzw. cGMP Applikation während NOS Blockade ein NO/cGMP spezifischer Effekt ist, oder allein auf der Wiederherstellung des Ruhedurchmessers und somit

auf einer unspezifischen vasodilatatorischen Wirkung von NO/cGMP beruht. Deshalb wurde in einer weiteren Versuchreihe anstelle von NO/cGMP der NO/cGMP-System unabhängige Vasodilatator Nimodipin verwendet. Nach Hinzugabe von Nimodipin zeigte sich ebenfalls eine teilweise wiederhergestellte Gefäßdilataion unter 40mM K⁺, vergleichbar der Reaktion unter dem NO-Donor SNAP bzw. 8-Bromo-cGMP. Andere Arbeiten zeigen, dass ein ähnlicher Effekt auch durch Iloprost (cAMP abhängiger Vasodilatator) zu erreichen ist (Golding, E.M. et al. 2001). Weiterführende Untersuchungen sind hier notwendig, um den genauen Mechanismus der modulatorischen, aber möglicher Weise unspezifischen Rolle von NO/cGMP bei der Gefäßaktivität auf pathophysiologisch erhöhte Kaliumkonzentrationen zu klären.

4.2.5.

Zusammenfassung

Ein basaler, perivaskulärer NO-Spiegel ist wichtig für die Aufrechterhaltung des Ruhetonus zerebraler Gefäße. NO spielt keine Rolle in der Vermittlung der Gefäßdilataion auf physiologisch gesteigerte Kaliumkonzentrationen. Bei pathophysiologischen Kaliumkonzentrationen kommt es jedoch zu einem Wechsel des Mechanismus der Gefäßdilataion. Hier ist ein konstanter NO Spiegel von zentraler Bedeutung für die Erhaltung der Gefäßdilataion, die bei NOS Blockade verschwindet bzw. sich in eine Gefäßkonstriktion wandelt. Hierbei hat NO wahrscheinlich die Rolle eines Modulators und die Wirkung von NO wird über den cGMP Weg vermittelt. Die permissive Wirkung von NO bei pathophysiologischen Kaliumkonzentrationen ist jedoch möglicher Weise nicht spezifisch, sondern auch durch bestimmte NO unabhängige Vasodilatoren (z.B. Nimodipin) zu erreichen.

4.3.

Beteiligung einzelner sowie Kombinationen unterschiedlicher Kaliumkanalfamilien

Übersicht über die Ergebnisse der Experimente zur Beteiligung unterschiedlicher Kaliumkanalfamilien an der Gefäßreaktion der isolierten MCA auf physiologisch und pathophysiologisch gesteigerte extraluminale Kaliumkonzentrationen:

1. *Es zeigt sich der Hinweis auf eine Beteiligung von K_{Ca} und K_{IR} am Ruhetonus:* Unter K_{Ca} und K_{IR} Inhibition kommt es zu einer milden Reduktion des Ruhedurchmessers. Unter K_{ATP} - und K_V -Blockade hingegen zeigt sich keine Abnahme des Ruhedurchmessers.
2. *Die Reaktion auf physiologisch erhöhte Kaliumkonzentrationen wird allein über K_{IR} Kaliumkanäle vermittelt:* Bei einer Konzentration von $140\mu\text{M}$ BaCl_2 zeigt sich ein vollständiges Verschwinden der Gefäßdilataion bei 12 mM und 20 mM K^+ .
3. *Andere Kaliumkanalfamilien spielen isoliert keine Rolle bei der Vermittlung der Gefäßreaktion auf physiologisch erhöhte Kaliumkonzentrationen:* Isoliertes Einwaschen von 4-AP, Glibenclamid und TEA bleibt ohne Einfluß auf die Gefäßreaktion bei 12 und 20 mM K^+ .
4. *Keine der vier Kaliumkanalfamilien spielt isoliert eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gefäßreaktion auf pathophysiologisch gesteigerte Kaliumkonzentrationen:* Allein bei Einwaschen von $140\mu\text{M}$ BaCl_2 zeigt sich eine milde Reduktion der Gefäßdilataion auf 40mM K^+ . Das Einwaschen von 4-AP, Glibenclamid und TEA bleibt ohne Einfluß auf die Gefäßreaktion bei 40 mM K^+ .

5. *Die kombinierte Aktivierung von K_{ATP} und K_{IR} spielt möglicher Weise eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des Ruhetonus:* Bei Einwaschen von 400 μM BaCl_2 zeigt sich eine signifikante Abnahme des Ruhetonus. In dieser Konzentration erzeugt BaCl_2 keine spezifische Blockade von K_{IR} , sondern es ist zumindest eine partielle Blockade von K_{ATP} anzunehmen (Nelson, M.T. und Quayle, J.M. 1995). Desweiteren zeigt sich bei kombiniertem Einwaschen von Glibenclamid und BaCl_2 eine signifikante Reduktion des Ruhetonus.

6. *Die kombinierte Aktivierung von K_{ATP} und K_{IR} spielt möglicher Weise eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gefäßdilatation auf pathophysiologisch gesteigerte Kaliumkonzentrationen:* Bei Einwaschen von 400 μM BaCl_2 sowie bei kombiniertem Einwaschen von Glibenclamid und BaCl_2 zeigt sich eine signifikante Abnahme der Gefäßdilatation auf 30 mM K^+ und 40 mM K^+ .

7. *Die kombinierte Aktivierung zweier, anderer Kaliumkanalfamilien ist möglicher Weise von geringerer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Gefäßdilatation auf pathophysiologisch gesteigerte Kaliumkonzentrationen:* In einzelnen Versuchen zu kombinierter Blockade von K_{ATP}/K_{Ca} , K_{ATP}/K_V und K_{Ca}/K_V zeigt sich kein Einfluß auf die Gefäßreaktion bei 40 mM Kalium.

8. *Die kombinierte Aktivierung von drei oder vier Kaliumkanalfamilien spielt eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Gefäßdilatation bei pathophysiologischen Kaliumkonzentrationen:* In den Versuchreihen zur kombinierten Blockade von $K_{Ca}/K_{ATP}/K_{IR}$ und $K_{Ca}/K_{ATP}/K_{IR}/K_V$ zeigt sich eine Reduktion des Ruhedurchmessers und ein Verschwinden der Gefäßdilatation bei 40 mM K^+ . Die zusätzliche Blockade von K_V hat hierbei keinen wesentlichen additiven Effekt.

4.3.1.

Kombinierte Kaliumkanalaktivierung spielt bei der Aufrechterhaltung des Ruhetonus eine Rolle

Unter Inhibition einzelner Kaliumkanalfamilien zeigte sich eine milde Reduktion des Ruhetonus unter BaCl_2 und TEA sowie eine leichte Zunahme des Durchmessers unter Glibenclamid. Unter 4-AP zeigte sich keine Änderung des Ruhedurchmessers. Eine Beteiligung von K_{IR} und K_{Ca} am Ruhetonus ist aus anderen Arbeiten bekannt (Johnson, T.D. et al. 1998; Fujii, K. et al. 1991; Faraci, F.M. und Heistad, D.D. 1998; Faraci, F.M. und Sobey, C.G. 1998; Gokina, N.I. et al. 1996; Hempelmann, R.G. et al. 1998). K_{ATP} spielen wahrscheinlich keine Rolle bei Erhaltung des Ruhedurchmessers (Fujii, K. et al. 1991; Lang, M.G. et al. 1997; Wang, Q. et al. 1998). Beides zeigt sich auch in anderen Arbeiten an dem hier verwendeten Modell (Lindauer, U. et al. 2003). Bei kombinierter Inhibition von K_{IR} und K_{ATP} zeigte sich eine zusätzliche Abnahme des Ruhedurchmessers als möglicher Hinweis auf eine kombinierte Beteiligung am Ruhetonus. Bei kombinierter Blockade mehrerer Kaliumkanalfamilien ($K_{\text{Ca}}/K_{\text{ATP}}/K_{\text{IR}}$ und $K_{\text{Ca}}/K_{\text{ATP}}/K_{\text{IR}}/K_{\text{V}}$) zeigt sich dementsprechend eine erwartungsgemäß deutlich signifikante Reduktion des Ruhedurchmessers.

4.3.2.

Die Gefäßdilatation auf physiologisch gesteigerte Kaliumkonzentrationen wird in der isolierten MCA über K_{IR} vermittelt

Alle vier bekannten Kaliumkanalfamilien werden an zerebralen Gefäßen exprimiert (Faraci, F.M. und Sobey, C.G. 1998; Johnson, T.D. et al. 1998; Nelson, M.T. und Quayle, J.M. 1995). Es ist seit längerem bekannt, dass Veränderungen der zerebralen Kaliumkonzentration mit Veränderungen des zerebralen Blutflusses einhergehen. Bei physiologischer Steigerung der zerebralen Kaliumkonzentration kommt es zu einer Vasodilatation und Zunahme des zerebralen Blutflusses (McCarron, J.G. und Halpern, W. 1990; Golding, E.M. et al. 2000; Kuschinsky, W. et al. 1972; Dreier, J.P. et al. 1995). Wie eingangs beschrieben sind in physiologischen Situationen (z.B. neuronale Erregung) Kaliumkonzentrationen bis ~ 12 mM gemessen worden (Sykova, E. 1983). Die hierbei auftretenden Vasodilatation ist wahrscheinlich alleine über K_{IR} vermittelt (Johnson, T.D. et al. 1998; Edwards, F.R. et al. 1988),

während bei Vasodilatation auf niedrige Kaliumkonzentrationen (0-5 mM) die Aktivität der Natrium/Kalium-ATPase eine Rolle zu spielen scheint (McCarron, J.G. und Halpern, W. 1990). In den vorliegenden Experimenten kommt es nach Steigerung der extraluminalen Kaliumkonzentration bis 20mM zu einer signifikanten Gefäßdilatation. Diese lässt sich durch Einwaschen von 140µM BaCl₂ unterdrücken. In dieser Konzentration ist BaCl₂ ein weitestgehend spezifischer Inhibitor von K_{IR} (Nelson, M.T. und Quayle, J.M. 1995). Es zeigt sich kein Einfluß auf die Vasodilatation bei 12 und 20mM K⁺ durch isolierte Inhibition anderer Kaliumkanalfamilien (K_V, K_{Ca}, K_{ATP}). Vorangehend wurde gezeigt, dass auch NO/cGMP keinen Einfluß auf diese Reaktion hat. Es bestätigt sich somit, dass die Gefäßreaktion auf physiologisch gesteigerte Kaliumkonzentrationen im Modell der isolierten MCA alleine über K_{IR} vermittelt ist und die Leitfähigkeit dieses Kaliumkanals offensichtlich nicht durch NO/cGMP beeinflusst wird. Andere Kaliumkanalfamilien haben hierauf anscheinend ebenfalls keinen Einfluß.

4.3.3.

Es kommt zu einer Reduktion der Vasodilatation auf pathophysiologische Kaliumkonzentrationen durch kombinierte Inhibition mehrerer Kaliumkanalfamilien

Wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben, kommt es zu einer Änderung des Mechanismus der Vermittlung zerebrovaskulärer Reaktion, wenn die zerebralen Kaliumkonzentrationen in pathophysiologische Bereiche ansteigen (≥ 30 mM). Ein basaler NO/cGMP Spiegel wird essentiell für die Erhaltung der Vasodilatation und damit des zerebralen Blutflusses. Dies konnte auch von anderen Gruppen in nicht MOPS gepufferten Systemen gezeigt werden (Golding, E.M. et al. 2001).

In den beschriebenen Experimenten des 2. Abschnitts sollte untersucht werden, ob es im Modell der isolierten MCA zu einer Änderung der beteiligten Kaliumkanalfamilien bei der Vermittlung der Vasodilatation bei pathophysiologischen Kaliumkonzentrationen kommt.

Es zeigte sich, dass die Inhibition einer einzelnen Kaliumkanalfamilie nicht zu einer Änderung (insbesondere Reduktion) der Vasodilatation auf pathophysiologische Kaliumkonzentrationen führt. Allein unter K_{IR} Inhibition zeigte sich eine leichte Reduktion der Gefäßantwort bei 40mM K⁺. Es wurden daraufhin Kombinationen

unterschiedlicher Kaliumkanalfamilien untersucht. Unter 400 μM BaCl_2 zeigte sich eine deutlich signifikante Reduktion der Vasodilatation auf 40 mM Kalium. In dieser Konzentration erzeugt BaCl_2 keine alleinige Blockade der K_{IR} , sondern eine zusätzliche partielle Blockade der K_{ATP} ist anzunehmen (Nelson, M.T. und Quayle, J.M. 1995). Dieses Ergebnis reproduzierte sich unter kombinierter Blockade von K_{IR} und K_{ATP} mit Glibenclamid und BaCl_2 .

Erweitert man das Experiment auf eine Dreifachblockade unterschiedlicher Kaliumkanalfamilien ($\text{K}_{\text{Ca}}/\text{K}_{\text{ATP}}/\text{K}_{\text{IR}}$) zeigt sich das vollständige Verschwinden der Dilatation unter 40 mM K^+ . Eine zusätzliche Blockade von K_{V} ($\text{K}_{\text{Ca}}/\text{K}_{\text{ATP}}/\text{K}_{\text{IR}}/\text{K}_{\text{V}}$) ergibt keinen additiven Effekt.

4.3.4.

Zusammenfassung

K_{IR} sind alleiniger Vermittler der Gefäßdilataion auf physiologisch gesteigerte Kaliumkonzentrationen (12mM, 20mM). Bei pathophysiologischen Kaliumkonzentrationen kommt es zu einer Veränderung des Mechanismus der Vermittlung der Gefäßdilataion. Die Gefäßdilataion bei 40 mM K^+ kann nicht durch alleinige Inhibition einzelner Kaliumkanalfamilien reduziert werden. Es kommt jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Gefäßdilataion bei kombinierter Inhibition von K_{IR} und K_{ATP} bzw. Verschwinden der Gefäßdilataion bei Inhibition von drei oder vier Kaliumkanalfamilien gleichzeitig.

Zusätzlich spielt der permissive Effekt eines basalen NO/cGMP Spiegels eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Vasodilatation bei 40 mM K^+ . Ob es sich bei diesen beiden Ergebnissen um ein „Nebeneinander“ zweier unabhängiger Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Vasodilatation handelt oder beide Systeme mit einander interagieren kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht abgeleitet werden. Eine Interaktion ist jedoch zu vermuten, da eine Beeinflussung von Kaliumkanalfamilien durch NO/cGMP in anderen Arbeiten beschrieben wurde.

4.4.

Übergreifende Interpretation und Ausblick

Wie erwähnt wird eine tragende Rolle für das NO/cGMP System einerseits sowie für Kalium und Kaliumkanäle andererseits im Rahmen neurovaskulärer Kopplung diskutiert. Dies ist möglicher Weise für physiologische Situationen (funktionelle Bildgebung) wie auch pathophysiologische Situationen relevant (SAB, Trauma, Ischämie) (Villringer,A. und Dirnagl,U. 1995; Faraci,F.M. und Heistad,D.D. 1998). Es folgt eine Interpretation der Ergebnisse der beschriebenen Experimente einerseits vor experimentellem Hintergrund, aber auch der Versuch einer Eingliederung in den klinischen Kontext sowie ein Ausblick auf mögliche Folgestudien.

4.4.1.

Die drei zentralen Ergebnisse dieser Arbeit sind

- 1) Bei pathophysiologischen Kaliumkonzentrationen ($\geq 30\text{mM}$) besteht eine deutliche Vasodilatation, die jedoch abnimmt je höher die Kaliumkonzentration ansteigt.
- 2) Bei Anstieg der Kaliumkonzentration von physiologischen in pathophysiologische Bereiche ändert sich der Mechanismus durch den die Vasodilatation vermittelt wird.
- 3) Das NO/cGMP System ist als Modulator essentiell zur Erhaltung der Vasodilatation bei pathophysiologischen Kaliumkonzentrationen.

Alle drei Phänomene spielen möglicher Weise eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung des Blutflusses in unterschiedlichen funktionellen Zuständen des Gehirns.

4.4.2.

Komplexe Mechanismen spielen eine Rolle bei Vasodilatation bei pathophysiologischen Kaliumkonzentrationen

Die (patho)physiologischen Hintergründe, warum es zu einer Änderung des Mechanismus der Vermittlung von Vasodilatation mit ansteigender

Kaliumkonzentration kommt, sind nicht geklärt. Die Aktivität von Kaliumkanälen und NO scheint jedoch eine zentrale Rolle zu spielen. (Faraci,F.M. und Heistad,D.D. 1998; Nelson,M.T. und Quayle,J.M. 1995).

Bei mäßiger Steigerung der extrazellulären Kaliumkonzentration kommt es zu einer Aktivierung von K_{IR} und Kaliumaustrom. Dies führt zu einer Hyperpolarisation der Zelle und letztlich Gefäßdilatation (Nelson,M.T. und Quayle,J.M. 1995). K_{IR} wird durch NO/cGMP nicht beeinflusst. Es zeigt sich deshalb keine Änderung der Gefäßdilatation unter NOS-Blockade.

Unter hohen Kaliumkonzentrationen (> 30 mM) ist die Beeinflussung von Kaliumkanälen unklar. Es wurde vorne gezeigt, dass unter diesen Bedingungen NO/cGMP eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Vasodilatation spielt. Es ist bekannt, dass NO die Aktivität von Kaliumkanälen (insbes. K_{ATP} und K_{Ca}) beeinflussen kann (Archer,S.L. et al. 1994; Bolotina,V.M. et al. 1994; Shinbo,A. und Iijima,T. 1997; Lindauer,U et al. 2003; Han,J. et al. 2002). K_{ATP} (und K_{Ca}) scheint jedoch keine alleinige Rolle in der Vermittlung der Vasodilatation unter hohen Kaliumkonzentrationen zu spielen. In kombinierter Blockade mit K_{IR} scheint der K_{ATP} jedoch an Bedeutung zu gewinnen.

Es ist zu diskutieren, ob es in diesem Modell bei hohen Kaliumkonzentrationen möglicher Weise durch Veränderung des Membranpotentials von Endothelzellen zu einer Änderung endothelialer NOS Produktion kommt.

Hypothese

In dem komplexen Zusammenspiel dieser Faktoren könnte man folgende Hypothese aufstellen:

Ansteigende Kaliumkonzentrationen aktivieren K_{IR} und durch die dabei entstehende Hyperpolarisation kommt es zur Vasodilatation. Erreichen die extrazellulären Kaliumkonzentrationen jedoch einen bestimmten Level, kommt es zu einer zunehmenden Dysfunktion der K_{IR} . Durch die Aktivierung anderer Kaliumkanäle wird versucht, diesen Zustand zu kompensieren. Dies gelingt bei sehr hohen Kaliumkonzentrationen nicht mehr und die Vasodilatation verschwindet bzw. es kommt zur Vasokonstriktion. Ein basaler NO Spiegel erhält den Ruhetonus über cGMP basierte sowie ggf. andere Mechanismen aufrecht. Bei physiologisch gesteigerten Kaliumkonzentrationen ist dieser (basale) Effekt nicht relevant, da der

Effekt der aktivierten K_{IR} deutlich überwiegt. Mit nachlassender Funktion der K_{IR} jedoch wird die Aktivierung von anderen Kaliumkanalgruppen wichtig, wobei NO eine Rolle spielen könnte. Fehlt NO kann die Aktivierung der anderen Kaliumkanalgruppen nur unzureichend erfolgen und es kommt deutlich früher zur Vasokonstriktion. Dass auch andere Vasodilatoren den Effekt von NO zumindest zum Teil imitieren können, könnte dadurch erklärt werden, dass z.B. Kaliumkanäle auf vielen Wegen neben NO aktiviert werden können, K_{ATP} z.B. durch cAMP, EDHF, VIP, Adenosin, Prostacyclin etc. (Faraci, F.M. und Heistad, D.D. 1998).

Derzeit kann man mit Sicherheit nur sagen, dass eine komplexe Interaktion von Kaliumkanälen, NO/cGMP und anderen Mechanismen bei der Erhaltung der Vasodilatation bei pathophysiologisch gesteigerten Kaliumkonzentrationen besteht, wobei ein modulatorischer, vasodilatatorischer Effekt, z.B. durch NO/cGMP vermittelt, eine Voraussetzung für Vasodilatation darstellt und unterschiedliche Kaliumkanäle wahrscheinlich kombiniert aktiviert werden, bzw. in ihrer Funktion kompensatorisch wirksam werden können. Ebenso ist unklar, in wie weit das vaskuläre Endothel bei der Vermittlung der Dilatation auf pathophysiologische Kaliumkonzentrationen eine Rolle spielt.

4.4.3.

Vasokonstriktion bei pathophysiologischen Kaliumkonzentrationen unter NOS Blockade ist möglicher Weise der Mechanismus der Cortical Spreading Ischaemia

Aus in vivo Versuchen zur Cortical Spreading Depression (CSD) ist bekannt, dass es nach einer vorübergehenden Steigerung der extraluminale Kaliumkonzentration zu einer Steigerung des zerebralen Blutflusses kommt. Diese transiente Hyperämie nach CSD wandelt sich unter erhöhter Kaliumkonzentration in eine Oligämie oder Ischämie, die sog. Cortical Spreading Ischaemia (CSI), wenn gleichzeitig die NOS inhibiert oder unter Hinzugabe von Hämoglobin, einem NO-Scavenger, der basale NO-Spiegel reduziert ist (Dreier, J.P. et al. 1998). Wie in den vorliegenden Versuchen wurde auch in vivo gezeigt, dass sich unter NOS Inhibition eine CSI wieder in eine Hyperämie wandelt, wenn NO oder NO unabhängige Vasodilatoren wie Nimodipin oder Papaverin hinzugegeben werden (Dreier, J.P. et al. 2002; Windmüller, O. et al.

2005). CSI könnten möglicher Weise ein pathophysiologisches Korrelat für verzögerte ischämische Defizite nach Subarachnoidalblutung darstellen. Nach Subarachnoidalblutung kommt es durch Zerfall der Erythrozyten zu einer ähnlichen Situation, wie in den hier gezeigten in-vitro sowie den zitierten in-vivo Experimenten modellhaft dargestellt (Windmuller,O. et al. 2005). Die extraluminale Kaliumkonzentration steigt an und Hämoglobin (ein endogener NO Scavenger) reduziert die NO Konzentration.

Es könnte sein, dass das hier beschriebene Phänomen der Umkehr einer Vasodilatation in eine Vasokonstriktion bei hohen Kaliumkonzentrationen unter NOS Blockade den grundlegenden Mechanismus einer CSI darstellt (Windmuller,O. et al. 2005). Die Bedeutung gefäßintrinsic Mechanismen (unabhängig vom Hirnparenchym) hierbei wird unterstützt durch die Befunde einer reduzierten Vasoreaktion auf Azidose und erhöhte Kaliumkonzentrationen in Gefäßen von Tieren, die vorher einer CSD ausgesetzt waren (Seitz,I. et al. 2004). Die Pathophysiologie verzögerter ischämischer Defizite nach Subarachnoidalblutung ist noch unzureichend Verstanden. CSI bilden jedoch möglicher Weise einen Teilaspekt des Mechanismus. Dieses wird unterstützt durch eine derzeit laufende klinische Studie (COSBID), die versucht CSD/CSI bei Patienten mit SAB durch invasive Messungen nachzuweisen. Bei vereinzelt Patienten mit SAB und konsekutiven Infarkten konnten erstmalig CSI ähnliche Korrelate gemessen werden (Dreier J, Major S., persönliche Mitteilung). Hinzu kommt jedoch, dass nach SAB eine Reihe anderer Phänomene auftreten, die einen erheblichen Einfluß auf den Blutfluss haben können. Gezeigt wurde, dass die Aktivität von K_v nach SAB vermindert ist und es kommt zu Veränderungen bei einer Vielzahl von anderen vasoaktiven Substanzen wie z.B. Endothelin etc. (Dietrich,H.H. und Dacey,R.G., Jr. 2000; Quan,L. und Sobey,C.G. 2000).

4.4.4.

Veränderungen von NO/cGMP, Kaliumkanalaktivität und zerebrovaskulärer Reaktivität spielt eine Rolle in vielen Situationen

Da Steigerung der extraluminale Kaliumkonzentration in vielen Situationen mit Zellschaden auftritt ist eine Beeinflussung vaskulärer Reaktivität auch bei anderen Krankheitsmodellen wie zerebrales Trauma oder Ischämie anzunehmen. In

experimentellen Traumamodellen sind Veränderungen neurovaskulärer Kopplung beschrieben worden ebenso wie Änderungen des Verhältnisses vasokonstriktorischer und dilatatorischer Faktoren (Golding, E.M. 2002). Mechanismen veränderter zerebrovaskulärer Reaktion, die auf verändertem NO und Kalium Metabolismus beruhen, könnten einen Teilaspekt der komplexen Mechanismen darstellen, die in diesen Situationen zu sekundären Gewebeschäden führen.

Viele Daten aus der Literatur zeigen, dass es darüber hinaus bei chronischen Erkrankungen zu Veränderungen der Vasoreaktion zerebraler Gefäße kommt, insbesondere auch zu Veränderungen bezüglich der Aktivität von Kaliumkanälen und NO/cGMP (Faraci, F.M. und Heistad, D.D. 1998; Faraci, F.M. und Sobey, C.G. 1998). Beispiele hierfür sind Erkrankungen wie Hypertonus oder Diabetes Mellitus. Zum Teil werden diese Erkrankungen mit Medikamenten behandelt, die einen Einfluß auf die Aktivität von Kaliumkanälen oder NO/cGMP haben (z.B. Glibenclamid = orales Antidiabetikum). Inwiefern dies Einfluß hat auf die Ergebnisse funktioneller bildgebender Verfahren, die eine immer größere Gewichtung in der klinischen Diagnostik bekommen, oder auf die Entwicklung von spezifischen vaskulären Phänomenen wie z.B. verzögerte Vasospasmen ist derzeit nicht abzusehen (Villringer, A. und Dirnagl, U. 1995). Hinweise darauf, dass z.B. die Beeinflussung der besprochenen Mechanismen wichtig für den Verlauf zerebrovaskulärer Erkrankungen sein kann, ist jedoch klinisch offensichtlich. Dies zeigt sich z.B. im Einsatz von Nimodipin oder NO-Donor nach SAB oder Beeinflussung des Schlaganfall-Outcome durch Glibenclamid (Dorsch, N.W. 2002; Kunte, H. et al. 2007).

4.4.5.

Die Arbeit bietet Grundlagen für die weitere Charakterisierung der zerebrovaskulären Reaktion in pathophysiologischen Situationen

In weiteren Folgestudien wäre es interessant mit elektrophysiologischen Methoden die Aktivität von K_{IR} sowie der anderen Kaliumkanalfamilien unter ansteigenden Kaliumkonzentrationen mit und ohne NOS Inhibition zu untersuchen. Insbesondere eine elektrophysiologische Charakterisierung der Kaliumkanalaktivität unterschiedlicher Kaliumkanalfamilien (z.B. K_{ATP} od. K_{Ca}) unter pathophysiologischen Kaliumkonzentrationen könnte zum weiteren Verständnis der hier untersuchten Mechanismen beitragen. Desweiteren könnte in dem hier verwendeten Modell

untersucht werden, ob sich durch K_{ATP} oder K_{Ca} Öffner (z.B. Pinacidil/NS1619) die Vasokonstriktion bei hohen Kaliumkonzentrationen unter NOS Inhibition aufheben lässt, ähnlich wie mit anderen NO unabhängigen Vasodiatoren. Es sollte außerdem die Bedeutung endothelialer Mechanismen auf die Vasodilatation unter hohen Kaliumkonzentrationen in Folgestudien untersucht werden.

Vor dem Hintergrund der oben angeführten klinischen Aspekte wäre es des Weiteren interessant, ob sich die hier gezeigten Ergebnisse in Krankheitsmodellen, wie hypertensiven oder Diabetes Tieren reproduzieren lassen, oder, etwas weiter gedacht, ob es klinisch Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens eines Vasospasmus nach SAB zwischen Kontrollen und Patienten gibt, die z.B. mit Glibenclamid vorbehandelt wurden.

ANHANG

Abkürzungen

K ⁺	Kalium
[K ⁺]	Kaliumkonzentration
[K ⁺] _e	Kaliumkonzentration extrazellulär
MCA	Arteria Cerebri Media
NO	Stickstoff Monoxid
NOS	NO-Synthase
cGMP	zyklisches Guanosin Monophosphat
8-Bromo-cGMP	8-Bromoguanosin 3',5'-zyklisches Monophosphat
LNNA	N-nitro-L-arginin
SNAP	S-nitroso-N-acetylpenicillamin
ODQ	1 <i>H</i> -[1,2,4]oxodiazolo[4,3- <i>a</i>]quinoxalin-1-eins
BaCl	Barium-Chlorid
TEA	Tetraethylammonium
4-AP	4-Aminopyridin
Glib.	Glibenclamid
K _{ATP}	ATP-abhängige Kaliumkanäle
K _{CA}	Calcium-abhängige Kaliumkanäle
K _v	Spannungsabhängige Kaliumkanäle
K _{ir}	einwärts gleichrichtende (inward rectifier) Kaliumkanäle
ATP	Adenosin Triphosphophat
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
MOPS	3-(N-morpholino)propanosulfonsäure
NaCl	Natrium-Chlorid
KCl	Kalium-Chlorid
CaCl ₂	Calcium-Chlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
NaH ₂ PO ₄	Natriumphosphat
Aqua bidest.	Bidestilliertes Wasser
sGC	lösliche Guanylatcyclase
O ₂	Sauerstoff

Ach	Acetylcholin
H ⁺	Wasserstoff Ionen
SAB	Subarachnoidalblutung
CSD	Cortical Spreading Depression
CSI	Cortical Spreading Ischaemia
EDRF	Endothelial Derived Relaxing Factor
EDCF	Endothelial Derived Contracting Factor
EDHF	Endothelial Derived Hyperpolarizing Factor
iNOS	induzierbare NOS
eNOS	endotheliale NOS
nNOS	neuronale NOS
CGRP	Calcitonin Gene Related Peptide

Literatur

1. Akgören, N., Dalgaard, P., Lauritzen, M., 1996. Cerebral blood flow increases evoked by electrical stimulation of rat cerebellar cortex: relation to excitatory synaptic activity and nitric oxide synthesis. *Brain Research*. 710, 204-214
2. Alonso, M.J., Salaices, M., Sanchez-Ferrer, C.F., and Marin, J., 1992. Predominant role for nitric oxide in the relaxation induced by acetylcholine in cat cerebral arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 261, 12-20.
3. Altura, B.M., Altura, B.T., Carella, A., and Turlapaty, P.D., 1980. Adverse effects of artificial buffers on contractile responses of arterial and venous smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 69, 207-214.
4. Archer, S.L., Huang, J.M., Hampl, V., Nelson, D.P., Shultz, P.J., and Weir, E.K., 1994. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91, 7583-7587.
5. Armstead, W.M., 1997a. Brain injury impairs ATP-sensitive K⁺ channel function in piglet cerebral arteries. *Stroke*. 28, 2273-2279.
6. Armstead, W.M., 1997b. Role of impaired cAMP and calcium-sensitive K⁺ channel function in altered cerebral hemodynamics following brain injury. *Brain Res*. 768, 177-184.
7. Astrup, J., Rehncrona, S., and Siesjo, B.K., 1980. The increase in extracellular potassium concentration in the ischemic brain in relation to the preischemic functional activity and cerebral metabolic rate. *Brain Res*. 199, 161-174.
8. Attwell, D. and Iadecola, C., 2002. The neural basis of functional brain imaging signals. *Trends Neurosci*. 25, 621-625.
9. Birse, S.H. and Tom, M.I., 1960. Incidence of cerebral infarction associated with ruptured intracranial aneurysms. A study of 8 unoperated cases of anterior cerebral aneurysm. *Neurology*. 10, 101-106.
10. Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J., and Cohen, R.A., 1994. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. 368, 850-853.

11. Bratz, I.N., Falcon, R., Partridge, L.D., and Kanagy, N.L., 2002. Vascular smooth muscle cell membrane depolarization after NOS inhibition hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 282, H1648-H1655.
12. Bryan, R.M., Jr., Eichler, M.Y., Swafford, M.W., Johnson, T.D., Suresh, M.S., and Childres, W.F., 1996. Stimulation of alpha 2 adrenoceptors dilates the rat middle cerebral artery. *Anesthesiology.* 85, 82-90.
13. Bryan, R.M., Jr., You, J., Phillips, S.C., Andresen, J.J., Lloyd, E.E., Rogers, P.A., Dryer, S.E. and Marrelli S.P. 2006. Evidence for two-pore domain potassium channels in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291:H770-H780.
14. Bukoski, R.D., Wang, S.N., Bian, K., and DeWitt, D.S., 1997. Traumatic brain injury does not alter cerebral artery contractility. *Am J Physiol.* 272, H1406-H1411.
15. Busse, R., 1997. Gefäßsystem und Kreislaufregulation. R.F.Schmidt and G.Thews (Eds.), *Physiologie des Menschen.* Springer Verlag, pp. 498-561.
16. Cosentino, F., Sill, J.C., and Katusic, Z.S., 1993. Endothelial L-arginine pathway and relaxations to vasopressin in canine basilar artery. *Am J Physiol.* 264, H413-H418.
17. Dacey, R.G. and Duling, B.R., 1982. A study of rat intracerebral arterioles: methods, morphology and reactivity. *Am J Physiol.* 1982; 243: H598-H606
18. DeWitt, D.S. and Prough, D.S., 2003. Traumatic cerebral vascular injury: the effects of concussive brain injury on the cerebral vasculature. *J Neurotrauma.* 20, 795-825.
19. Dietrich, H.H. and Dacey, R.G., Jr., 2000. Molecular keys to the problems of cerebral vasospasm. *Neurosurgery.* 46, 517-530.
20. Dirnagl, U., Lindauer, U., and Villringer, A., 1993. Role of nitric oxide in the coupling of cerebral blood flow to neuronal activation in rats. *Neurosci Lett.* 149, 43-46.
21. Dorsch, N.W., 2002. Therapeutic approaches to vasospasm in subarachnoid hemorrhage. *Curr Opin Crit Care.* 8, 128-133.

22. Dreier, J.P., Korner, K., Ebert, N., Gorner, A., Rubin, I., Back, T., Lindauer, U., Wolf, T., Villringer, A., Einhaupl, K.M., Lauritzen, M., and Dirnagl, U., 1998. Nitric oxide scavenging by hemoglobin or nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-L-arginine induces cortical spreading ischemia when K⁺ is increased in the subarachnoid space. *J Cereb Blood Flow Metab.* 18, 978-990.
23. Dreier, J.P., Korner, K., Gorner, A., Lindauer, U., Weih, M., Villringer, A., and Dirnagl, U., 1995. Nitric oxide modulates the CBF response to increased extracellular potassium. *J Cereb Blood Flow Metab.* 15, 914-919.
24. Dreier, J.P., Windmuller, O., Petzold, G., Lindauer, U., Einhaupl, K.M., and Dirnagl, U., 2002. Ischemia triggered by red blood cell products in the subarachnoid space is inhibited by nimodipine administration or moderate volume expansion/hemodilution in rats. *Neurosurgery.* 51, 1457-1465.
25. Dudel, J., 1998. *Grundlagen der Zellphysiologie.* R.F.Schmidt and G.Thews (Eds.), *Physiologie des Menschen.* Springer Verlag, pp. 3-19.
26. Duling, R.M. and Rivers, R.J., 1986. Isolation, cannulation and perfusion of microvessels. Baker, C.H. and Nastuk, W.L. (Eds.) *Microcirculatory Technology.* Academic Press, Orlando Florida.
27. Edwards, F.R., Hirst, G.D., and Silverberg, G.D., 1988. Inward rectification in rat cerebral arterioles; involvement of potassium ions in autoregulation. *J Physiol.* 404, 455-466.
28. Ellison, M.D., Erb, D.E., Kontos, H.A., and Povlishock, J.T., 1989. Recovery of impaired endothelium-dependent relaxation after fluid-percussion brain injury in cats. *Stroke.* 20, 911-917.
29. Faraci, F.M. and Heistad, D.D., 1998. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev.* 78, 53-97.
30. Faraci, F.M. and Sobey, C.G., 1998. Role of potassium channels in regulation of cerebral vascular tone. *J Cereb Blood Flow Metab.* 18, 1047-1063.
31. Filosa, J.A., Bonev, A.D., Straub, S.V., Meredith, A.L., Wilkerson, M.K., Aldrich, R.W., Nelson, M.T. 2006. Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nature Neuroscience.* 9, 1397-1403
32. Fujii, K., Heistad, D.D., and Faraci, F.M., 1991. Flow-mediated dilatation of the basilar artery in vivo. *Circ Res.* 69, 697-705.

33. Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288, 373-376.
34. Garthwaite, J., Southam, E., Boulton, C.L., Nielsen, E.B., Schmidt, K., and Mayer, B., 1995. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol*. 48, 184-188.
35. Girouard, H. and Iadecola, C., 2006. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl Physiol*. 100, 328-335.
36. Gokina, N.I., Wellman, T.D., Bevan, R.D., Walters, C.L., Penar, P.L., and Bevan, J.A., 1996. Role of Ca(2+)-activated K⁺ channels in the regulation of membrane potential and tone of smooth muscle in human pial arteries. *Circ Res*. 79, 881-886.
37. Golding, E.M., 2002. Sequelae following traumatic brain injury. The cerebrovascular perspective. *Brain Res Brain Res Rev*. 38, 377-388.
38. Golding, E.M., Marrelli, S.P., You, J., and Bryan, R.M., Jr., 2002. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in the brain: a new regulator of cerebral blood flow? *Stroke*. 33, 661-663.
39. Golding, E.M., Steenberg, M.L., Contant, C.F., Jr., Krishnappa, I., Robertson, C.S., and Bryan, R.M., Jr., 1999. Cerebrovascular reactivity to CO₂ and hypotension after mild cortical impact injury. *Am J Physiol*. 277, H1457-H1466.
40. Golding, E.M., Steenberg, M.L., Johnson, T.D., and Bryan, R.M., Jr., 2000. The effects of potassium on the rat middle cerebral artery. *Brain Res*. 880, 159-166.
41. Golding, E.M., Steenberg, M.L., Johnson, T.D., and Bryan, R.M., 2001. Nitric oxide in the potassium-induced response of the rat middle cerebral artery: a possible permissive role. *Brain Res*. 889, 98-104.
42. Graham, D.I., Ford, I., Adams, J.H., Doyle, D., Teasdale, G.M., Lawrence, A.E., and McLellan, D.R., 1989. Ischaemic brain damage is still common in fatal non-missile head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 52, 346-350.

43. Han, J., Kim, N., Joo, H., Kim, E., and Earm, Y.E., 2002. ATP-sensitive K(+) channel activation by nitric oxide and protein kinase G in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283, H1545-H1554.
44. Hansen, A.J. and Zeuthen, T., 1981. Extracellular ion concentrations during spreading depression and ischemia in the rat brain cortex. *Acta Physiol Scand.* 113, 437-445.
45. Hempelmann, R.G., Pradel, R.H., Mehdorn, H.M., and Ziegler, A., 1998. Contractions induced by NO synthase inhibition in isolated rat basilar artery: role of the endothelium and endogenous vasoconstrictors. *Neurol Res.* 20, 63-72.
46. Iadecola, C., Pelligrino, D.A., Moskowitz, M.A., and Lassen, N.A., 1994. Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 14, 175-192.
47. Iadecola, C., Zhang, F., Xu, X. 1994. SIN-1 reverses attenuation of hypercapnic cerebrovasodilatation by nitric oxide synthase inhibitors. *Am J. Phys* 267, R228-R235
48. Ignacio, C.S., Curling, P.E., Childres, W.F., and Bryan, R.M., Jr., 1997. Nitric oxide-synthesizing perivascular nerves in the rat middle cerebral artery. *Am J Physiol.* 273, R661-R668.
49. Johnson, T.D., Marrelli, S.P., Steenberg, M.L., Childres, W.F., and Bryan, R.M., Jr., 1998. Inward rectifier potassium channels in the rat middle cerebral artery. *Am J Physiol.* 274, R541-R547.
50. Katayama, Y., Becker, D.P., Tamura, T., and Hovda, D.A., 1990. Massive increases in extracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury. *J Neurosurg.* 73, 889-900.
51. Katayama, Y., Mori, T., Maeda, T., and Kawamata, T., 1998. Pathogenesis of the mass effect of cerebral contusions: rapid increase in osmolality within the contusion necrosis. *Acta Neurochir Suppl (Wien).* 71, 289-292.
52. Kontos, H.A. and Wei, E.P., 1992. Endothelium-dependent responses after experimental brain injury. *J Neurotrauma.* 9, 349-354.
53. Kontos, H.A. and Wei, E.P., 1993. Hydroxyl radical-dependent inactivation of guanylate cyclase in cerebral arterioles by methylene blue and by LY83583. *Stroke.* 24, 427-434.

54. Kunte,H., Schmidt,S., Eliasziw,M., del Zoppo,G.J., Simard,J.M., Masuhr,F., Weih,M., and Dirnagl,U., 2007. Sulfonylureas improve outcome in patients with type 2 diabetes and acute ischemic stroke. *Stroke*. 38, 2526-2530.
55. Kuschinsky,W., Wahl,M., Bosse,O., and Thurau,K., 1972. Perivascular potassium and pH as determinants of local pial arterial diameter in cats. A microapplication study. *Circ Res*. 31, 240-247.
56. Lang,M.G., Paterno,R., Faraci,F.M., and Heistad,D.D., 1997. Mechanisms of adrenomedullin-induced dilatation of cerebral arterioles. *Stroke*. 28, 181-185.
57. Li,J. and Iadecola,C., 1994. Nitric oxide and adenosine mediate vasodilation during functional activation in cerebellar cortex. *Neuropharmacology*. 33, 1453-1461.
58. Lindauer,U., Kunz,A., Schuh-Hofer,S., Vogt,J., Dreier,J.P., and Dirnagl,U., 2001. Nitric oxide from perivascular nerves modulates cerebral arterial pH reactivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 281, H1353-H1363.
59. Lindauer,U., Megow,D., Matsuda,H., and Dirnagl,U., 1999. Nitric oxide: a modulator, but not a mediator, of neurovascular coupling in rat somatosensory cortex. *Am J Physiol*. 277, H799-H811.
60. Lindauer,U., Vogt,J., Schuh-Hofer,S., Dreier,J.P., and Dirnagl,U., 2003. Cerebrovascular vasodilation to extraluminal acidosis occurs via combined activation of ATP-sensitive and Ca²⁺-activated potassium channels. *J Cereb Blood Flow Metab*. 23, 1227-1238.
61. Long,W., Zhang,L., and Longo,L.D., 2000. Cerebral artery K(ATP)- and K(Ca)-channel activity and contractility: changes with development. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 279, R2004-R2014.
62. Ma,J., Meng,W., Ayata,C., Huang,P.L., Fishman,M.C., and Moskowitz,M.A., 1996. L-NNA-sensitive regional cerebral blood flow augmentation during hypercapnia in type III NOS mutant mice. *Am J Physiol*. 271, H1717-H1719.
63. Metea,M.R., Kofuji, P. and Newman, E.A., 2007. Neurovascular Coupling is not mediated by potassium siphoning from glial cells. *J Neuroscience*. 27(10):2468-2471.
64. McCarron,J.G. and Halpern,W., 1990. Potassium dilates rat cerebral arteries by two independent mechanisms. *Am J Physiol*. 259, H902-H908.

65. Nelson, M.T. and Quayle, J.M., 1995. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol.* 268, C799-C822.
66. Newman, E.A., 1986. High potassium conductance in astrocyte endfeet. *Science.* 233, 453-454.
67. Palmer, R.M., Ashton, D.S., and Moncada, S., 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 333, 664-666.
68. Palmer, R.M., Ferrige, A.G., and Moncada, S., 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327, 524-526.
69. Paulson, O.B. and Newman, E.A., 1987. Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science.* 237, 896-898.
70. Paulson, O.B., Strandgaard, S., and Edvinsson, L., 1990. Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 2, 161-192.
71. Pluta, R.M., 2005. Delayed cerebral vasospasm and nitric oxide: review, new hypothesis, and proposed treatment. *Pharmacol Ther.* 105, 23-56.
72. Quan, L. and Sobey, C.G., 2000. Selective effects of subarachnoid hemorrhage on cerebral vascular responses to 4-aminopyridine in rats. *Stroke.* 31, 2460-2465.
73. Quayle, J.M., McCarron, J.G., Brayden, J.E., and Nelson, M.T., 1993. Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries. *Am J Physiol.* 265, C1363-C1370.
74. Robertson, B.E., Schubert, R., Hescheler, J., and Nelson, M.T., 1993. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 265, C299-C303.
75. Rosenblum, W.I., 1983. Effects of free radical generation on mouse pial arterioles: probable role of hydroxyl radicals. *Am J Physiol.* 245, H139-H142.
76. Rosenblum, W.I., Wei, E.P., and Kontos, H.A., 2001. Dimethylsulfoxide and ethanol, commonly used diluents, prevent dilation of pial arterioles by openers of K(ATP) ion channels. *Eur J Pharmacol.* 430, 101-106.

77. Roy, C.S. and Sherrington, C.S., 1890. On the regulation of the blood-supply of the brain. *J Physiol.* 1890;11:85-108
78. Sabatini, U., Boulanouar, K., Fabre, N., Martin, F., Carel, C., Colonnese, C., Bozzao, L., Berry, I., Montastruc, J.L., Chollet, F., and Rascol, O., 2000. Cortical motor reorganization in akinetic patients with Parkinson's disease: a functional MRI study. *Brain.* 123 (Pt 2), 394-403.
79. Seitz, I., Dirnagl, U., and Lindauer, U., 2004. Impaired vascular reactivity of isolated rat middle cerebral artery after cortical spreading depression in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab.* 24, 526-530.
80. Shinbo, A. and Iijima, T., 1997. Potentiation by nitric oxide of the ATP-sensitive K⁺ current induced by K⁺ channel openers in guinea-pig ventricular cells. *Br J Pharmacol.* 120, 1568-1574.
81. Silbernagl, S. and Lang, F., 1998a. Herz und Kreislauf. *dtv-Atlas Pathophysiologie.* dtv, pp. 176-177.
82. Silbernagl, S. and Lang, F., 1998b. Störungen der Hirndurchblutung, Schlaganfall. *dtv-Atlas Pathophysiologie.* dtv, pp. 360-361.
83. Sobey, C.G. and Faraci, F.M., 1997. Effects of a novel inhibitor of guanylyl cyclase on dilator responses of mouse cerebral arterioles. *Stroke.* 28, 837-842.
84. Sobey, C.G. and Faraci, F.M., 1998. Subarachnoid haemorrhage: what happens to the cerebral arteries? *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 25, 867-876.
85. Sykova, E., 1983. Extracellular K⁺ accumulation in the central nervous system. *Prog Biophys Mol Biol.* 42, 135-189.
86. Vaidya, C.J., Austin, G., Kirkorian, G., Ridlehuber, H.W., Desmond, J.E., Glover, G.H., and Gabrieli, J.D., 1998. Selective effects of methylphenidate in attention deficit hyperactivity disorder: a functional magnetic resonance study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 14494-14499.
87. Vajkoczy, P., Meyer, B., Weidauer, S., Raabe, A., Thome, C., Ringel, F., Breu, V., Schmiedek, P., 2005. Clazosentan (AXV-034343), a selective endothelin A receptor antagonist, in the prevention of cerebral vasospasm following severe aneurysmal subarachnoid hemorrhage: results of a randomized, double blind, placebo-controlled, multicenter phase IIa study. *J neurosurg.* 103(1):9-17.

88. Villringer, A. and Dirnagl, U., 1995. Coupling of brain activity and cerebral blood flow: basis of functional neuroimaging. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 7, 240-276.
89. Wang, Q., Bryan, R.M., Jr., and Pelligrino, D.A., 1998. Calcium-dependent and ATP-sensitive potassium channels and the 'permissive' function of cyclic GMP in hypercapnia-induced pial arteriolar relaxation. *Brain Res.* 793, 187-196.
90. Windmuller, O., Lindauer, U., Foddiss, M., Einhaupl, K.M., Dirnagl, U., Heinemann, U., and Dreier, J.P., 2005. Ion changes in spreading ischaemia induce rat middle cerebral artery constriction in the absence of NO. *Brain.* 128, 2042-2051.
91. Zhao, Y., Brandish, P.E., DiValentin, M., Schelvis, J.P., Babcock, G.T., and Marletta, M.A., 2000. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Biochemistry.* 39, 10848-10854.
92. Zimmermann, P.A., Knot, H.J., Stevenson, A.S., and Nelson, M.T., 1997. Increased myogenic tone and diminished responsiveness to ATP-sensitive K⁺ channel openers in cerebral arteries from diabetic rats. *Circ Res.* 81, 996-1004.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Fr. Prof. Dr. Ute Lindauer für die Überlassung des Themas, die nette und intensive Betreuung, die umfangreiche wissenschaftliche Ausbildung ebenso wie für die Motivation, konstruktive Kritik und Diskussion in allen Abschnitten dieser Arbeit bedanken.

Ebenso danke ich Hr. Prof. Dr. Ulrich Dirnagl für die Diskussion und wertvollen Hinweise insbes. bzgl. der Präsentation von Teilaspekten dieser Arbeit, aber auch für die Möglichkeit, die Anfertigung dieser Arbeit in der hoch motivierenden und sympathischen Abteilung für Experimentelle Neurologie der Charité durchführen zu dürfen.

Für die Möglichkeit der klinischen Ausbildung möchte ich mich bei Hr. Prof. Dr. Karl M. Einhäupl und der Abt. für Neurologie der Charité am Campus Virchow-Klinikum bedanken. Hier gilt mein Dank insbesondere Hr. Prof. Dr. Andreas Kupsch und der AG Bewegungsstörungen (insbes. Drs. Thomas Trottenberg, Anatol Kivi und Doreen Gruber).

Fr. Dr. Sigrid Schuh-Hofer möchte ich für die Betreuung während des experimentellen Teils dieser Arbeit danken.

Für Diskussion, Motivation und Unterstützung danke ich meinen Kollegen Drs. Johannes Vogt, Iris Seitz, Olaf Windmüller und den anderen Mitarbeitern, die ich während der Zeit kennen lernen durfte.

Für exzellente technische Unterstützung danke ich Marco Foddis und Claire Gelhaar. Für die Überlassung der Abb. 1 und Abb. 2 bedanke ich mich bei Hr. Oberarzt Dr. Jan-Henrik Roth und meinem Bruder Assistenzarzt Donald Lobsien aus der Abteilung für Neuroradiologie des Universitäts-Klinikums Leipzig.

Bei Dr. Georg Royl bedanke ich mich für Kritik und Korrektur.

Bei meinen Eltern, meiner Frau Veronika und meinem Bruder Donald bedanke ich mich für die Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

1. Originalpublikationen

Adams F, Boschmann M., **Lobsien E**, Kupsch A, Lipp A, Franke G, Leisse MC, Jank J, Gottschalk S, Spranger J, Jordan J
Influences of Levodopa on Adipose Tissue and skeletal muscle Metabolism in Patients with Idiopathic Parkinson's Disease
Eur J Clin Pharmacol. 2008 Jul 30 [epub ahead of print]

Kamm C, Fischer , Garavaglia B, Kullmann S, Sharma M, Schrader C, Grundmann K, Klein C, Borggräfe I, **Lobsien E**, Kupsch A, Nardocci N, Gasser T.
Susceptibility to DYT1 dystonia in European patients is modified by the D216H polymorphism
Neurology. 2008 Jun 3; 70(23):2261-2.

Doepp F; Plotkin M; Siegel L; Kivi A; Gruber D; **Lobsien E**; Kupsch A; Schreiber SJ
Comparison of transcranial brain parenchyma sonography and FP-CIT SPECT in patients with Parkinson's syndrome and essential tremor
Movement Disorders. 2008 Feb 15; 23(3): 405-10

Storch A, Jost WH, Vieregge P, Spiegel J, Greulich W, Durner J, Müller T, Kupsch A, Henningsen H, Oertel WH, Fuchs G, Kuhn W, Niklowitz P, Koch R, Herting B, Reichmann H, for the **German Coenzyme Q₁₀ Study Group**
Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled Trial on Symptomatic Effects of Coenzyme Q₁₀ in Parkinson Disease
Arch Neurol. 2007 Jul;64(7):938-44

Schuh-Hofer S, **Lobsien E**, Brodowsky R, Vogt J, Dreier JP., Klee R, Dirnagl U, Lindauer U
The cerebrovascular response to elevated potassium - role of nitric oxide in the in vitro model of isolated rat middle cerebral arteries
Neuroscience Letters. 2001 Jun 22; 306(1-2): 61 – 64

2. Abstracts/Poster

E. Lobsien, D. Gruber, T. Trottenberg, A.A. Kühn, G.-H. Schneider, K.-T. Hoffman, A.Kupsch

Idiopathic Tongue Protrusion Dystonia Treated With Pallidal Deep Brain Stimulation - Case Report.

The Movement Disorders Society 12th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders 2008, Chicago, IL, USA.

A. García, T. Trottenberg, **E. Lobsien**, A. Kupsch

Comparison of the Extensor-digitorum-brevis test (EDB) vs mouse diaphragm assay (MDA) as indirect test methods for detection of Botulinumtoxin A (BTXA) antibodies

XVII WFNN World Congress in Parkinson's Disease and related disorders 2007, Amsterdam, Netherlands.

F Adams, M Boschmann, **E Lobsien**, A Lipp, G Franke, MC Leisse, S Gottschalk, J Spranger, A Kupsch, J Jordan

Levodopa Ingestion and Metabolism in Patients with Idiopathic Parkinson's Disease

9th EFAS Meeting & 2nd Joint Meeting with the American Autonomic Society 2007, Wien, Austria.

E. Lobsien, A. Bick-Sander, S. Eibach, K.-T. Hoffmann, T. Trottenberg, A. Kupsch
3 Cases of Idiopathic Bilateral Striatopallidodental Calcinosis

The Movement Disorder Society's 11th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders 2007, Istanbul, Turkey.

H. Krug, S. Eibach, **E. Lobsien**, K.T. Hoffmann, A. Kupsch

Preoperative Intramuscular Injection Of Botulinum Toxin Prior To Hip Surgery In A Patient With Cerebral Palsy

1. Deutscher Botulinumtoxin Kongress, 2007, Hannover, Germany

J. Wissel, M. auf dem Brinke, M. Huber, C. Herrmann, M. Winterholler, M. Hecht, H. Stolze, **E. Lobsien**, J. Müller

Praxis der Spastiktherapie mit Botulinumtoxin A in sieben spezialisierten Zentren: Prospektive Erfassung mittels eines standardisierten Dokumentationsmedium.

1. Deutscher Botulinumtoxin Kongress, 2007, Hannover, Germany

E. Lobsien, D. Gruber, A. Kupsch

Studie zur Therapie des Myofaszialen Schmerzsyndroms im Nacken- und Schultergürtelbereich mit Dysport® (Botulinumtoxin Typ A)

1. Deutscher Botulinumtoxin Kongress, 2007, Hannover Germany

Florian Doepp, Anatol Kivi, Lara Siegel, Doreen Gruber, **Elmar Lobsien**, Michail Plotkin, Andreas Kupsch, Stephan J Schreiber

Comparison of transcranial brain parenchyma sonography and FP-CIT-SPECT in patients with idiopathic Parkinson's disease and essential tremor

Europäische Hemodynamik- und Ultraschall-Tagung 2006

Gruber D, Kivi A, Trottenberg T, **Lobsien E**, Jungehülsing J, Hoffmann KT, Schneider GH and Kupsch A.

The effect of pallidal and thalamic deep brain stimulation on Holmes tremor caused by thalamic stroke

16th International Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders. 2005

Doepp F, Schreiber S, Plotkin M, Kivi A, Gruber D, **Lobsien E** and Kupsch A.

Die Bedeutung der transkraniellen B-Bild Sonographie bei Patienten mit idiopathischem Parkinson Syndrom und essentiellen Tremor im Vergleich zum FP-CIT SPECT.

44. Jahrestagung der DGN 2006.

U. Lindauer, **E. Lobsien**, S. Schuh-Hofer, J.P. Dreier, U. Dirnagl

Cerebrovascular reactivity to pathophysiologically enhanced extraluminal potassium
Berlin Neuroscience Forum, April 2004

Lobsien E, Schuh-Hofer S, Brodowsky R, Vogt J, Dreier J P., Dirnagl U, Lindauer U
Nitric Oxide prevents vasoconstriction of isolated rat middle cerebral artery to high extraluminal potassium concentrations

Annual Meeting of the Society for Neuroscience Nov. 2001 San Diego, USA,

3. Abstracts/Vorträge

Lobsien E, Schuh-Hofer S, Dirnagl U, Lindauer U

Vasodilator application prevents vasoconstriction of the isolated middle cerebral artery to high extraluminal potassium concentrations following nitric oxide synthase inhibition

12th European Students Conference, Nov. 2001, Charité, Berlin

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Elmar Lobsien, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Das Zusammenspiel von Stickstoffmonoxid und Kaliumkanälen in der zerebrovaskulären Reaktion auf gesteigerte Kaliumkonzentrationen – eine in vitro Studie.“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin den

.....

Elmar Lobsien