

Aus dem Institut für Physiologie

der Universität zu Lübeck

Direktorin: Univ. Prof. Dr. rer. nat. Kristina Kusche-Vihrog

Adenosin und endotheliale Autakoide in der aktiven Hyperämie

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion der Medizin -



vorgelegt durch

Simon Schemke aus Tönisvorst

Lübeck 2022

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Cor de Wit
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Frank Bode
- Tag der mündlichen Prüfung: 31.08.2022

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 31.08.2022
Promotionskommission der Sektion Medizin

Ich widme diese Arbeit dem Wertvollsten, das ich habe.
Meiner Familie.

David, Laura, Lina, Michael, Regina

Danke!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 5 -
1.1 Globale Kreislaufregulation	- 6 -
1.2 Lokale Steuerung der Gewebepерfusion	- 7 -
1.3 Arten der physiologischen Hyperämie	- 7 -
1.4 Elemente der muskulären Mikrozirkulation	- 8 -
1.4.1 Der Skelettmuskel	- 9 -
1.4.2 Der glatte Gefäßmuskel	- 9 -
1.4.3 Das Gefäßendothel	- 10 -
1.5 Mediatoren	- 11 -
1.5.1 Adenosin in der aktiven Hyperämie des Skelettmuskels	- 11 -
1.5.2 ADP und ATP in der aktiven Hyperämie des Skelettmuskels	- 14 -
1.5.3 NO in der aktiven Hyperämie des Skelettmuskels	- 15 -
1.5.4 Die Cyclooxygenase in der aktiven Hyperämie des Skelettmuskels	- 16 -
1.5.5 EDHF und mechanische Aktivität	- 16 -
1.6 Zielsetzung der Arbeit	- 18 -
2. Material und Methoden	- 19 -
2.1 Materialien	- 19 -
2.2 Versuchsaufbau	- 19 -
2.3 Versuchstiere	- 20 -
2.4 Vorbereitung des Experimentes	- 20 -
2.5 Präparation des Musculus cremaster	- 21 -
2.6 Versuchsprotokoll	- 24 -
2.7 Auswertung und Statistik	- 25 -
3. Ergebnisse	- 27 -
3.1 Blockade der Skelettmuskelkontraktion	- 27 -
3.2 Untersuchung von Vasodilatoren	- 29 -

3.2.1 Acetylcholin	- 29 -
3.2.2 Adenosin	- 29 -
3.2.3 Adenosindiphosphat.....	- 30 -
3.3 Aktive Hyperämie.....	- 31 -
3.4 Effekte einer Enzym- und/oder Rezeptorblockade	- 34 -
3.4.1 Blockade der NOS und COX	- 34 -
3.4.2 Blockade der Adenosinrezeptoren.....	- 37 -
3.4.2.1 Unselektive Adenosinrezeptorblockade	- 37 -
3.4.2.2 Unselektive Adenosinrezeptorblockade und Blockade der COX und NOS	- 38 -
3.4.2.3 Kombinierte Blockade von Adenosin- und ADP-Rezeptoren, COX und NOS	- 41 -
3.4.2.4 Selektive Adenosin-A ₂ -Rezeptorblockade	- 47 -
3.4.2.5 Selektive Adenosin-A ₂ -Rezeptorblockade und Blockade der COX und NOS.....	- 48 -
3.4.3 Blockade des K _{ATP} -Kanals.....	- 50 -
3.4.3.1 Kombinierte Blockade des K _{ATP} -Kanals, der COX und der NOS	- 54 -
3.4.3.2 Kombinierte Blockade des K _{ATP} -Kanals und der NOS	- 59 -
3.4.3.3 Kombinierte Blockade des K _{ATP} -Kanals und der COX	- 61 -
4. Diskussion	- 65 -
4.1 Grundlegende Experimente	- 66 -
4.2 Blockade der Cyclooxygenase und NO-Synthase.....	- 67 -
4.3 Adenosinrezeptorblockade mit und ohne Blockade der COX und NOS.....	- 70 -
4.4 Blockade von ADP/ATP, Adenosin, COX und NOS	- 73 -
4.5 Blockade des K_{ATP}-Kanals sowie Blockade der COX und NOS.....	- 75 -
4.6 Weitere regulatorische Elemente der aktiven Hyperämie.....	- 77 -
5. Zusammenfassung	- 79 -
6. Literaturverzeichnis	- 80 -
7. Anhang	- 87 -
8. Präsentationen und Auszeichnungen	- 89 -
9. Publikationen	- 90 -
10. Danksagung	- 91 -

1. Einleitung

Blutfluss ist die Grundlage der Verteilung von Stoffen im Körper und die Voraussetzung für die Funktion der meisten Gewebe. Eine Versorgung mit Sauerstoff und eine Entsorgung von Stoffwechselprodukten ist für den Metabolismus der Zellen im Gewebe zwingend nötig, denn eine Mangelperfusion führt im betroffenen Gewebe meist relativ kurzfristig zu Konsequenzen. Diese reichen vom Versuch, die Perfusion zu steigern über eine reduzierte Gewebefunktion bis hin zum Gewebeuntergang. Bei einer relevanten Reduktion der Ruhedurchblutung oder einem bei gesteigertem Bedarf mangelnden Anstieg des Blutflusses kommt es zu einer Abnahme der Gewebefunktion. Dieser Zustand findet sich in chronifizierter Form zum Beispiel bei der koronaren Herzkrankheit oder der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit. Sistiert die Perfusion komplett, stirbt das versorgte Gewebe ab. Klassische Beispiele hierfür sind der Herzinfarkt oder der Schlaganfall. Eine gestörte Durchblutung zentraler Organe wie Herz und Gehirn verursacht unmittelbare Konsequenzen. Die eingeschränkte Perfusion des Skelettmuskels ist, im Vergleich zur Ischämie zentraler Organe, zunächst weniger bedrohlich für den Gesamtorganismus, spielt aber eine Rolle in der Pathogenese und Therapie von Volkskrankheiten wie Diabetes und Bluthochdruck (Frisbee und Delp, 2006; Xiang et al., 2006; Lalande, 2008; Sarelius und Pohl, 2010) und bedarf daher einer detaillierten Betrachtung. Weiterhin ist die physiologische Durchblutungsregulation notwendig, um eine maximale Skelettmuskelleistung zu ermöglichen.

Eine Perfusion oberhalb des vom Gewebe benötigten Bedarfs ist unökonomisch und die maximal mögliche Perfusion (nur limitiert durch den strukturellen Gefäßaufbau) aller Regionen des Körpers zugleich sogar unmöglich, da dies ein vom Herzen nicht zu bewältigendes Herz-Zeit-Volumen erfordern würde. Weiterhin würde das Gewebe bei übermäßiger Durchblutung einem hohen Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt, der seinerseits schädliche Auswirkungen hätte. Daher ist die Anpassung der Durchblutung an die Erfordernisse des versorgten Gewebes („Matching von Bedarf und Anlieferung“) von so hoher Bedeutung.

Aufgrund der thematischen Ausrichtung der Arbeit wird insbesondere auf die Mechanismen der Vasodilatation und der Mehrdurchblutung (Hyperämie)

eingegangen. Die nicht minder wichtigen Abläufe der Vasokonstriktion werden weniger intensiv betrachtet.

1.1 Globale Kreislaufregulation

Das Ziel der globalen Kreislaufregulation ist die Erzeugung und Aufrechterhaltung eines Perfusionsdruckes, der lokale Änderungen der Durchblutung durch regionale Änderung des Gefäßwiderstandes möglich macht. Die zentralen Gesetzmäßigkeiten dieser Regulation beschreibt in Analogie zur Elektrizität das Ohmsche Gesetz:

$$\mathbf{U = R * I \text{ bzw. } I = \frac{U}{R}}$$

Hier zeigt sich, dass sich aus dem bereitgestellten Herzminutenvolumen (I), das für die Ver- und Entsorgung der Körpergewebe eine ausreichende Stromstärke zur Verfügung stellt, und dem Strömungswiderstand der Gefäße (R) eine gewisse „Spannung“ in Form einer Blutdruckdifferenz (U) zwischen arteriellem und venösem Schenkel ergibt.

Die erste Möglichkeit, den Blutfluss (I) durch die Organe zu steigern, wäre also eine Erhöhung des Blutdrucks bei konstantem peripherem Widerstand. Dies würde sich auf alle Regionen des Körpers gleichermaßen auswirken und somit keine separate Änderung der Durchblutung verschiedener Organe ermöglichen. Der zweite Mechanismus zur Steigerung der Stromstärke durch ein Organ wäre die Reduktion des zu überwindenden Widerstandes. Dies wirkt sich lediglich lokal aus und die Durchblutung kann individuell bzw. lokal an den Sauerstoffbedarf der Umgebung angepasst werden. Auf diese Weise wird die Gewebsdurchblutung reguliert. Ein etwaiger Blutdruckabfall bei Abnahme des Gesamtwiderstandes wird durch eine Erhöhung des Herzminutenvolumens verhindert.

1.2 Lokale Steuerung der Gewebepfusion

Auf lokaler Ebene wird also der Gefäßwiderstand im Organ verändert. Der Widerstand eines laminar durchströmten Rohres kann mittels des Hagen-Poiseuille-Gesetzes beschrieben werden.

$$R = \frac{8 * l * \eta}{\pi * r^4}$$

Hierbei bezeichnet „R“ den Widerstand, der bei Durchströmung des Rohres überwunden werden muss, „l“ die Länge des durchströmten Rohres, „ η “ die Viskosität des strömenden Mediums und „r“ den Radius des betrachteten Rohres. Der entscheidende Parameter, über den die Blutflussmenge variiert werden kann, ist demnach der Diameter bzw. Radius der Gefäße des jeweiligen Organstromgebietes. Im Stromgebiet eines Organs sind es die Arteriolen, die aufgrund ihres geringen Durchmessers den Ort des größten Widerstandes im Gefäßsystem darstellen. Obwohl Arteriolen keine perfekten, unverzweigten Rohre sind und Blut keine newtonsche Flüssigkeit ist, ist das Hagen-Poiseuille-Gesetz geeignet, die Gesetzmäßigkeiten in der Mikrozirkulation zu beschreiben. Es zeigt, dass bereits eine kleine Änderung des arteriolären Durchmessers eine große Änderung des Gefäßwiderstandes bewirkt, da der Gefäßradius in der vierten Potenz in die Formel eingeht. Aufgrund der Abhängigkeit von Gefäßwiderstand und Stromstärke ist die lokale Vasodilatation bzw. Vasokonstriktion also eine sehr effektive Möglichkeit, die Perfusion eines Organs zu ändern. Das Ziel dieser regionalen Perfusionssteuerung ist es, einen konstanten O₂-Partialdruck im Gewebe zu gewährleisten und somit die Durchblutung dem Bedarf anzupassen. Andererseits wird durch Erhöhung des Widerstandes bei Blutdruckanstieg das Kapillarbett vor schädigendem Druck geschützt.

1.3 Arten der physiologischen Hyperämie

Eine Steigerung von Durchblutung (Hyperämie) erfolgt in enger Beziehung zum Bedarf des Gewebes (Mackie und Terjung, 1983; Bockman, 1983; Boushel et al, 2000). Es werden verschiedene Formen der Hyperämie nach dem auslösenden

Stimulus unterschieden. Reaktive Hyperämie ist eine Perfusionssteigerung nach einer Mangeldurchblutung. Sie entsteht beispielsweise nach einem kurzzeitigen Gefäßverschluss oder Abdrücken des Gefäßes im distal liegenden Stromgebiet einer Arterie und wird experimentell oft verwendet, um Mechanismen der Durchblutungssteigerung zu untersuchen.

Die physiologische Form der Hyperämie ist die aktive Hyperämie, die auch in dieser Arbeit untersucht wurde. Sie entsteht nicht erst auf einen ischämischen Zustand folgend, sondern bereits während der auslösenden Situation. Das prägnanteste Beispiel ist die muskuläre Aktivität, während der es zu einer Dilatation der versorgenden Gefäße entsprechend dem jeweiligen muskulären Sauerstoffbedarf kommt, ohne dass dieser Vasodilatation eine Mangeldurchblutung vorausgegangen ist. Somit wird der Sauerstoffpartialdruck im versorgten Gewebe trotz erhöhten Verbrauchs konstant gehalten. Die Gefäßweitstellung ist hierbei nicht sofort in vollem Maß vorhanden, sondern nimmt mit fortschreitender Arbeit zu und erreicht nach ungefähr 30-sekündiger muskulärer Aktivität ein konstantes Niveau (Clifford und Hellsten, 2004), sodass das bis zu 10- bis 50-Fache der Ruhedurchblutung erreicht werden kann (Segal und Kurjiaka, 1995).

1.4 Elemente der muskulären Mikrozirkulation

Im Folgenden möchte ich einen kurzen Überblick über den Stand der Forschung zu den in die aktive Hyperämie involvierten Zellen und beteiligten Mediatoren (insbesondere ATP, ADP, Adenosin, Stickstoffmonoxid und die Produkte der Cyclooxygenase) und deren Bedeutung im Rahmen der aktiven Hyperämie geben. Hierbei ist wesentlich, dass kein singulärer Mediator allein entscheidend für die Auslösung und Aufrechterhaltung der aktiven Hyperämie ist, sondern dieser Mechanismus am ehesten von der Interaktion verschiedener Stoffe abhängt (Joyner und Casey, 2015). Die Mechanismen sind darüber hinaus unter Umständen nicht über die gesamte Dauer konstant, sondern variieren möglicherweise mit der bei andauernder muskulärer Arbeit anhaltenden aktiven Hyperämie über die Zeit.

1.4.1 Der Skelettmuskel

Grundlage der skelettmuskulären Fähigkeit zur Kontraktion bildet seine Struktur aus bindegewebigen Anteilen und den eigentlichen Skelettmuskelfasern. Darüber hinaus enthält der Skelettmuskel viele weitere Elemente, wie Nerven und Blutgefäße, die seine Funktion ermöglichen.

Durch das Aktionspotential eines motorischen Nerven kommt es in dessen neuromuskulären Endplatten zur Depolarisation der Membran des Endknöpfchens und zur Freisetzung von Acetylcholin in den synaptischen Spalt. Dieses bewirkt über nikotinische Acetylcholinrezeptoren auf der postsynaptischen Muskelmembran eine Depolarisation der Muskelzelle, die ihrerseits ein Aktionspotential im Skelettmuskel auslöst, das sich in das Tubulussystem ausbreitet und letztlich einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration induziert. Der Anstieg der Calciumkonzentration bewirkt die wiederholte Interaktion der kontraktilen Proteine Aktin und Myosin und somit die Verkürzung bzw. Kraftentwicklung. Für diese Interaktion ist der Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) nötig. Dieses stellt durch Hydrolyse zu Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat die notwendige Energie bereit und kann über verschiedene Mechanismen zu ATP resynthetisiert werden oder wird durch Abspaltung von einem weiteren Phosphatrest zu Adenosinmonophosphat (AMP) und mittels 5'Nukleotidase zu Adenosin metabolisiert. Sowohl ATP als auch seine Abbauprodukte, inklusive des Adenosins, könnten relevante Mediatoren im Rahmen der aktiven Hyperämie darstellen. Adenosin unterliegt einem weiteren permanenten Stoffwechsel und wird durch die Adenosindeaminase zu Inosin abgebaut (Schulte, 2004). Weiterhin lässt sich im Skelettmuskel die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) nachweisen, welches eine Rolle bei aktiver Hyperämie spielen könnte (Nyberg et al., 2010).

1.4.2 Der glatte Gefäßmuskel

Der glatte Gefäßmuskel bildet die mittlere von drei Gefäßwandschichten und wird nach innen vom Endothel und nach außen von der bindegewebsartigen Adventitia umgeben. Sein Aktivitätszustand determiniert den Durchmesser des Gefäßes und ist komplex reguliert. Er unterliegt regionalen und überregionalen Steuermechanismen. Die Gefäße der verschiedenen Gewebe sind dabei nicht

einheitlich reguliert. In manchen Organen, wie zum Beispiel im Gehirn, gibt es eine intensive lokale Autoregulation des Blutflusses, in anderen ist diese weniger ausgeprägt. Der Tonus der glatten Gefäßmuskulatur wird grundsätzlich durch zelleigene und zellfremde Faktoren gesteuert. Im glatten Muskel selbst beeinflusst insbesondere die reflektorische Steigerung des Kontraktionszustandes nach passiver Dehnung („Bayliss-Effekt“) den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur. Zellfremde Faktoren mit Einfluss auf den Kontraktionszustand glatter Gefäßmuskulatur sind beispielsweise eine zu- oder abnehmende nervale Aktivität oder endo-, para- sowie autokrine Mediatoren.

Die Kontraktion des glatten Muskels verläuft ähnlich, wie die des Skelettmuskels. Durch ATP-abhängige Interaktion der Filamente Aktin und Myosin kommt es zu einer Kontraktionsbewegung und Kraftentwicklung. Der Kontraktionszustand wird durch den Phosphorylierungszustand der leichten Kette des Myosins (MLC) reguliert, denn nur im phosphorylierten Zustand der MLC ist eine Interaktion mit Aktin möglich. Der Phosphorylierungszustand der MLC wird bestimmt durch die Aktivität der Proteine Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) sowie der dephosphorylierenden Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP).

Die MLCK wird nach Bindung eines Calcium-Calmodulinkomplexes aktiviert, somit ist die Kontraktion einerseits calciumabhängig. Ein intrazellulärer Calciumanstieg wird ausgelöst durch eine Depolarisation der Muskelzelle mit Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle oder durch Wirkung von Liganden und folgende Öffnung von ligandenabhängigen Calciumkanälen bzw. folgende Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, meist über die Inositoltrisphosphat(IP₃)-Kaskade. Neben der calciumabhängigen Phosphorylierung der MLC kann eine Kontraktion im glatten Muskel andererseits auch calciumunabhängig durch die Hemmung über die MLCP erfolgen. Ein Beispiel hierfür ist die Stimulation der MLCP durch Stickstoffmonoxid (NO) (Bolz et al., 2003).

1.4.3 Das Gefäßendothel

Das Endothel ist eine einlagige Schicht flacher Zellen, die die innerste Wand des Gefäßes bilden. Es ist ein zentrales Element der Gefäßphysiologie und der Steuerung des Kontraktionszustands des Gefäßes. In vielen Untersuchungen wird

die Anpassung des Gefäßdurchmessers an den Blutfluss durch die ausgeübte Schubspannung als Funktion des Endothels genannt (Pohl et al., 1986). Die zugrundeliegenden Mechanismen im Rahmen der Tonusregulation sind weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung.

Das Endothel ist auf mechanische oder chemische Reize hin befähigt, vasoaktive Stoffe zu produzieren. Insbesondere die auf das Endothel wirkende Schubspannung als mechanischer Stimulus (Wit et al., 1997), aber auch verschiedene chemische Substanzen, wie zum Beispiel Acetylcholin, induzieren die Synthese potenter Vasodilatoren im Endothel. Im Vordergrund stehen hier das durch die calciumabhängige endotheliale NO-Synthase gebildete Stickstoffmonoxid und Produkte der Cyclooxygenase, wie Prostaglandine und Prostacyclin. Eine direkte elektronische Kopplung von Endothel und glattem Gefäßmuskel und die direkte Übertragung des Membranpotentials ist sehr umstritten (Welsh und Segal, 1998), denn Studien sowohl an isolierten Gefäßen (Emerson, 2000; Sandow et al., 2002) als auch Gefäßen in vivo (Coleman et al., 2001; Siegl, 2005; Wit und Griffith, 2010) lieferten unterschiedliche Ergebnisse.

1.5 Mediatoren

Die physiologischen Mediatoren, die eine lokale Vasodilatation vermitteln, sind vielfältig und bereits in vielen Arbeiten untersucht worden. Trotz und wegen dieser intensiven Forschungsarbeiten gibt es weiterhin divergierende Ansichten bezüglich der beteiligten Zellen, ihrer Sekretionsprodukte und Ansatzpunkte am Gefäß sowie ihrer Bedeutung für die lokale Vasodilatation und ihrer Interaktionen. Im Vordergrund der bisherigen wissenschaftlichen Studien standen hierbei häufig die Mediatoren NO, Prostaglandine und der "endothelium-derived hyperpolarizing factor" (EDHF). Die Betrachtung von NO und Prostaglandinen wird in dieser Arbeit um die Untersuchung der Rolle von Adenosin bei der aktiven Hyperämie ergänzt werden.

1.5.1 Adenosin in der aktiven Hyperämie des Skelettmuskels

Adenosin ist ein schon frühzeitig intensiv untersuchter Mediator und im Zellstoffwechsel vielfach bedeutsam. Es wurde 1963 als für Dilatationen im

Koronarstrombett wichtiger Metabolit angesehen. Erst deutlich später zeigte sich, dass Adenosin bei diesen Dilatationen nicht unabdingbar vorhanden sein muss. Die Konzentration von Adenosin liegt in vivo außerhalb der Zelle zwischen 30 und 300 nM, kann aber nach verschiedenen Stimuli bis auf 10 μ M ansteigen (Schulte, 2004), wobei besonders muskuläre Kontraktionen zu einem Anstieg der extrazellulären Adenosinkonzentration führen (Lo et al., 2001). Der steigende Adenosinspiegel wurde im Rahmen aktiver Hyperämie in der Ratte insbesondere bei längerer Kontraktionsdauer beobachtet (Lo et al., 2001).

Noch relativ unklar ist die Herkunft des Adenosins und was die erhöhten Spiegel des Adenosins bei aktiver Hyperämie im Extrazellulärraum und im Blut verursacht. Dieser Aspekt wurde wiederholt untersucht und als Quelle der Skelettmuskel, das Endothel, Erythrozyten oder sogar nervales Gewebe in Betracht gezogen (Clifford und Hellsten, 2004; Marshall, 2007; Burnstock, 2009). Im Vordergrund der Betrachtung stand hierbei zunächst der Erythrozyt (Ellsworth et al., 1995; Dietrich et al., 2000; Jagger et al., 2001; González, 2002; Rosenmeier et al., 2004), der auf lokale Minderung des Sauerstoffpartialdrucks ATP freisetzt (Ellsworth et al., 1995), denn bei Perfusion mit erythrozytenfreien Lösungen sistieren hypoxisch bedingte Vasodilatationen (Dietrich et al., 2000). Auch der Skelettmuskel ist eine denkbare Quelle (Marshall, 2007; Ray und Marshall, 2009). Im Rahmen des Energiestoffwechsels wird ATP zu ADP gespalten, was weiter zu AMP und folgend zu Adenosin metabolisiert wird. Diese Produkte könnten eine Rolle im Rahmen der aktiven Hyperämie spielen. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Konzentration des AMP-abbauenden Enzyms 5'Nucleotidase und seine Affinität gegenüber AMP im Rahmen muskulärer Aktivität steigt. Insbesondere eine lokale Azidose kann eine gesteigerte Bildung von Adenosin über eine Steigerung der AMP-Affinität der 5'Nucleotidase bewirken, denn bei einer pH-Verschiebung um 0,5 in Richtung einer Azidose wurde eine 10-20%ige Affinitätssteigerung der 5'Nucleotidase nachgewiesen (Cheng, 2000; Marshall, 2007). Ähnliche Mechanismen einer pH-abhängigen Adenosinfreisetzung wurden auch bei der reaktiven Hyperämie nachgewiesen (Mo und Ballard, 1997). Die 5'Nucleotidase ist über den Skelettmuskel hinaus auch in anderen Gewebetypen, vor allem im Herzmuskel, für den Adenosinmetabolismus relevant (Eckle et al., 2007).

Insbesondere der glatte Gefäßmuskel und das Endothel werden als Effektor der durch Adenosin ausgelösten Vasodilatationen diskutiert, wobei seine Rezeptoren meist im Endothel lokalisiert wurden (Ray und Marshall, 2002; Duza und Sarelius, 2003).

Adenosin entfaltet seine Wirkung an Adenosinrezeptoren (auch P1-Rezeptoren genannt). Eine Blockade von Adenosinrezeptoren mittels Theophyllin reduziert das Ausmaß aktiver Hyperämie im Menschen (Rådegran und Calbet, 2001). Die Adenosinrezeptoren gehören zusammen mit den durch ATP und ADP aktivierten P2-Rezeptoren zur Familie der purinergeren Rezeptoren. Bisher konnten vier Subtypen des Adenosinrezeptors identifiziert werden (A_1 , A_{2A} , A_{2B} und A_3). Alle Subtypen sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, wobei die Typen A_1 und A_3 an G_i und A_{2A} und A_{2B} an G_s gekoppelt sind. Selten konnten allerdings auch andere Kombinationen nachgewiesen werden, wie zum Beispiel die Kopplung von G_q mit A_{2B} und A_3 oder $G_{15/16}$ mit A_{2A} (Schulte, 2004).

Aus der Adenosinrezeptorfamilie sind A_1 - und A_{2A} -Rezeptoren diejenigen mit der höchsten Affinität gegenüber Adenosin (Layland et al., 2014) und der größten Bedeutung bei der aktiven und reaktiven Hyperämie. Bei aktiver Hyperämie wird häufig insbesondere der A_{2A} -Rezeptor als relevant beschrieben, während bei reaktiver Hyperämie eher der A_1 -Rezeptor im Vordergrund steht (Edmunds und Marshall, 2001a; Ray 2009). Die Relevanz der jeweiligen Rezeptoren in vivo ist dabei allerdings noch umstritten. In einigen Studien wird ein vergleichbarer vasodilatierender Effekt nach Aktivierung von A_1 - und A_{2A} -Rezeptoren postuliert (Bryan und Marshall, 1999a). In anderen Untersuchungen wiesen nur A_2 -Rezeptoren eine vasodilatierende Wirkung auf, während die Aktivierung des A_1 -Rezeptors eher eine Vasokonstriktion auslöste (im Herzen (Sato et al., 2005) bzw. in der Niere (Hansen und Schnermann, 2003)).

Die Wirkung von Adenosin ist intensiv reguliert und interagiert auf verschiedenen Ebenen mit anderen Systemen. Die Rezeptoren selbst können durch Heteromerbildung (z.B. mit Dopaminrezeptoren (Borrito-Escuela et al., 2010)), durch Enzyme des Adenosinmetabolismus (Adenosindeaminase (Ciruela et al., 1996; Ciruela et al., 2010)) und nicht zuletzt Adenosin selbst beeinflusst werden (Mundell und Kelly, 2011), was in vivo beispielsweise in T-Zellen eine

physiologische Bedeutung zu haben scheint (Flach et al., 2009; Yang et al., 2010). In Gefäßen führt Adenosin zur Stimulation der NO-Synthase (NOS) und der Cyclooxygenase (COX) im Endothel. Außerdem kann es im glatten Muskel den K_{ATP} -Kanal öffnen und so endothelunabhängig eine Dilatation auslösen. Nach Blockade des K_{ATP} -Kanals durch Glibenclamid waren durch Adenosin ausgelöste Vasodilatationen effektiv unterbunden (Wit, 2010). Denkbar ist eine Stimulation des G_s -Proteins durch Adenosin mit Erhöhung von cAMP und nachfolgender K_{ATP} -Kanal-Aktivierung, die durch Glibenclamid inhibiert werden kann. Eine alternative Hypothese beteiligt H_2O_2 , das in mehreren Studien nach Adenosinstimulation gebildet wurde und K_{ATP} -Kanäle öffnet (Sharifi-Sanjani et al., 2013; Zhou et al., 2013). Im Herzen wurde tatsächlich bereits gezeigt, dass dieser Mechanismus den koronaren Blutfluss an den Sauerstoffverbrauch des Herzens anpasst (Saitoh et al., 2006) und H_2O_2 als „endothelium-derived hyperpolarizing factor“ bezeichnet werden kann (Miura, 2003; Yada et al., 2003). Der K_{ATP} -Kanal ist also bedeutend für die Regulation des koronaren Blutflusses und die aktive Hyperämie im Koronargebiet. Viele weitere Studien bestätigen, dass der K_{ATP} -Kanal (möglicherweise aktiviert durch Adenosin) eine bedeutende Rolle im Rahmen der Regulation der Gefäßweite (Banitt et al., 1996; Bijlstra, 1996; Bank et al., 2000; Hammer et al., 2001), insbesondere auch im Rahmen aktiver Hyperämie (Colburn et al., 2020) und der Fortleitung aktiver Hyperämie stromaufwärts (Murrant und Sarelis, 2002), hat.

1.5.2 ADP und ATP in der aktiven Hyperämie des Skelettmuskels

Es wird häufig postuliert, dass Adenosin insbesondere aus ATP über ADP und AMP gebildet wird. Daher sollte eine Beteiligung aller drei Stoffe bei der Vasodilatation im Rahmen der aktiven Hyperämie in Betracht gezogen werden. Insbesondere ATP ist Bestandteil vieler physiologischer Abläufe, wie der Steuerung des Vasotonus, des Zellzyklus oder der Zellmigration (Burnstock, 2009; Schuchardt et al., 2012). ADP und ATP aktivieren sowohl P_1 - als auch P_2 -Rezeptoren. Die P_1 -Klasse beinhaltet die bereits genannten Adenosinrezeptoren (A_1 - A_3). Bei den P_2 -Rezeptoren lassen sich grundsätzlich zwei verschiedene Gruppen unterscheiden: Einerseits ionotrope Rezeptoren (P_2X), andererseits die metabotropen (G-Proteingekoppelten) Rezeptoren (P_2Y). In beiden Gruppen findet sich eine Vielzahl von Subtypen. Während die unter anderem im Endothel lokalisierten (Guns et al., 2005;

Mortensen et al., 2009a) P₂Y-Rezeptoren Vasodilatationen auslösen, hat die Aktivierung des P₂X-Rezeptors dagegen eine Vasokonstriktion zur Folge (van der Giet et al., 2002).

Die Tatsache, dass bestimmte genetische Variationen des P₂Y-Rezeptors mit einer arteriellen Hypertonie assoziiert sind, könnte ein Hinweis auf die Bedeutung von ADP und ATP im Rahmen der Kreislaufregulation sein (Fox et al., 2011). Ein kontrovers diskutierter Aspekt ist die Herkunft des im Extrazellulärraum erscheinenden ADP bzw. ATP. Häufig wird die Bildung aus dem Energiestoffwechsel der Skelettmuskelzellen oder aus dem Endothel (Bodin, 1991; Bodin, 1992; Bodin 1995; Burnstock, 1999) erwähnt, wie bereits beim Adenosin beschrieben. Eine andere Möglichkeit ist die Freisetzung von ATP aus Erythrozyten. Der Spiegel von ATP im menschlichen Blut steigt bei aktiver Hyperämie an, dies ist ausgeprägter unter Hypoxie als unter Hyperoxie (González, 2002). In vielen Studien wurde bereits der Erythrozyt selbst als sauerstoffsensible ATP-Quelle identifiziert. Mit abnehmender Oxygenierung, sinkendem pH (Ellsworth et al., 1995; Collins et al., 1998) und mechanischer Deformation werden größere Mengen ATP aus den Erythrozyten freigesetzt (Sprague et al., 1996). Die Verbindung zwischen niedriger Oxygenierung und ATP-Freisetzung könnte hierbei eine Stimulation der Glykolyse sein (Jagger et al., 2001).

1.5.3 NO in der aktiven Hyperämie des Skelettmuskels

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein bedeutender Vasodilatator in der Mikrozirkulation, der im Endothel synthetisiert wird, zum glatten Muskel diffundiert und eine Bedeutung für die adäquate Sauerstoffversorgung des arbeitenden Muskels hat (Craig et al., 2019a).

Als wichtiger die NO-Bildung stimulierender Mechanismus gilt die Schubspannung im Gefäß (Wit et al., 1997; Fleming und Busse, 2003). Darüber hinaus können viele chemische Faktoren die Freisetzung von NO stimulieren, wie z.B. Adenosin (Bryan und Marshall, 1999b; Edmunds und Marshall, 2001a; Ray et al., 2002; Nyberg et al., 2010), ATP, Acetylcholin, Insulin, Bradykinin, Histamin, Thrombin, VEGF und Östrogene (Ray und Marshall, 2002; Domeier und Segal, 2007; Dudzinski und Michel, 2007; da Silva et al., 2009; Raqeeb et al., 2011). Diese Faktoren führen über die Bildung von NO zu einer endothelabhängigen Dilatation und beeinflussen die

Gefäßmechanik vielfältig, beispielweise über die spezifische Interaktion von NO mit Connexin 37 und Connexin 40 (Kameritsch et al., 2003). Vor allem über A_{2A}-Rezeptoren vermittelt Adenosin eine vermehrte Produktion von NO. Auch A₁-Rezeptoren sind involviert, ob stimulierend (Danialou et al., 1997; Bryan und Marshall, 1999b) oder inhibierend (Li et al., 1998) ist umstritten. Die durch Adenosin induzierte NO-Bildung ist dabei auf ATP und Ca²⁺-abhängige Kaliumkanäle angewiesen (Ray und Marshall, 2002).

1.5.4 Die Cyclooxygenase in der aktiven Hyperämie des Skelettmuskels

Die Rolle des Enzyms Cyclooxygenase und die von ihr gebildeten Prostaglandine als Vasodilatoren bei der aktiven Hyperämie wurde bereits häufig untersucht (Boushel et al., 2002; Schrage et al., 2004; Mortensen et al., 2007). So zeigte sich eine abgeschwächte aktive Hyperämie nach Blockade der COX, allerdings nicht in den Gefäßen der Mikrozirkulation selbst, sondern nur in stromaufwärts von der Mikrozirkulation liegenden Gefäßen mit räumlicher Nähe zu Venen (Hammer et al., 2001).

Ähnlich wie bei dem NO konnte auch für die Produkte der COX eine Bedeutung in der Signaltransduktion nach Stimulation von Adenosinrezeptoren gezeigt werden (Ray et al., 2002). Dies gilt allerdings eher für den Rezeptortyp A₁ als für den Rezeptortyp A_{2A} (Ray et al., 2002). In jedem Fall gibt es Interaktionen zwischen NO und den Produkten der COX, die synergistisch vasodilatierend wirken (Wit et al., 1994; Butt et al., 2000), denn deren sekundäre Transmitter cGMP bzw. cAMP interagieren im glatten Muskel, indem cAMP den Abbau des cGMP durch die Phosphodiesterase hemmt.

1.5.5 EDHF und mechanische Aktivität

Unabhängig von der Größe des betrachteten Muskels (Garten et al., 2014) und vom untersuchten Mediator scheint das lokale Mikromilieu für eine ungestörte aktive Hyperämie wichtig zu sein.

Neben NO und Prostaglandinen existiert ein weiterer endothelialer Mechanismus der Dilatation, der über eine Hyperpolarisation zur Relaxation des glatten Muskels führt und unter der Annahme eines beteiligten endothelialen Faktors „Endothelium-

derived hyperpolarizing factor“ (EDHF) genannt wird (Hellsten et al., 2012). Mechanistisch wurden verschiedene Modelle diskutiert. Neben einem freigesetzten Faktor wurde auch eine direkte myoendotheliale Kopplung mittels Gap junctions postuliert, über die eine endotheliale Hyperpolarisation direkt elektrotonisch in den glatten Muskel gelangt und die folgende Relaxation auslösen kann. Die Bedeutung dieses Mechanismus als endothelialer hyperpolarisierender Mechanismus, insbesondere im Rahmen aktiver Hyperämie, ist allerdings umstritten (Sandow et al., 2002; Wit und Griffith, 2010). Als endotheliale Faktoren wurden verschiedenste chemische Stoffe identifiziert und vorgeschlagen. So wurde selbst Kalium als übertragender Faktor und damit als EDHF untersucht. Die extrazelluläre Kaliumkonzentration steigt bei muskulärer Aktivität an (Hallén, 1996) und steigendes extrazelluläres Kalium bewirkt zumindest transiente Vasodilatationen (Knot et al., 1996; Zaritsky et al., 2000; Burns et al., 2004). Kalium scheint aber trotz dieser Zusammenhänge keine entscheidende Bedeutung als EDHF zu haben (Coleman et al., 2001). Im Gegensatz zu Kalium und der direkten myoendothelialen Kopplung wurde für H_2O_2 und Syntheseprodukte der Cytochrom-P450-abhängigen Enzyme eine Bedeutung im Rahmen des EDHF gezeigt. Insbesondere im Gefäßbett des Herzens ist H_2O_2 als EDHF akzeptiert und an Vasodilatationen bei Hyperämie beteiligt (Miura, 2003; Yada et al., 2003). Auch das Cytochrom-P450-System kann Produkte wie Eicosatriensäure bilden, die als EDHF fungieren und für die aktive Hyperämie bedeutsam sind (Fisslthaler et al., 1999; Bolz et al., 2000). Schlussendlich können auch gänzlich andere bereits beschriebene Mechanismen, wie die mechanische Kompression muskulärer Blutgefäße und zum Beispiel eine dadurch ausgelöste Freisetzung von NO (Sun et al., 2004), an aktiver Hyperämie beteiligt sein. Das Ausmaß der auf eine mechanische Gefäßdeformation durch Muskelkontraktionen folgenden Vasodilatation scheint dabei abhängig von der Frequenz der Kontraktionen zu sein (Tschakovsky und Sheriff, 2004). Dieser Mechanismus wäre besonders interessant, da er schon zu einem frühen Zeitpunkt und noch vor der Änderung des intrazellulären Milieus zum Tragen käme (Kirby et al., 2007).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der Bedeutung der aktiven Hyperämie für fast alle Organe des Körpers ist das Verständnis ihres physiologischen Ablaufes eine unverzichtbare Grundlage, um pathologische Zustände zu erkennen und möglicherweise therapeutisch beeinflussen zu können.

Im Zentrum dieser Arbeit steht die Untersuchung

1. der Rolle von Adenosin, NO und Produkten der COX
2. der beteiligten Adenosinrezeptoren
3. einer gegenseitigen Beeinflussung und möglicher Synergieeffekte der Mediatoren

bei der in vivo mittels Skelettmuskelkontraktion ausgelösten Hyperämie.

2. Material und Methoden

In dieser Arbeit wurden die Arteriolen mittels intravitaler Mikroskopie im Musculus cremaster der Maus (in Anlehnung an die Methode nach Baez S., 1973) direkt beobachtet. Zur Auslösung einer aktiven Hyperämie wurde der das Untersuchungsgebiet innervierende motorische Nerv elektrisch stimuliert. Dies geschah vor und nach Applikation von in die Superfusion eingemischten Substanzen zur Blockade von Rezeptoren, Enzymen oder Kanälen.

2.1 Materialien

Eine Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien findet sich im Anhang.

2.2 Versuchsaufbau

Die Präparation der auf einem Styroporblock und einer Heizmatte liegenden, narkotisierten Versuchstiere erfolgte zum Teil unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskopes (Wild Heerbrugg Wild M650).

Nach Präparation des Cremastermuskels erfolgte die Umlagerung des Tieres inklusive Heizmatte und Thermometer auf einen im Institut gefertigten Plastiktisch. An dem Ende, an dem die Maus mit den Hinterpfoten lag, befand sich ein von einem Silikonstreifen umgebenes Deckgläschen, was das Aufspannen des Cremastermuskels und die folgende Intravitalmikroskopie ermöglichte.

Das narkotisierte Tier wurde mit Plastiktisch zur Durchführung des Experimentes auf dem Mikroskop gelagert. Mit einer Rollerpumpe wurden Substanzen in die Superfusion appliziert, die den Cremastermuskel überströmte. Auf dem Mikroskop war eine Kamera angebracht, die das eingestellte mikroskopische Bild auf einen Monitor übertrug. Außerdem wurden die Bilder analog auf Videokassette aufgezeichnet, wobei während des Versuches in diese Bilder eine Stoppuhr eingeblendet wurde, um die Schritte des Experimentes auf dem Video auch nachfolgend zeitlich exakt nachvollziehen zu können. Das aufgezeichnete Video wurde anschließend digitalisiert und ausgewertet.

2.3 Versuchstiere

Für die Studien wurden ausschließlich männliche Mäuse (C57BL/6NCrl) genutzt. Die Tiere wurden von Charles River bezogen. Sie wiesen ein Gewicht von 22 g bis 34 g (Mittelwert $26,8 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$) auf und waren zwischen 2 und 7 Monaten (Mittelwert $3,2 \pm 0,2 \text{ SEM}$) alt. Alle im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente, einschließlich der Tierhaltung, wurden vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume in Kiel (Schleswig-Holstein) genehmigt (Zeichen: V242-7224.122-2, 66-6/14, 2014; Titel: Rolle von Adenosinrezeptoren bei der Regulation der Organdurchblutung während funktioneller Hyperämie).

2.4 Vorbereitung des Experimentes

Zur Einleitung der Narkose erfolgte eine intraperitoneale Injektion von Midazolam (0,38 mg/ml), Fentanyl (3,8 $\mu\text{g/ml}$) und Dexmedetomidin (19 mg/ml) in einem Gesamtvolumen von 0,4 ml.

Nach Erreichen des Toleranzstadiums wurde der Hautbereich über dem Musculus cremaster beidseits sowie die Halsregion rasiert und das Tier gewogen. Nach erfolgter Rasur wurde die Maus auf eine Heizmatte gelegt, um eine konstante Temperatur von ca. 37 °C zu halten. Dies wurde kontinuierlich mit einem Thermometer zwischen Heizmatte und Maus kontrolliert. Zur Erhaltung der Narkose wurde ein zentralvenöser Zugang gelegt und zur Beatmung wurde das Tier intubiert. Hierzu erfolgte ein paramedianer Schnitt im Bereich des Halses. Darauf folgte die Verdrängung der Speicheldrüsen, sodass nun die Trachea dargestellt und an der Vorderseite eingeschnitten werden konnte. Dann wurde ein zurechtgeschnittenes Kunststoffröhrchen als Tubus eingelegt und mittels vorgelegter Bindfäden durch Umschlingung des inferioren Teils der eingeschnittenen Trachea und Zusammenziehen der Fäden befestigt (Bild 1). Dies ermöglichte eine spätere Beatmung mit 150 Atemhüben pro Minute bei einem Atemhubvolumen von 200 μl . Als nächster Schritt wurde die Vena jugularis interna einer Seite freigelegt, mittels Umschlingung und Zug an Bindfäden proximal gestaut und ein kleiner Bereich der Vene durch Zug an distalen Bindfäden isoliert (Bild 1). Im Bereich dieses Gefäßabschnittes wurde dann die Vene eingeschnitten und ein mit isotoner NaCl-Lösung gefüllter Polyethylenschlauch mit einem Innendurchmesser von 0,4 mm und

einem Außendurchmesser von 0,8 mm eingelegt. Anschließend wurde die proximale Stauung aufgehoben, die intravenöse Lage durch Aspiration und Volumengabe überprüft, der Schlauch etwas vorgeschoben und mittels dreier vorgelegter Bindfäden fixiert. Die Narkotika wurden in identischen Konzentrationen wie bei der Einleitung der Narkose verwendet und in einem Gesamtvolumen von 0,09 ml/h mittels Spritzenpumpe verabreicht. Bei Anzeichen einer unzureichenden Narkose wurde die applizierte Menge über kurze Zeit in adäquatem Umfang erhöht, es waren nie mehr als 0,27 ml/h erforderlich. Die Narkosetiefe wurde über Anpusten der Schnurrhaare und Zwickeln mit einer Pinzette in eine Pfote überprüft.

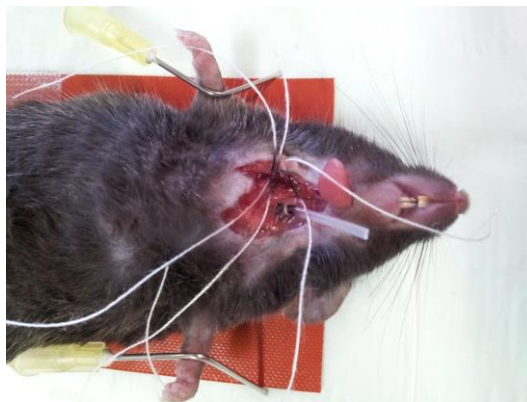


Bild 1: Intubierte Maus mit vorgelegten Bindfäden an der rechten Vena jugularis

2.5 Präparation des Musculus cremaster

Nach Einlage der Zugänge in Trachea und Vena jugularis interna erfolgte die Präparation des Musculus cremaster einer Seite. Hierfür wurde die Maus mit der Wärmematte auf den beschriebenen Plastiktisch gelegt. Zur Freilegung des M. cremaster erfolgte ein kraniokaudaler Hautschnitt von ca. 2 cm Länge in der Unterbauchregion des Versuchstieres. Nach dem Eröffnen wurde die Superfusion des Muskels mit Krebs-Henseleit-Lösung begonnen. Die hergestellte Lösung wurde in einem Vorratsgefäß mit einem Gemisch aus 95 % Stickstoff und 5 % CO₂ begast. Durch diese Begasung in Kombination mit dem enthaltenen Bicarbonat wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung auf 34 °C erwärmt und zum Versuchstier geleitet.

Durch stumpfe Präparation wurde die kaudale Spitze des Musculus cremaster freigelegt, mittels eines atraumatischen Fadens angeschlungen und nach oben

aufgespannt. So konnte die Superfusion am Muskel entlang hinabfließen und der Muskel vom Bindegewebe befreit werden. Durch einen longitudinalen Schnitt wurde der Muskelschlauch des Cremastermuskels von kaudal nach kranial eröffnet und die sich ergebenden Schnittränder durch atraumatische Fäden angeschlungen. Der Muskel wurde nun über ein kaudal der Maus angebrachtes Deckgläschen aufgespannt, indem die an den Seitenrändern des Muskels eingebrachten Fäden durch einen das Deckglas umgebenden Silikonstreifen gezogen wurden (Bild 2). Hierbei wurde darauf geachtet, dass der Muskel unter geringem Zug flach über dem Deckglas ausgebreitet wurde. Die Versorgung des Muskels war durch die zentral im Still liegenden Gefäße gewährleistet. Hier lag auch der motorische Nerv, der stimuliert werden sollte. Der Hoden wurde nach Durchtrennung des ihn haltenden Bandes (Meso) in die Bauchhöhle verlagert, sodass der gesamte Muskel zu beobachten war. Um ein möglichst physiologisches Milieu zu erhalten, wurde der Muskel ununterbrochen mit 8 ml/min Krebs-Henseleit-Lösung überströmt (Superfusion), deren pO_2 durch die hypoxische Begasung bei ca. 25 mmHg lag.

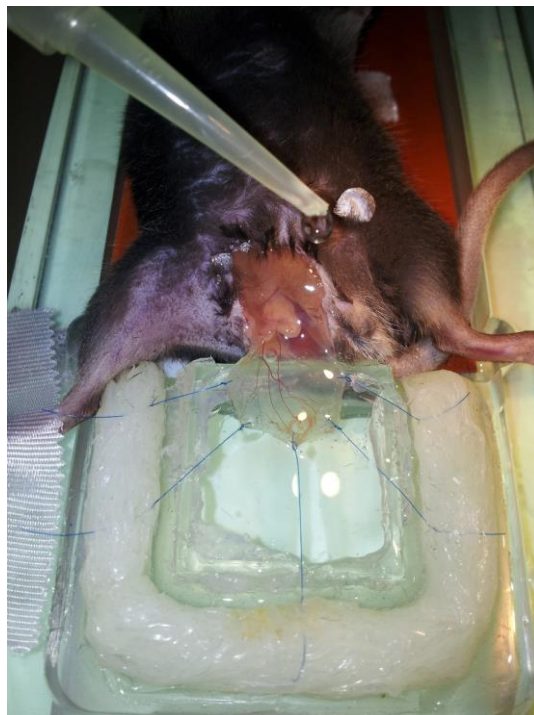


Bild 2: Über einem Deckgläschen ausgebreiteter Cremastermuskel, vorbereitet zur Intravitalmikroskopie

Nach Umlagerung wurde das Präparat mittels Mikroskop (Axioskop FS von Zeiss, 10x Vergrößerung zum Betrachten der Gefäße und Nutzung eines 40x Objektivs

(Acroplan, Apertur 0,75) für das Experiment) inspiziert und zur Untersuchung geeignete Gefäße gesucht. Kriterien waren ein annähernd gerader Verlauf, scharfe Abbildbarkeit im Mikroskop und spontaner Gefäßtonus. Folgend wurde der den Muskel innervierende motorische Nerv aufgesucht. In unmittelbarer Nähe des Nerven wurde ein feiner Platindraht platziert, der durch eine Glaskapillare gezogen und dadurch isoliert war. Der Draht wurde mit einem Stimulator verbunden, der rechteckförmige Impulse mit bestimmter Länge, Dauer und Frequenz generierte. Die korrekte Lage des Drahtes und die effektive Stimulation wurden mittels optischer Kontrolle der Kontraktionen des Skelettmuskels makroskopisch und mikroskopisch verifiziert. Falls keine entsprechende motorische Reaktion erfolgte, wurde der Draht näher am Nerv positioniert oder mit einer höheren Spannung stimuliert.

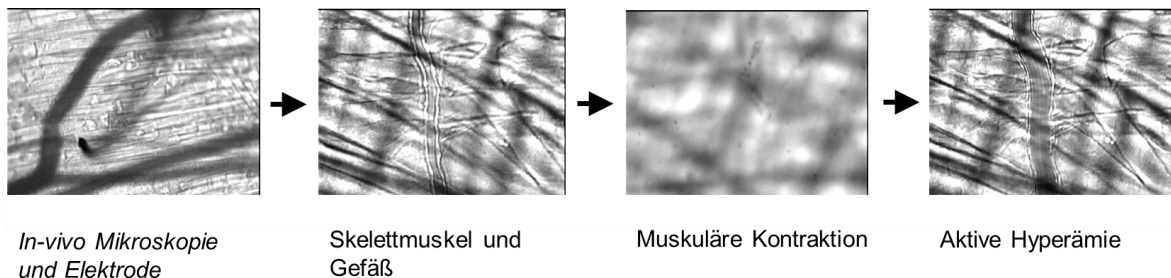
Die Substanzapplikation in die Salzlösung, die den Muskel überströmte, wurde mittels einer Rollerpumpe (Miniplus® 3, Gilson, USA) realisiert. Diese Pumpe wies eine Förderrate von 80 µl/min auf, sodass sich bei dem Volumenfluss von 8 ml/min in der Krebs-Henseleit-Lösung eine 1:100-fache Verdünnung des durch die Rollerpumpe geförderten Stoffes ergab. Die in der Arbeit angegebenen Konzentrationen der Substanzen sind deren Konzentrationen auf dem Muskelpräparat.

Am Ende jedes Versuchs wurde eine Kombination verschiedener Vasodilatoren (Adenosin, Acetylcholin und Natrium-Nitroprussid) in hoher Konzentration (jeweils 10 µmol/l) appliziert. Dies löste eine maximale Gefäßdilatation aus, sodass der maximal mögliche Gefäßdurchmesser bestimmt werden konnte.

Nach Beendigung des Versuches wurde das Tier getötet, indem 0,5 ml Pentobarbital (160 mg/ml) intravenös appliziert wurde. Der Tod des Tieres wurde über ein Sistieren der Atmung nach Abschaltung der Beatmung und des Blutflusses im Muskelpräparat verifiziert.

2.6 Versuchsprotokoll

Es wurde während des ganzen Experiments ausschließlich ein Gefäß an derselben Stelle untersucht. Zunächst wurden verschiedene Vasodilatoren betrachtet. Hierzu wurde das mikroskopische Bild des Gefäßes in Ruhe und während der Substanzapplikation kontinuierlich aufgenommen, um später den Durchmesser messen zu können. Untersucht wurden Acetylcholin und ADP in den Konzentrationen 1 und 10 $\mu\text{mol/l}$. Nach Applikation einer Substanz wurde mindestens drei Minuten ohne Stimulation pausiert, um dem Gefäß die Rückkehr zum Ruhezustand zu ermöglichen. Danach wurde die aktive Hyperämie unter Kontrollbedingungen untersucht. Die Stimulation zur Auslösung der Skelettmuskelkontraktion erfolgte mit 10 Hz (Twitch) oder 100 Hz (Tetanus) für eine Zeit von 1, 15, 30 oder 60 Sekunden, wobei jeweils 0,5 Sekunden Stimulation von 2,5 Sekunden Pause unterbrochen wurde, sodass das Gefäß auch während dieser Stimulationsperioden sichtbar war. In der 0,5-sekündigen Phase der Stimulation wurde eine rechteckförmige Spannung für eine Dauer von 1 ms mit den genannten Frequenzen angelegt (Grafik 1).



Grafik 1: Darstellung der Mikrozirkulation während der Untersuchung

Dieses Protokoll wurde in Anwesenheit einer Substanz zur Blockade eines Rezeptors oder Enzyms wiederholt, wobei die Substanz mindestens für 15 Minuten vor der Wiederholung des Protokolls appliziert worden war. In einigen Versuchen wurde danach zusätzlich eine zweite Substanz appliziert und das Protokoll in Anwesenheit beider Substanzen erneut wiederholt. Die untersuchten Substanzen zur Blockade bestimmter Rezeptoren oder Enzyme sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Reihenfolge der Substanzen war nicht randomisiert. Das Untersuchungsprotokoll wurde immer zunächst im unbehandelten Zustand (Kontrolle) durchgeführt, um eine möglicherweise nicht vollständig auswaschbare

Wirkung einer vorangegangenen Behandlung auszuschließen. Der Kontrolle wurde dann eine Behandlungsserie mit demselben Untersuchungsprotokoll unter Einfluss eines Antagonisten angeschlossen, die unter Umständen durch eine weitere Behandlungsserie mit unverändertem Untersuchungsprotokoll unter Einfluss einer Kombination von Antagonisten ergänzt wurde.

Die Gruppengröße aller Experimente wurde auf Basis ähnlicher Vorexperimente und der zu erwartenden Effektstärke auf 5 Versuchstiere pro experimentelle Serie festgelegt. Bei übereinstimmender Behandlung innerhalb verschiedener experimenteller Serien wurden die Ergebnisse zusammengefasst, um eine möglichst große Datenbasis zu erhalten. Dies ist insbesondere bei den unbehandelten Kontrollen der Fall, so dass sich hier die höchsten Zahlen für die n-Werte ergeben, während bei den verschiedenen Behandlungsgruppen lediglich die Minimalzahl für die n-Werte entstehen.

Tabelle 1: Substanzen zur Rezeptor- oder Enzyblockade

Zielstruktur und Wirkung	Substanz
Unselektive Adenosinrezeptorblockade	1,3 Dipropyl-8-(p-Sulfophenyl)xanthine (10 $\mu\text{mol/l}$)
Selektive A ₂ A-Rezeptorblockade	3,7 Dimethyl-1-propargylxanthine (10 $\mu\text{mol/l}$)
Selektive P ₂ Y-Rezeptorblockade	Pyridoxalphosphat-6-Azophenyl-2',4'-Disulfonsäure (10 $\mu\text{mol/l}$)
K _{ATP} -Kanalblockade	Glibenclamid (10 $\mu\text{mol/l}$)
Inhibition der Cyclooxygenase	Indometacin (3 $\mu\text{mol/l}$)
Inhibition der NO-Synthase	L ^w -Nitro-L-Arginin (30 $\mu\text{mol/l}$)
Blockade nikotinischer ACh-Rezeptoren	Pancuronium (1 $\mu\text{mol/l}$)

2.7 Auswertung und Statistik

Während der experimentellen Abschnitte des gesamten Versuchs wurde das Mikroskopbild kontinuierlich mittels Videorekorder zur späteren Auswertung auf Kassette aufgezeichnet.

Im Anschluss an den Versuch erfolgte die Digitalisierung des analogen Videosignals mittels eines Videorekorders (AG-7350, Panasonic, Osaka, Japan) und einer USB-Video-Karte (Co8-025, Conceptronic, Amersfoort, Niederlande). Der digitalisierte Film wurde daraufhin in einem mittels Lab View (Version 8.0, National Instruments,

Austin, Texas, USA) entwickelten, kalibrierten Programms auf dem PC dargestellt. Der Innendurchmesser der Arteriole wurde durch die Verschiebung zweier paralleler, in das Bild projizierter Balken gemessen. Die Balken konnten durch Tastendruck am Computer verschoben werden. Das vorher kalibrierte Programm legte die Durchmesserwerte, die sich aus dem Balkenabstand ergaben, mit einer Frequenz von 2Hz auf der Festplatte ab. Die Messung des Gefäßes wurde jeweils 30 Sekunden vor der Manipulation begonnen, was durch Einblenden einer Stoppuhr in das analoge Videosignal ermöglicht wurde.

Nach Erstellen der Rohdaten der einzelnen Versuche erfolgte die Verarbeitung mittels kommerziell erhältlicher Software (Stata, StataCorp LP, 4905 Lakeway Drive College Station, TX 77845, USA). Alle Werte sind als Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Die Fläche der Dilatationen über die Zeit ist in Balkendiagrammen blau gefärbt dargestellt. Maximalwerte der Dilatation sind als Absolutwert in μm und in Balkendiagrammen rot gefärbt dargestellt. Dilatationen über die Zeit sind farblich variabel und je nach Behandlung korrespondierend mit der entsprechenden Legende dargestellt. Die Kontrolle ist hierbei immer schwarz gefärbt.

Die Durchmesseränderung wurde berechnet als Prozent der maximal möglichen Antwort $\left[\frac{D(\text{Behandlung}) - D(\text{Ruhe})}{D(\text{maximal}) - D(\text{Ruhe})} \times 100 \right]$, diese ist bei einer Dilatation der maximale Gefäßdurchmesser (bestimmt durch die kombinierte Stimulation mit drei Dilatatoren) und bei einer Konstriktion der minimale Durchmesser (also 0). Weiterhin wurde die Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) nach Auftragen der Dilatation über die Zeit berechnet. Hierzu wurden alle in einem definierten Beobachtungszeitraum bestimmten Werte addiert. Der Beobachtungszeitraum entspricht dem jeweils maximal dargestellten Zeitraum und ist für alle miteinander verglichenen Experimente gleich.

Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Programmes Stata mittels gepaartem t-Test errechnet und nach Bonferroni-Holm korrigiert. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5 % ($p < 0,05$) wurden die beobachteten Effekte als signifikant erachtet. Die Untersuchungsergebnisse einzelner Tiere wurden

verworfen, wenn weder durch Applikation von Acetylcholin oder Adenosin noch durch elektrische Stimulation unter Kontrollbedingungen eine relevante Vasodilatation zu beobachten war. Dies war bei sechs von den der Arbeit zugrundeliegenden 69 Tieren der Fall.

Die Berechnung von Mittelwert und SEM der Größe und des Gewichts der Mäuse erfolgte mittels Nutzung der Programme MedCalc (MedCalc Software bvba, Acacialaan 22, 8400 Ostend, Belgium) und Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, One Microsoft Way, Redmond, WA 98052-6399, USA).

Die Anfertigung dargestellter Diagramme und Grafiken erfolgte mittels Microsoft Excel 2013 und Microsoft Power Point 2013 (Microsoft Corporation, One Microsoft Way, Redmond, WA 98052-6399, USA) sowie SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc.).

3. Ergebnisse

3.1 Blockade der Skelettmuskelkontraktion

Die Übertragung der Erregung vom Nerv auf den Skelettmuskel kann durch Blockade der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren unterbrochen werden. Hierzu wurde der Superfusion Pancuronium (1 $\mu\text{mol/l}$) zugesetzt. In Anwesenheit von Pancuronium in dieser Konzentration waren selbst bei Stimulation mit 100 Hz keine Kontraktionen sichtbar. Eine Vasodilatation war nicht mehr zu beobachten (Abbildung 1). Im Gegensatz dazu blieben durch Acetylcholin induzierte Vasodilatationen unbeeinflusst (Abbildung 2). Dies zeigt, dass muscarinerge Rezeptoren, die die endothelabhängige Acetylcholindilatation auslösen, nicht blockiert wurden. Hieraus lässt sich ableiten, dass durch die Stimulation des motorischen Nervs an der motorischen Endplatte freigesetztes Acetylcholin selbst keine Vasodilatation auslöst. Eine Dilatation war nur bei intakter neuromuskulärer Übertragung und so ausgelöster Skelettmuskelkontraktion zu beobachten.

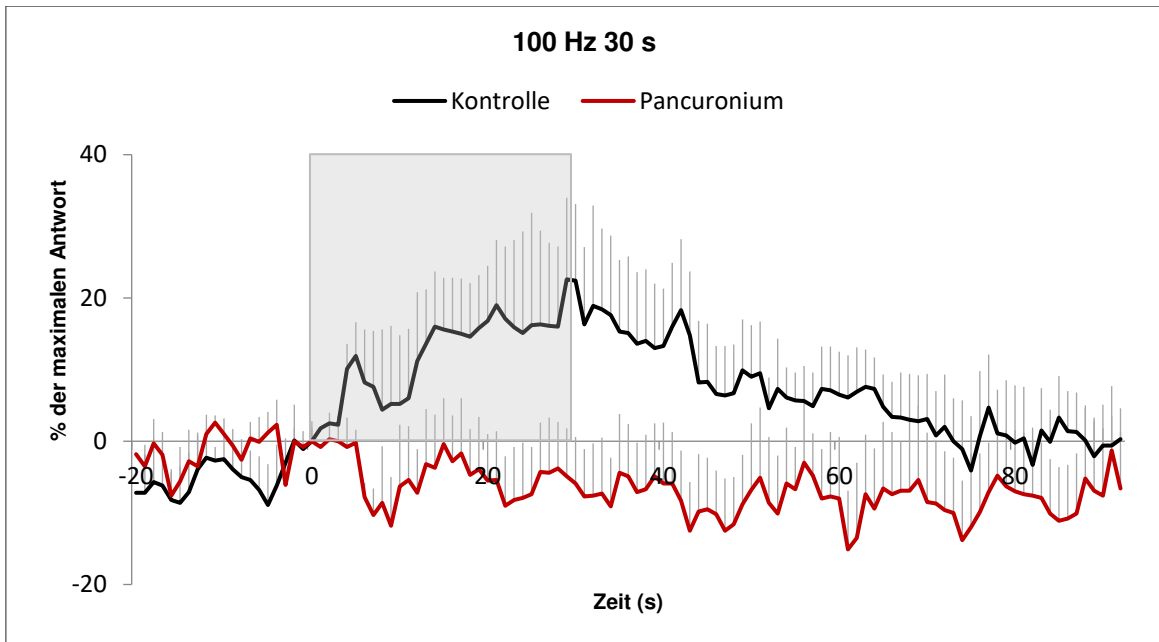


Abbildung 1: Arteriöläre Durchmesser über die Zeit vor und nach 30-sekündiger Stimulation des motorischen Nerven mit 100 Hz. Während unter Kontrollbedingungen eine deutliche Dilatation zu beobachten war, blieb die Dilatation in Anwesenheit von Pancuronium aus. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Das graue Feld repräsentiert die Dauer der elektrischen Stimulation; abgebildet ist der Mittelwert + SEM, n = 6. Die Dilatation unterschied sich sowohl in der berechneten AUC als auch im während des Beobachtungszeitraums erreichten maximalen Wert.

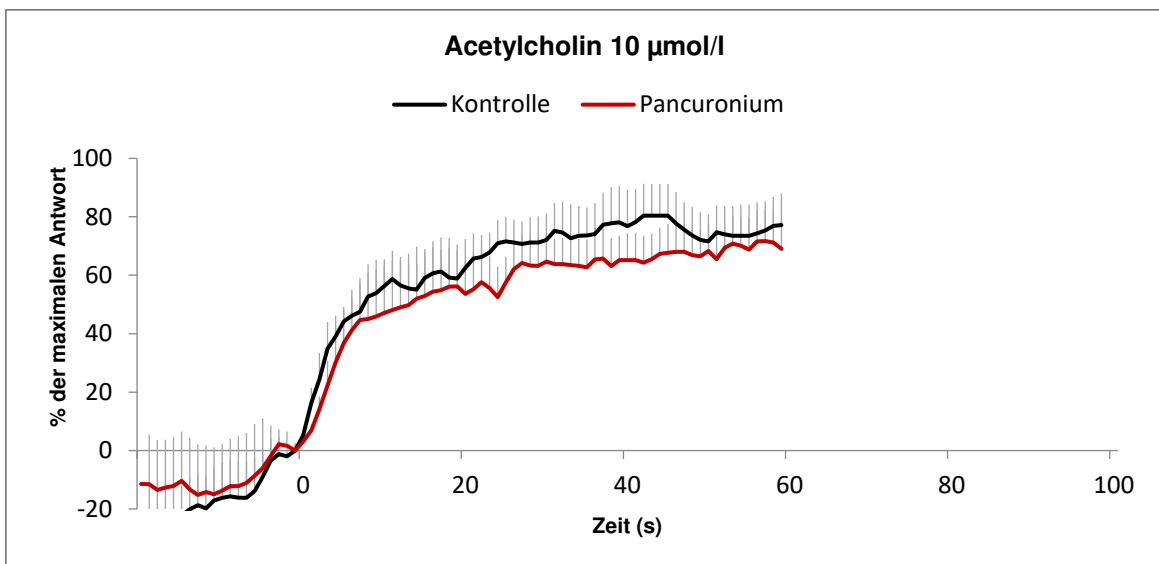


Abbildung 2: Arteriöläre Durchmesser über die Zeit nach Applikation von Acetylcholin zum Zeitpunkt 0. Nach Zusatz von Pancuronium in die Superfusion zeigte sich weiterhin eine im Vergleich zu Kontrollbedingungen unbeeinträchtigte Vasodilatation nach Applikation von Acetylcholin zum Zeitpunkt 0. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM, n = 4.

3.2 Untersuchung von Vasodilatoren

3.2.1 Acetylcholin

Die Applikation von Acetylcholin bewirkte eine Vasodilatation (Abbildung 3). Der Durchmesser nahm nach 1 $\mu\text{mol/l}$ von $9 \pm 0,6 \mu\text{m}$ auf $19 \pm 1 \mu\text{m}$ und nach 10 $\mu\text{mol/l}$ von $10 \pm 0,6 \mu\text{m}$ auf $25 \pm 0,8 \mu\text{m}$ (maximaler Gefäßdurchmesser $29 \pm 0,7 \mu\text{m}$; $n=62$ bis 66) zu. Es zeigt sich, dass Acetylcholin auch in diesen Versuchen ein effektiver Vasodilatator ist, was den Schluss zulässt, dass in den untersuchten Präparationen die Endothelfunktion intakt war.

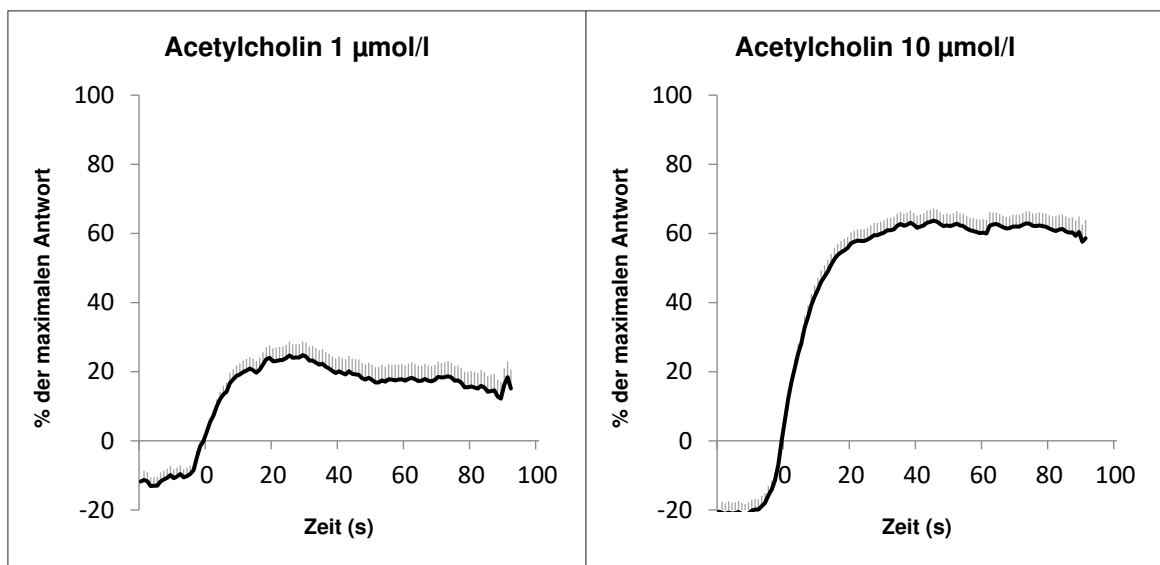


Abbildung 3: Arteriöle Durchmesser über die Zeit vor und nach Applikation von Acetylcholin (1 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 10 $\mu\text{mol/l}$) zum Zeitpunkt 0. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Es zeigte sich eine deutliche, konzentrationsabhängige Vasodilatation. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM, $n = 65-66$.

3.2.2 Adenosin

Adenosin löste ebenfalls eine konzentrationsabhängige Vasodilatation aus. Die Applikation bewirkte eine Steigerung des Gefäßdiameters von $7 \pm 0,4 \mu\text{m}$ auf $13 \pm 0,8 \mu\text{m}$ bei 1 $\mu\text{mol/l}$ und von $8 \pm 0,5 \mu\text{m}$ auf $24 \pm 0,7 \mu\text{m}$ bei 10 $\mu\text{mol/l}$ (maximaler Gefäßdurchmesser $29 \pm 0,7 \mu\text{m}$; $n=69$) (Abbildung 4).

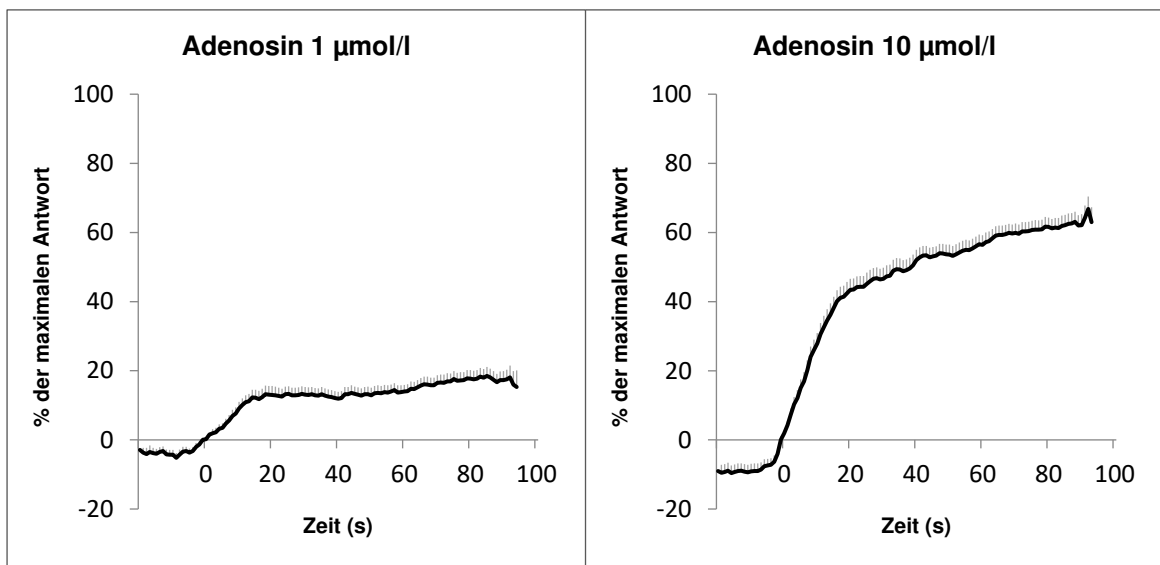


Abbildung 4: Arteriöle Durchmesser über die Zeit vor und nach Applikation von Adenosin (1 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 10 $\mu\text{mol/l}$) zum Zeitpunkt 0. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Es zeigte sich eine deutliche, konzentrationsabhängige Vasodilatation. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM, $n = 69$.

3.2.3 Adenosindiphosphat

ADP wurde in den Konzentrationen 1 $\mu\text{mol/l}$ und 10 $\mu\text{mol/l}$ untersucht. Während die Dilatation in der niedrigen Konzentration nur gering (Steigerung des Diameters von $6 \pm 0,7 \mu\text{m}$ auf $9 \pm 1,4 \mu\text{m}$) ausgeprägt war, induzierte 10 $\mu\text{mol/l}$ ADP eine deutlich stärkere Reaktion (Steigerung des Diameters von $6 \pm 0,6 \mu\text{m}$ auf $18 \pm 1,5 \mu\text{m}$); Der maximale Durchmesser der untersuchten Gefäße betrug $26 \pm 1,2 \mu\text{m}$; $n=14$. Auffällig war, dass die Vasodilatation nach Applikation von ADP deutlich langsamer als nach Applikation von Acetylcholin oder Adenosin zunahm (Abbildung 5).

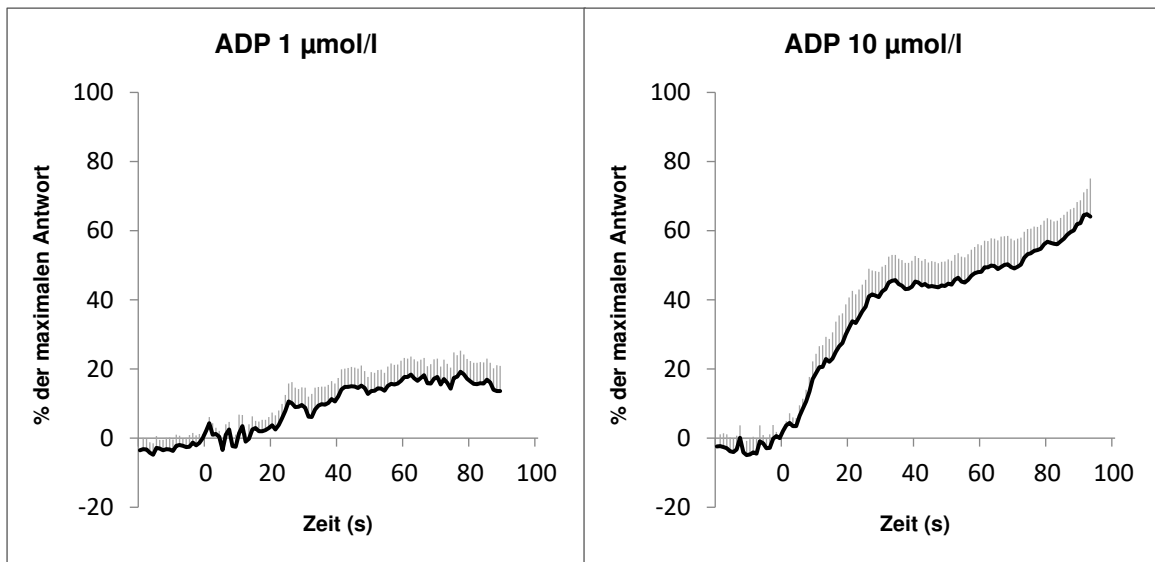


Abbildung 5: Arteriöle Durchmesser über die Zeit vor und nach Applikation von Adenosindiphosphat (1 µmol/l bzw. 10 µmol/l) zum Zeitpunkt 0. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Es zeigte sich eine deutliche konzentrationshängige Vasodilatation, die im Vergleich zu Acetylcholin und Adenosin träge ansteigt. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM, n = 14.

3.3 Aktive Hyperämie

Durch elektrische Stimulation des motorischen Nerven waren zuverlässig muskuläre Kontraktionen auszulösen. Diese Kontraktionen waren begleitet von Vasodilatationen der Arteriolen im Skelettmuskel. Die Vasodilatation war umso ausgeprägter und anhaltender, je länger der Skelettmuskel kontrahiert wurde. Die Vasodilatation begann unmittelbar nach Stimulationsbeginn und nahm rasch zu, wobei dieser Anstieg der aktiven Hyperämie während tetanischen Kontraktionen (100 Hz) deutlich schneller war als bei nicht tetanischen Kontraktionen (10 Hz) (Abbildungen 6 und 7). Der jeweilige Maximalwert wurde am Ende der Stimulationsphase erreicht und fiel anschließend ab. Lediglich bei sehr kurzer Stimulation (1 s) war der maximale Wert erst nach der Stimulation zu beobachten. Die Dilatationskurve bei Stimulation mit 100 Hz über 60 Sekunden näherte sich auch während der Stimulation bereits einem Maximum an, sodass durch eine noch längere Stimulationsphase keine deutliche weitere Steigerung der Dilatation zu erwarten gewesen wäre (Tabelle 1 und Abbildungen 6 und 7).

Tabelle 1: Gefäßdiameter vor muskulärer Kontraktion (Ruhediameter) und während maximaler Vasodilatation (Maximaldiameter) in μm . Die Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort und als AUC der Dilatationsamplitude über die Zeit. Es zeigte sich eine deutliche, in ihrer Amplitude bei steigender Stimulationsdauer zunehmende Vasodilatation. Abgebildet ist der Mittelwert \pm SEM.

Stimulation	Ruhediameter (μm)	Maximaldiameter (μm)	% der maximal möglichen Gefäßantwort	AUC
10 Hz 1 s	$9 \pm 0,7$	$10 \pm 0,7$	36 %	21 ± 24
10 Hz 15 s	$7 \pm 0,4$	$9 \pm 0,5$	31 %	91 ± 36
10 Hz 30 s	$7 \pm 0,4$	$11 \pm 0,7$	37 %	214 ± 43
10 Hz 60 s	$7 \pm 0,4$	$12 \pm 0,7$	40 %	399 ± 86
100 Hz 1 s	$7 \pm 0,4$	$15 \pm 0,6$	51 %	216 ± 35
100 Hz 15 s	$8 \pm 0,5$	$19 \pm 0,7$	64 %	792 ± 101
100 Hz 30 s	$8 \pm 0,5$	$21 \pm 0,9$	73 %	1757 ± 221
100 Hz 60 s	$8 \pm 0,6$	$24 \pm 0,9$	82 %	3465 ± 389
Ruhedurchmesser im Mittel $7 \pm 0,5 - 8 \pm 0,5 \mu\text{m}$ Maximaler Durchmesser der Gefäße $29 \pm 0,7 \mu\text{m}$; n = 43 bis 66				

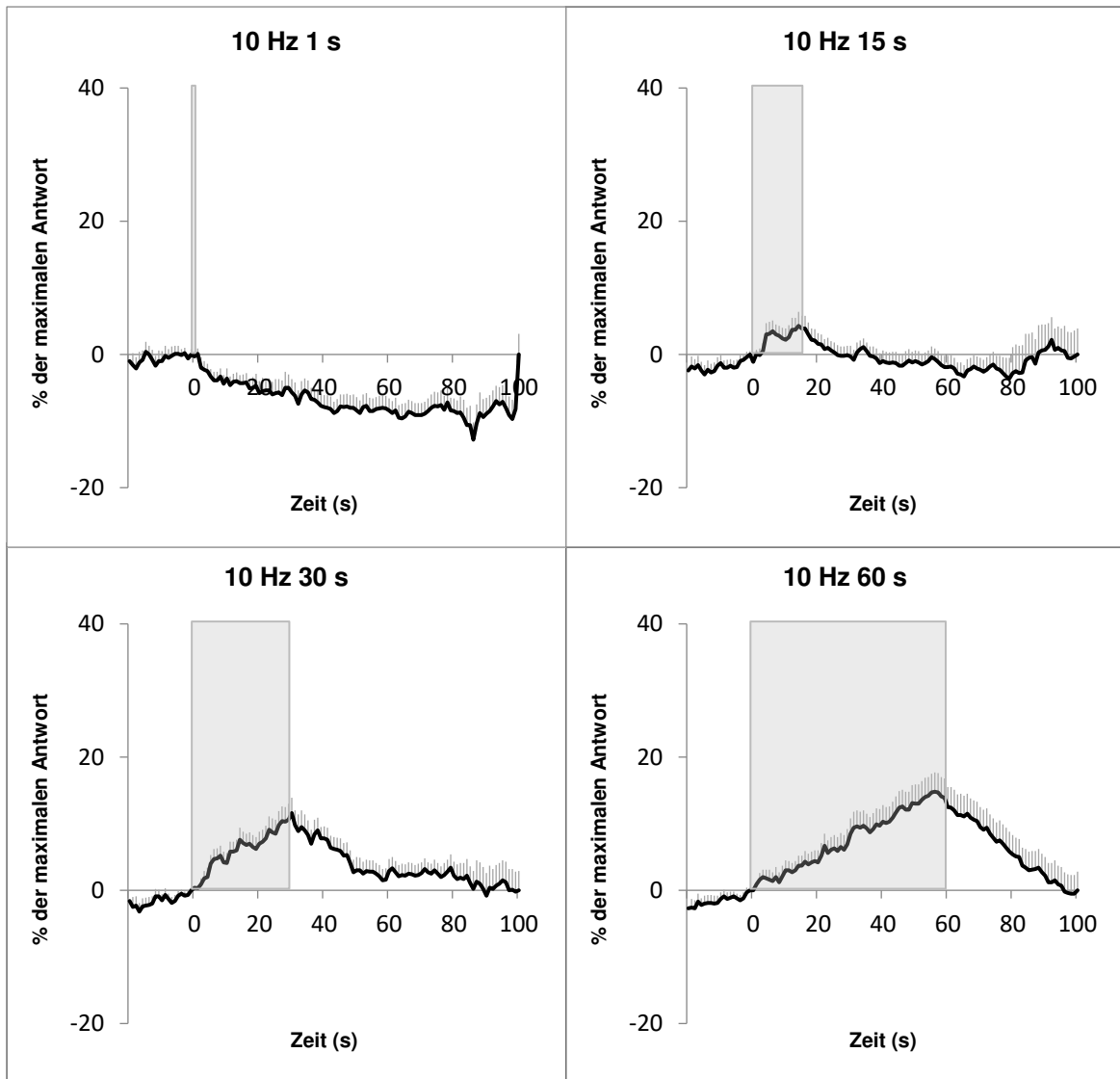


Abbildung 6: Arteriöle Durchmesser vor, während und nach nicht tetanischen muskulären Kontraktionen. Es zeigte sich eine deutliche, in ihrer Amplitude bei steigender Stimulationsdauer zunehmende Vasodilatation, die insbesondere bei Stimulation über 30 und 60 Sekunden verhältnismäßig träge anstieg. Das graue Feld markiert die Dauer der elektrischen Stimulation. Die Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM, $n = 65-66$.

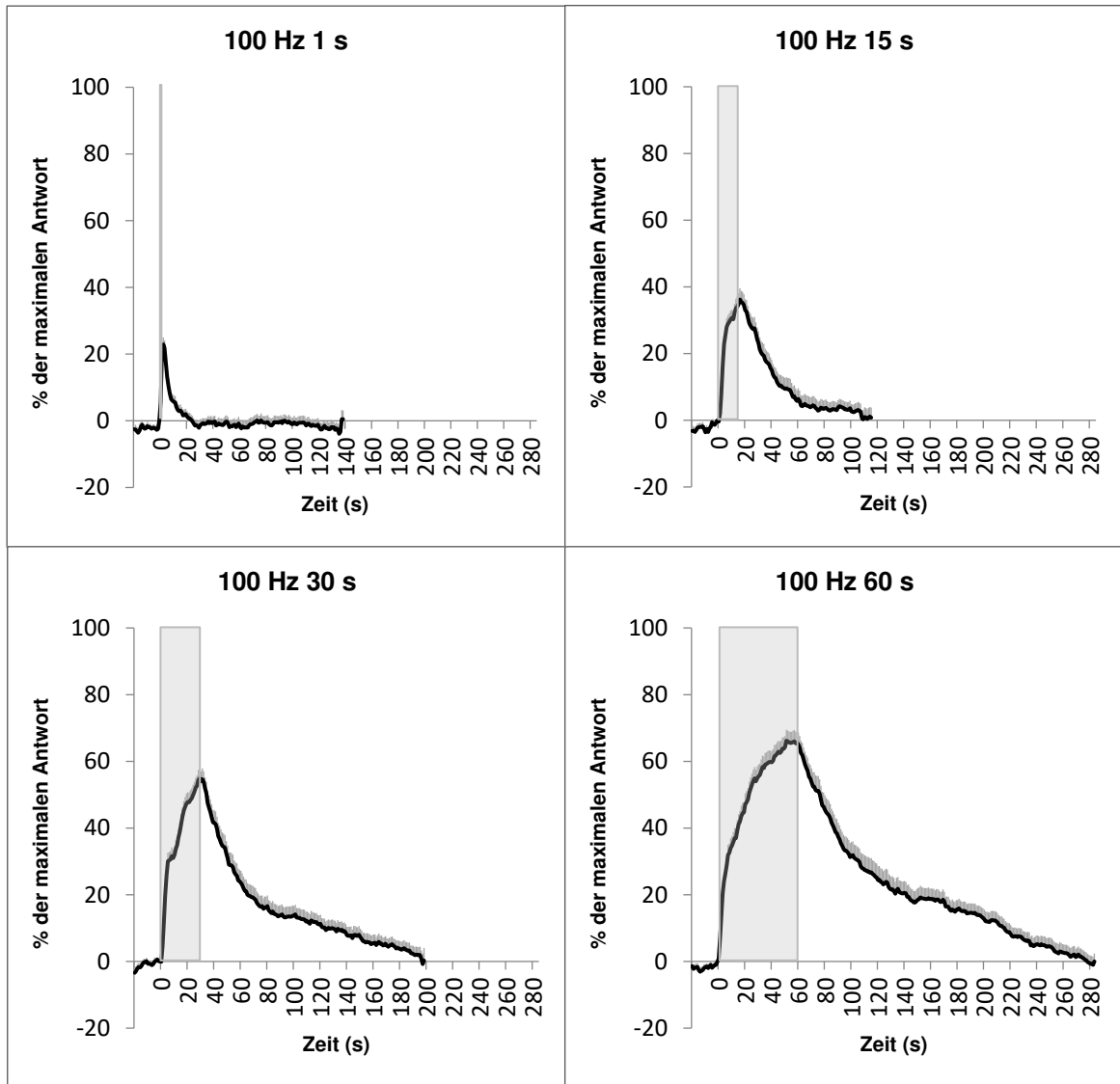


Abbildung 7: Arteriellere Durchmesser vor, während und nach tetanischen muskulären Kontraktionen. Es zeigte sich eine deutliche, in ihrer Amplitude bei steigender Stimulationsdauer zunehmende Vasodilatation, die bei Beginn der Kontraktionen rasch anstieg. Die Steilheit des Anstiegs war bei allen Stimulationsdauern vergleichbar. Das graue Feld markiert die Dauer der elektrischen Stimulation. Die Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM, n = 65-66.

3.4 Effekte einer Enzym- und/oder Rezeptorblockade

3.4.1 Blockade der NOS und COX

Um zu untersuchen inwieweit Cyclooxygenase (COX) und NO-Synthase (NOS) an Dilatationen auf Adenosin beteiligt sind, wurde die arteriellere Reaktion nach Adenosinapplikation unter Blockade beider Enzyme mit L^w-Nitro-L-Arginin und

Indometacin (LI) betrachtet. Die Inhibition der NOS und der COX führte zu einer Gefäßverengung (von $13 \pm 2,4 \mu\text{m}$ auf $6 \pm 1,2 \mu\text{m}$, Konstriktion der Arteriolen um 54 %, $p = 0,0006$; $n = 5$), der arterioläre Tonus wurde also erhöht. Die kombinierte Blockade minderte die Vasodilatation nach Applikation von $10 \mu\text{mol/l}$ Acetylcholin nicht (Kontrolldilatation auf $28 \pm 2,4 \mu\text{m}$, unter NOS- und COX-Inhibition auf $28 \pm 2,4 \mu\text{m}$; maximaler Durchmesser der Gefäßstellen von $30,3 \pm 2,5 \mu\text{m}$; $n = 5$), woraus geschlossen werden kann, dass die Fähigkeit der Gefäße, zu dilatieren, nicht eingeschränkt wurde. Die Applikation von Adenosin $10 \mu\text{mol/l}$ bewirkte auch unter gleichzeitiger Blockade der COX und der NOS eine deutliche Gefäßerweiterung. Die AUC der durch Adenosin hervorgerufenen Vasodilatation sank durch die Blockade zwar geringfügig, diese Änderung erreichte aber kein signifikantes Niveau (AUC 1721 ± 310 vs. 1463 ± 280 ; -15 %, $p = 0,62$, $n = 5 - 8$). Der maximale Wert der erreichten Dilatation war allerdings geringer (EXT $25 \pm 2,1$ vs. $19 \pm 3,3$; -24 %, $p = 0,04$; maximaler Durchmesser der Gefäßstellen: $30 \pm 2,5 \mu\text{m}$; $n = 5$) (Abbildung 8). Die kombinierte Blockade der COX und NOS schwächte also die durch Adenosin induzierte Vasodilatation geringfügig ab.

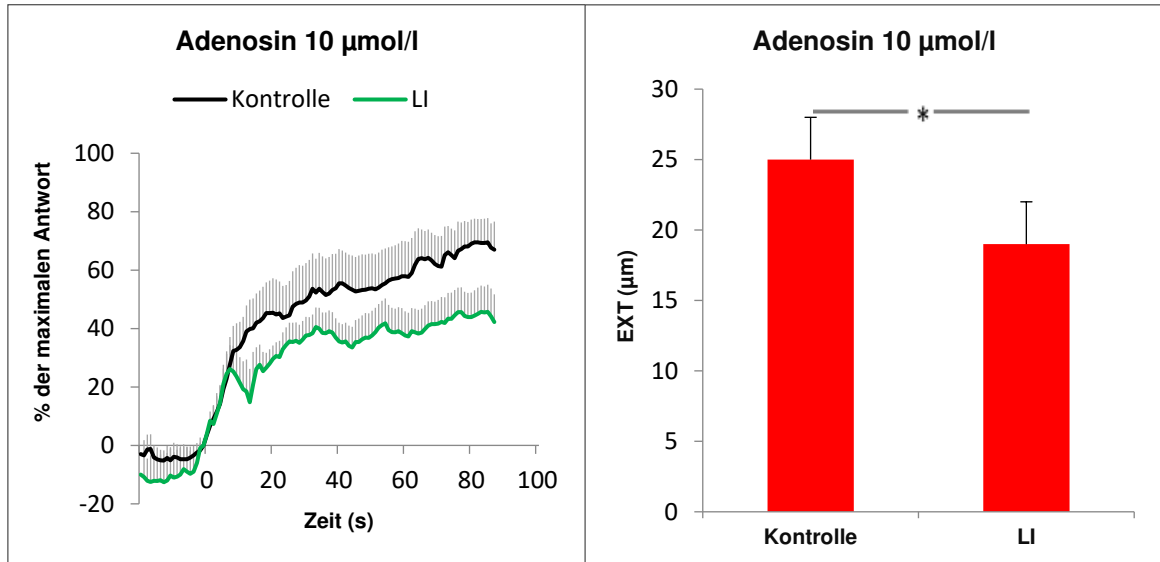


Abbildung 8: Arteriöläre Durchmesser nach Applikation von Adenosin $10 \mu\text{mol/l}$ zum Zeitpunkt 0. Die Durchmesseränderung ist links angegeben als % der maximal möglichen Antwort, rechts ist der Extremwert der erreichten Gefäßdiameter gezeigt. Es zeigte sich eine deutliche Vasodilatation, die in ihrem Extremwert nach Blockade der NOS und COX abgeschwächt war. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM, *=signifikante Wertänderung (siehe Tabelle 2), $n = 5-8$.

Zur Untersuchung der Rolle der COX und NOS bei aktiver Hyperämie erfolgte die Betrachtung der aktiven Hyperämie unter kombinierter Enzyminhibition. Nach Blockade der COX und NOS gab es, außer einer geringen Abschwächung des Extremwertes während aktiver Hyperämie nach tetanischer Stimulation für 15 Sekunden, keine signifikante Minderung der aktiven Hyperämie. Vasodilatationen nach nicht-tetanischen oder tetanischen Muskelkontraktionen waren weder in ihrem Maximum noch in der Fläche ihrer Dilatationsamplitude über die Zeit (AUC) vermindert (Abbildung 9 und Tabelle 2). Es gab keine erkennbare Verzögerung des Dilatationsanstiegs der aktiven Hyperämie (Abbildung 9). Die durch COX und NOS gebildeten endothelialen Autakoide haben somit keine entscheidende Funktion bei aktiver Hyperämie, bzw. das Fehlen dieser Mediatoren kann durch andere Mechanismen kompensiert werden.

*Tabelle 2: Maximaler Gefäßdurchmesser bei muskulärer Kontraktion in μm mit AUC der Vasodilatation über die Zeit unter Kontrollbedingungen und unter Blockade der COX und NOS (LI). Es zeigte sich keine relevante Abschwächung der aktiven Hyperämie durch die Enzymblockade. Abgebildet ist der Mittelwert \pm SEM. * = Signifikante Minderung gegenüber der Kontrolluntersuchung.*

	Kontrolle		LI	
	AUC	EXT (μm)	AUC	EXT (μm)
Acetylcholin 10 $\mu\text{mol/l}$	2090 \pm 306	28 \pm 2,4	3100 \pm 397	28 \pm 2,5
Adenosin 10 $\mu\text{mol/l}$	1721 \pm 310	25 \pm 2,1	1463 \pm 280	19 \pm 3,3 * p = 0,04
10 Hz 1 s	-12 \pm 8	11 \pm 1,9	-3 \pm 3,4	4,7 \pm 1
10 Hz 15 s	32 \pm 21	9 \pm 1,6	134 \pm 103	6 \pm 1,7
10 Hz 30 s	254 \pm 160	11 \pm 1,7	190 \pm 101	7 \pm 2,1
10 Hz 60 s	624 \pm 333	13 \pm 2,3	523 \pm 254	11 \pm 2,6
100 Hz 1 s	254 \pm 131	30 \pm 2,5	104 \pm 47	10 \pm 1,1
100 Hz 15 s	991 \pm 185	20 \pm 1,4	1223 \pm 355	18 \pm 2,2 * p = 0,044
100 Hz 30 s	2224 \pm 485	22 \pm 2,9	2563 \pm 612	21 \pm 2,9
100 Hz 60 s	2896 \pm 873	24 \pm 3,3	5028 \pm 1243	25 \pm 3,2
Ruhedurchmesser im Mittel: 13 \pm 2,4 μm (Kontrolle) und 6 \pm 1,2 μm (LI) Maximaler Durchmesser der Gefäßstellen: 30,3 \pm 2,5 μm ; n = 5				

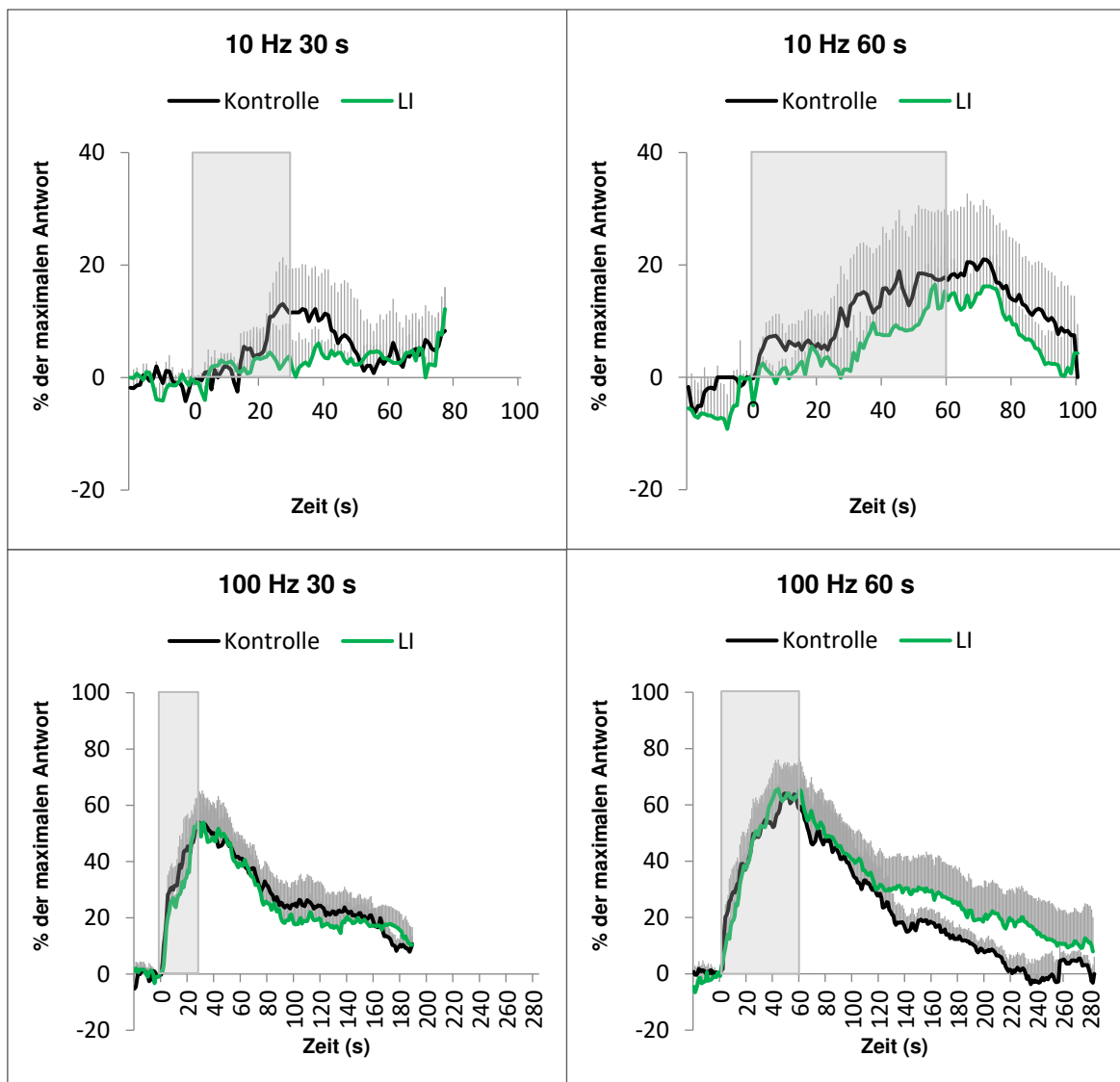


Abbildung 9: Arteriöläre Durchmesser vor, während und nach tetanischen und nicht-tetanischen muskulären Kontraktionen. Es zeigte sich eine deutliche Vasodilatation, die durch Blockade der COX und NOS nicht vermindert wurde. Das graue Feld markiert die Dauer der elektrischen Stimulation. Die Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM; signifikante Änderung der maximalen Amplitude der Dilatation (siehe Tabelle 2), $n = 5$.

3.4.2 Blockade der Adenosinrezeptoren

3.4.2.1 Unselektive Adenosinrezeptorblockade

Die unselektive Adenosinrezeptorblockade mittels 1,3 Dipropyl-8-(p-Sulfophenyl)xanthine (DP) 10 $\mu\text{mol/l}$ schränkte Vasodilatationen durch Acetylcholin

nicht ein (Tabelle 3) (Acetylcholin 10 $\mu\text{mol/l}$, Kontrolle: $26 \pm 3,9 \mu\text{m}$, DP: $27 \pm 4,2 \mu\text{m}$; maximaler Durchmesser der Gefäße: $31 \pm 3,5 \mu\text{m}$; $n = 5$). Der arterioläre Tonus wurde durch die unselektive Adenosinrezeptorblockade nicht verändert (Kontrolle: $12 \pm 2,8 \mu\text{m}$, DP: $10 \pm 0,6 \mu\text{m}$, $p = 0,291$; $n = 5$). Um die Effektivität der unselektiven Adenosinrezeptorblockade zu untersuchen, wurden Dilatationen durch Adenosin untersucht. Diese wurden sowohl bezüglich der AUC (Adenosin 10 $\mu\text{mol/l}$, AUC Kontrolle: 1754 ± 734 , DP: 76 ± 21 , Reduktion der Vasodilatation um 96 %, $p = 0,049$, $n = 5$), als auch der maximalen Dilatation (Adenosin 10 $\mu\text{mol/l}$, Kontrolle: $24 \pm 5,4 \mu\text{m}$, DP: $10 \pm 1,7 \mu\text{m}$, Reduktion der Vasodilatation um 58 %, $p = 0,007$, $n = 5$) nahezu komplett unterdrückt (Tabelle 3 und Abbildung 10).

Die unselektive Adenosinrezeptorblockade beeinflusste die aktive Hyperämie nach tetanischen und nicht tetanischen Kontraktionen weder hinsichtlich der AUC noch hinsichtlich der maximalen Dilatation oder der Geschwindigkeit des Dilatationsanstiegs. Die aktive Hyperämie während tetanischer Kontraktionen sank zwar leicht, der Unterschied zur Kontrolluntersuchung erreichte aber kein signifikantes Ausmaß. Somit bewirkt eine unselektive Adenosinrezeptorblockade mit DP eine zuverlässige Blockade von durch Adenosin ausgelösten Vasodilatationen. Für aktive Hyperämie sind diese aber nicht ausschlaggebend oder der Ausfall wird durch ein redundantes System kompensiert (Tabelle 3 und Abbildung 11).

3.4.2.2 Unselektive Adenosinrezeptorblockade und Blockade der COX und NOS

Die kombinierte Blockade von Adenosinrezeptoren, COX und NOS (DPLI) schränkte, ebenso wie die alleinige Adenosinrezeptorblockade, die Dilatation auf Acetylcholin (10 $\mu\text{mol/l}$, Kontrolle: $26 \pm 3,9 \mu\text{m}$, DPLI: $20 \pm 3,3 \mu\text{m}$, maximaler Diameter der Gefäßstellen: $31 \pm 3,5 \mu\text{m}$; $n = 5$) nicht ein (Tabelle 3). Der Ruhetonus der Gefäße stieg nach kombinierter Blockade im Vergleich zur alleinigen Adenosinrezeptorblockade zwar tendenziell an, diese Veränderung erreichte aber keinen statistisch signifikanten Unterschied (Kontrolle: $12 \pm 2,8 \mu\text{m}$, DP: $10 \pm 0,6 \mu\text{m}$, DPLI: $6 \pm 1,3 \mu\text{m}$, -40 % versus DP, $p = 0,2$ und -50 % versus Kontrolle, $p = 0,0031$; $n = 5$). Damit war die Konstriktion bei Kombination mit DP vergleichbar mit der Konstriktion nach alleiniger Blockade der COX und NOS (54 %, siehe Kapitel 3.4.1). Die durch Adenosin hervorgerufene Vasodilatation war unter kombinierter

Blockade der Adenosinrezeptoren, COX und NOS im Vergleich zur Kontrolle stark vermindert (Adenosin 10 $\mu\text{mol/l}$, AUC Kontrolle: 1754 ± 734 , DP: 76 ± 2 , DPLI: 413 ± 314 , $n = 5$) (Tabelle 3 und Abbildung 10). Die aktive Hyperämie war unter kombinierter Blockade von Adenosinrezeptoren, COX und NOS tendenziell geringer ausgeprägt als in der Kontrolluntersuchung oder unter alleiniger Blockade der Adenosinrezeptoren. Dies erreichte allerdings nur im Extremwert der Dilatation bei aktiver Hyperämie durch tetanische Kontraktionen über 60 Sekunden das Signifikanzniveau beim Vergleich der kombinierten Blockade mit der Kontrolluntersuchung (AH 100 Hz 60 s, Kontrolle: $30 \pm 3 \mu\text{m}$, DPLI: $18 \pm 3,8 \mu\text{m}$; -40 % versus Kontrolle, $p = 0,009$; $n = 5$) (Tabelle 3 und Abbildung 11).

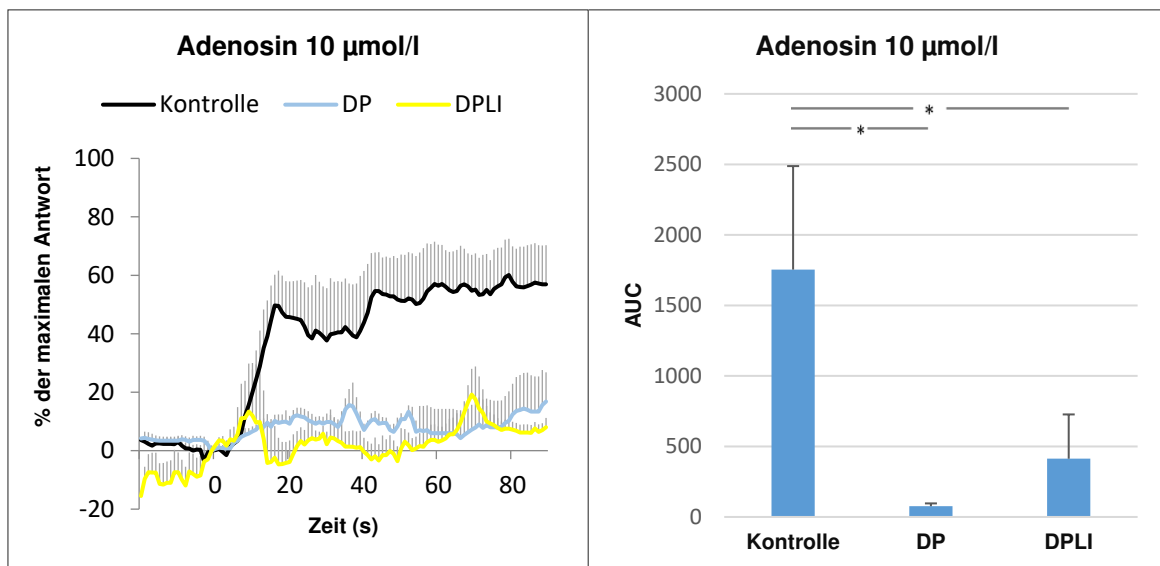


Abbildung 10: Arteriöler Durchmesser nach Applikation von Adenosin 10 $\mu\text{mol/l}$ zum Zeitpunkt 0. Es zeigte sich eine deutliche Vasodilatation, die in ihrem Extremwert und ihrer AUC nach Blockade von Adenosinrezeptoren und kombinierter Blockade von Adenosinrezeptoren, NOS und COX nahezu blockiert war. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM, signifikante Wertänderung (siehe Tabelle 3), $n = 5$.

Tabelle 3: AUC und maximale Vasodilatation (EXT, μm) nach Applikation von Acetylcholin, Adenosin und bei muskulärer Kontraktion unter Kontrollbedingungen, unter unselektiver Adenosinrezeptorblockade (DP) und unter kombinierter Blockade der Adenosinrezeptoren, der COX und der NOS (DPLI). Es zeigte sich eine tendenzielle Abschwächung der aktiven Hyperämie bei tetanischer Stimulation über 30 und 60 Sekunden durch die Enzyymblockade, außer des EXT-Wertes bei tetanischer Stimulation über 60 Sekunden unter kombinierter Enzyymblockade gegenüber der Kontrolluntersuchung erreichte sie aber kein signifikantes Ausmaß. Abgebildet ist der Mittelwert \pm SEM, * = signifikante Wertänderung versus Kontrolle.

	Kontrolle		DP		DPLI	
	AUC	EXT (μm)	AUC	EXT (μm)	AUC	EXT (μm)
Acetylcholin 1 $\mu\text{mol/l}$	576 \pm 368	19 \pm 4,7	547 \pm 214	20 \pm 3,6	431 \pm 225	14 \pm 3,3
Acetylcholin 10 $\mu\text{mol/l}$	1956 \pm 416	26 \pm 3,9	2286 \pm 665	27 \pm 4,2	1200 \pm 470	20 \pm 3,3
Adenosin 1 $\mu\text{mol/l}$	29 \pm 28	12 \pm 3,4	10 \pm 16,9	10 \pm 2,2	179 \pm 76	14 \pm 6,6
Adenosin 10 $\mu\text{mol/l}$	1754 \pm 734	24 \pm 5,4	76 \pm 21	10 \pm 1,7 * p = 0,014	413 \pm 314 * p = 0,043	17 \pm 6 * p = 0,012
10 Hz 1 s	-32 \pm 21,9	11 \pm 1,4	-36 \pm 21	8,8 \pm 1,5	-12 \pm 7,5	8 \pm 1,3
10 Hz 15 s	103 \pm 60	12 \pm 1,3	302 \pm 294	11 \pm 2,4	198 \pm 173	12 \pm 5,9
10 Hz 30 s	293 \pm 170	14 \pm 4,1	48 \pm 33	13 \pm 2,8	196 \pm 149	12 \pm 3,8
10 Hz 60 s	547 \pm 570	15 \pm 2,2	88 \pm 27	17 \pm 4	416 \pm 157	15 \pm 4,1
100 Hz 1 s	406 \pm 163	19 \pm 2,7	260 \pm 123	18 \pm 4,2	570 \pm 334	14 \pm 4,8
100 Hz 15 s	785 \pm 422	21 \pm 2,5	668 \pm 216	21 \pm 3,3	614 \pm 313	18 \pm 5
100 Hz 30 s	1709 \pm 531	31 \pm 3,5	1454 \pm 248	22 \pm 2,6	1067 \pm 477	18 \pm 4,3
100 Hz 60 s	4042 \pm 961	30 \pm 3	2301 \pm 304	24 \pm 2,9	1670 \pm 607	18 \pm 3,8 * p = 0,009
Ruhedurchmesser: Kontrolle: 12 \pm 2,8 μm , DP: 10 \pm 0,6 μm , DPLI: 6 \pm 1,3 μm Maximaler Durchmesser der Gefäßstellen: 31 \pm 3,5 μm ; n = 5						

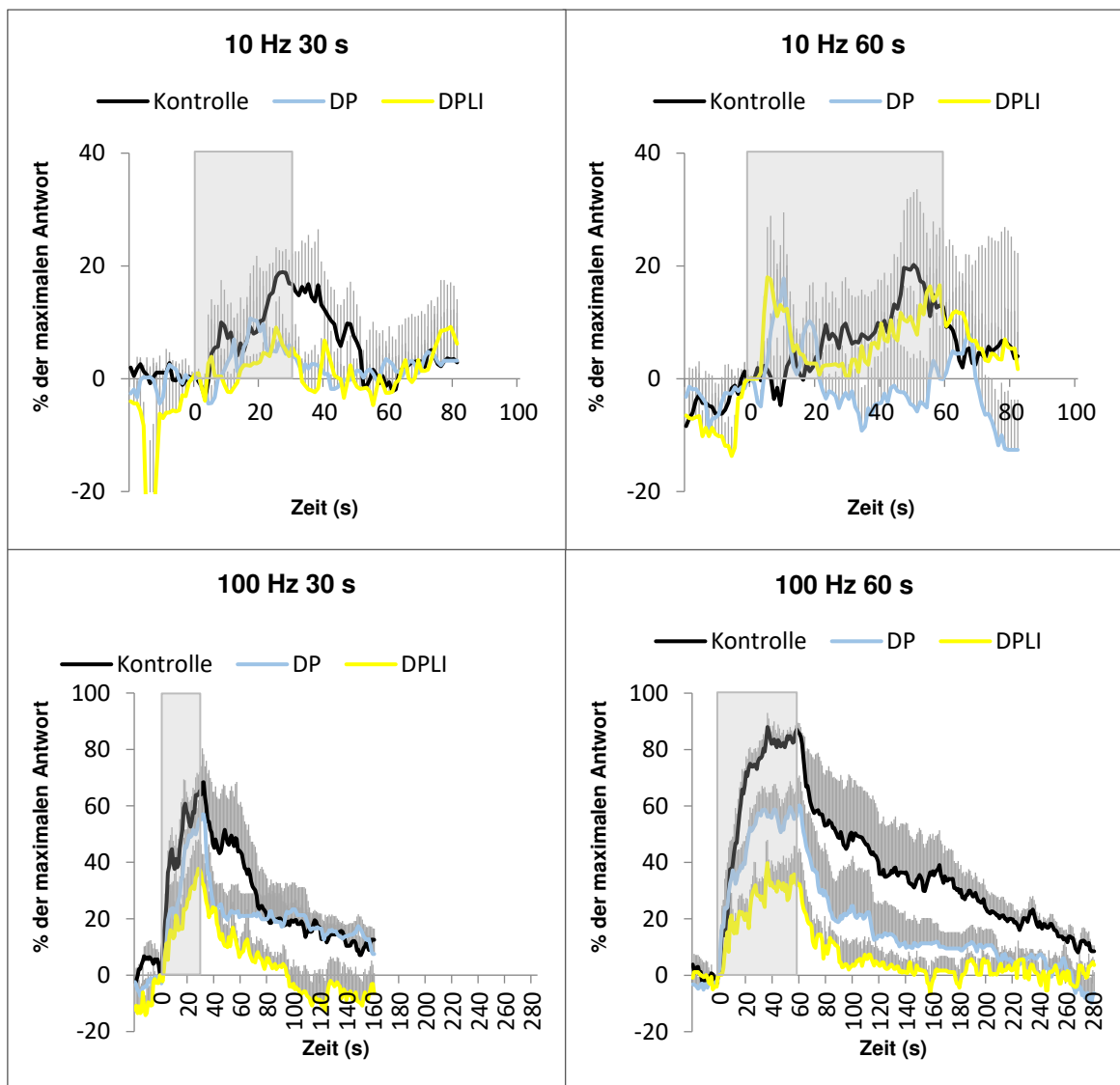


Abbildung 11: Arteriöle Durchmesser vor, während und nach tetanischen und nicht-tetanischen muskulären Kontraktionen. Es zeigte sich eine deutliche Vasodilatation, die in ihrem Maximalwert bei Stimulation mit 100Hz über 60s durch Blockade der Adenosinrezeptoren, COX und NOS vermindert wurde. Das graue Feld markiert die Dauer der elektrischen Stimulation. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM, signifikante Wertänderung (siehe Tabelle 3), n = 5.

3.4.2.3 Kombinierte Blockade von Adenosin- und ADP-Rezeptoren, COX und NOS

Aufgrund der möglichen Bildung von Adenosin durch Degradation von Adenosindiphosphat (ADP) während aktiver Hyperämie wurde der Effekt einer zusätzlichen Blockade der P₂Y-ADP-Rezeptoren (Blockade durch Pyridoxalphosphat-6-Azophenyl-2',4'-Disulfonsäure (10 µmol/l), abgekürzt als PP6)

zu bestehender Blockade von Adenosinrezeptoren, COX und NOS (abgekürzt als DPLI) getestet. Die kombinierte Blockade von P₂Y-Rezeptoren, Adenosinrezeptoren, COX und NOS (abgekürzt als DPLIPP6) ließ die Dilatation der Gefäße auf Acetylcholin unverändert (AUC nach Acetylcholin 10 µmol/l; Kontrolle: 2047 ± 229 µm, DPLI: 1520 ± 311 µm, DPLIPP6: 2142 ± 353 µm; n = 10-11) (Tabelle 4). Auch in dieser Untersuchungsreihe führte die Blockade von Adenosinrezeptoren, COX und NOS zu einer Vasokonstriktion (Kontrolle: 7 ± 0,9 µm, DPLI: 3 ± 1 µm; p = 0,011; n = 10-11). Dies entspricht einer Verengung um 57 % und der Wirkung der NOS- und COX-Blockade in den vorherigen Serien. Die zusätzliche Blockade der P₂Y-Rezeptoren änderte den Gefäßtonus nicht (DPLI: 3 ± 1 µm, DPLIPP6: 3 ± 0,5 µm; n = 10-11). Wie zuvor bereits gezeigt, reduzierte die unselektive Adenosinblockade mit Inhibition von COX und NOS die Adenosin-induzierte Dilatation deutlich. Die verbliebene Dilatation wurde durch die zusätzliche Blockade der ADP-Rezeptoren nicht verhindert (AUC Adenosin 10 µmol/l; Kontrolle: 2036 ± 214, DPLI: 746 ± 163, DPLIPP6: 578 ± 163; -23 %, p = 0,71; n = 9-11) (Abbildung 12 und Tabelle 4). Die verbliebene Vasodilatation auf Adenosin unter Adenosinrezeptorblockade ist demzufolge nicht über P₂Y-Rezeptoren vermittelt.

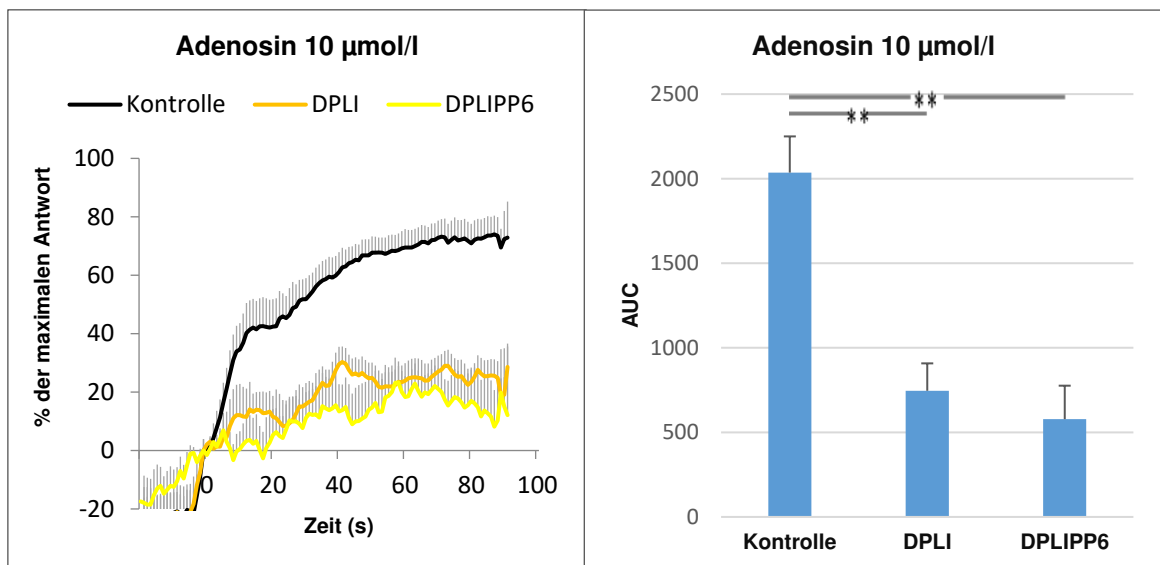


Abbildung 12: Arteriöläre Durchmesser nach Applikation von Adenosin 10 µmol/l zum Zeitpunkt 0. Es zeigte sich eine deutliche Vasodilatation, die in ihrem Extremwert und ihrer AUC nach kombinierter Blockade von Adenosinrezeptoren, NOS und COX (DPLI) deutlich abgeschwächt war. Die zusätzliche Blockade von P₂Y-Rezeptoren (DPLIPP6) minderte die Vasodilatation nach Adenosinapplikation nicht weiter. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM, signifikante Wertänderung (siehe Tabelle 4), n = 10-11.

Zur Untersuchung der Vasodilatationen, ausgelöst durch ADP, wurden diese unter Blockade der Adenosinrezeptoren, COX und NOS, und zusätzlicher P₂Y-Blockade analysiert. Die Applikation von ADP rief eine zuverlässige und starke Vasodilatation hervor, die nach kombinierter Blockade von Adenosinrezeptoren, COX und NOS deutlich reduziert war (AUC ADP 10 µmol/l; Kontrolle: 1590 ± 242, DPLI: 638 ± 208; AUC -60 %; p = 0,0010; n = 9-11). Die zusätzliche Blockade der P₂Y-Rezeptoren reduzierte die Vasodilatation nach ADP nicht weiter, weder bezüglich der AUC noch des Maximalwertes der folgenden Dilatation in signifikantem Ausmaß (AUC ADP 10 µmol/l; DPLI: 638 ± 208, DPLIPP6: 250 ± 93; -84 % versus Kontrolle, p = 0,0031; -61 % versus DPLI, p = 0,45; n = 9-11) (Abbildung 13 und Tabelle 4). Somit scheint ein Großteil der durch ADP hervorgerufenen Vasodilatation eher durch eine Degradation des ADP zu Adenosin und über die Aktivierung von Adenosinrezeptoren ausgelöst zu werden.

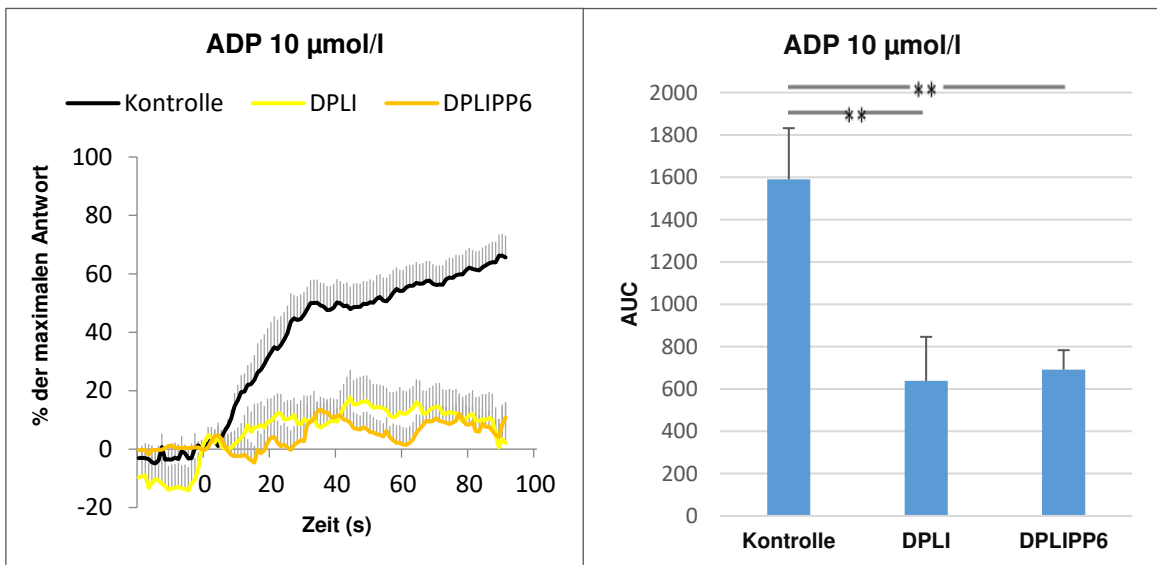


Abbildung 13: Arteriöle Durchmesser nach Applikation von Adenosindiphosphat (ADP) 10 µmol/l zum Zeitpunkt 0. Es zeigte sich eine deutliche Vasodilatation, die in ihrer AUC nach kombinierter Blockade von Adenosinrezeptoren, NOS und COX (DPLI) abgeschwächt war. Die zusätzliche Blockade von P₂Y-Rezeptoren (DPLIPP6) minderte die Vasodilatation nach ADP nicht weiter. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM, signifikante Wertänderung (siehe Tabelle 4), n = 9-11.

Aktive Hyperämie wurde durch eine zusätzliche Blockade von P₂Y-Rezeptoren zu bestehender Blockade von Adenosinrezeptoren, COX und NOS nur tendenziell gemindert, die Änderungen erreichten aber kein signifikantes Ausmaß (EXT 10 Hz 60 s; DPLI: 12 ± 1,8 µm, DPLIPP6: 8 ± 1,6 µm; -33 %; p = 0,11; n = 10-11), bei tetanischer Stimulation (z.B. über 60 Sekunden) (EXT 100 Hz 60 s; DPLI: 21 ± 1,9; DPLIPP6: 16 ± 2,3; -24 %; p = 0,06; n = 10-11 (Abbildungen 14, 15 und Tabelle 4). Die Bedeutung von ADP im Rahmen aktiver Hyperämie erscheint insbesondere in der Degradation zu Adenosin und folgenden Wirkung über Adenosinrezeptoren zu liegen. Zusätzlich ist die Wirkung von P₂Y-Rezeptoren und somit von ADP für eine maximale Ausprägung aktiver Hyperämie bedeutsam.

Tabelle 4: AUC und maximaler Durchmesser (EXT, μm) nach Applikation von Acetylcholin, Adenosin, ADP und bei muskulärer Kontraktion unter Kontrollbedingungen, unter kombinierter Blockade von Adenosinrezeptoren, NOS und COX (DPLI) und unter zusätzliche Blockade von P_2Y -Rezeptoren (DPLIPP6). Es zeigte sich eine relevante Abschwächung der durch Adenosin und ADP ausgelösten Vasodilatation im Vergleich zur Kontrolluntersuchung. Es gab keine signifikante Minderung der durch Adenosin oder ADP ausgelösten Vasodilatation durch DPLIPP6 im Vergleich zu DPLI. Weiterhin kam es zu einer deutlichen Reduktion der aktiven Hyperämie unter der kombinierten Blockade (DPLIPP6) im Vergleich zur Kontrolluntersuchung. Abgebildet ist der Mittelwert \pm SEM, * = signifikante Wertänderung versus Kontrolle = */** (* = $p < / = 0,05$, ** = $p < / = 0,005$).

	Kontrolle		DPLI		DPLIPP6	
	AUC	EXT (μm)	AUC	EXT (μm)	AUC	EXT (μm)
Acetylcholin 1 $\mu\text{mol/l}$	772 \pm 201	17 \pm 1,2	1018 \pm 249	13 \pm 1,9	1527 \pm 305	17 \pm 1,7
Acetylcholin 10 $\mu\text{mol/l}$	2047 \pm 229	23 \pm 1,2	1520 \pm 311	19 \pm 1,6	2142 \pm 353	25 \pm 1,4
Adenosin 1 $\mu\text{mol/l}$	586 \pm 182	11 \pm 4	214 \pm 107	7 \pm 1,5	145 \pm 131	5 \pm 1,8
Adenosin 10 $\mu\text{mol/l}$	2036 \pm 214	21 \pm 1,1	746 \pm 163 ** p = 0,002	13 \pm 1,6 ** p = 0,004	578 \pm 199 ** p = 0,002	11 \pm 1,8 * p = 0,008
ADP 10 $\mu\text{mol/l}$	1590 \pm 242	19 \pm 1,5	638 \pm 208 ** p = 0,0010	10 \pm 1,6 * p = 0,006	250 \pm 93 ** p = 0,0031	9 \pm 1,5 ** p = 0,001
10 Hz 1 s	2 \pm 13,8	9 \pm 1,9	19 \pm 13	4 \pm 1,3	5 \pm 4,9	4 \pm 0,8
10 Hz 15 s	91 \pm 38	9 \pm 0,8	109 \pm 36	7 \pm 1,3 p = 0,06	8 \pm 13	4 \pm 1 ** p = 0,004
10 Hz 30 s	216 \pm 59	11 \pm 1,3	237 \pm 56	10 \pm 1,9	70 \pm 27 * p = 0,016	8 \pm 1,3 * p = 0,029
10 Hz 60 s	454 \pm 105	13 \pm 1	607 \pm 155	12 \pm 1,8	192 \pm 80 * p = 0,034	8 \pm 1,6 * p = 0,021
100 Hz 1 s	107 \pm 35	15 \pm 0,8	142 \pm 49	11 \pm 1,6 * p = 0,02	91 \pm 32	9 \pm 1,4 ** p = 0,0007
100 Hz 15 s	617 \pm 103	17 \pm 13,6	969 \pm 169	14 \pm 1,5	747 \pm 328	11 \pm 2,6
100 Hz 30 s	1427 \pm 253	20 \pm 1,3	1556 \pm 300	17 \pm 1,8 * p = 0,05	1075 \pm 315	14 \pm 2,6 * p = 0,035
100 Hz 60 s	3278 \pm 396	23 \pm 1,3	3285 \pm 544	21 \pm 1,9	2338 \pm 735	16 \pm 2,3 * p = 0,017
Ruhedurchmesser: Kontrolle 7 \pm 0,9 μm , DPLI 3 \pm 1 μm , DPLIPP6 3 \pm 0,5 μm Maximaler Durchmesser der Gefäße: 25 \pm 1,3 μm , n = 6-11						

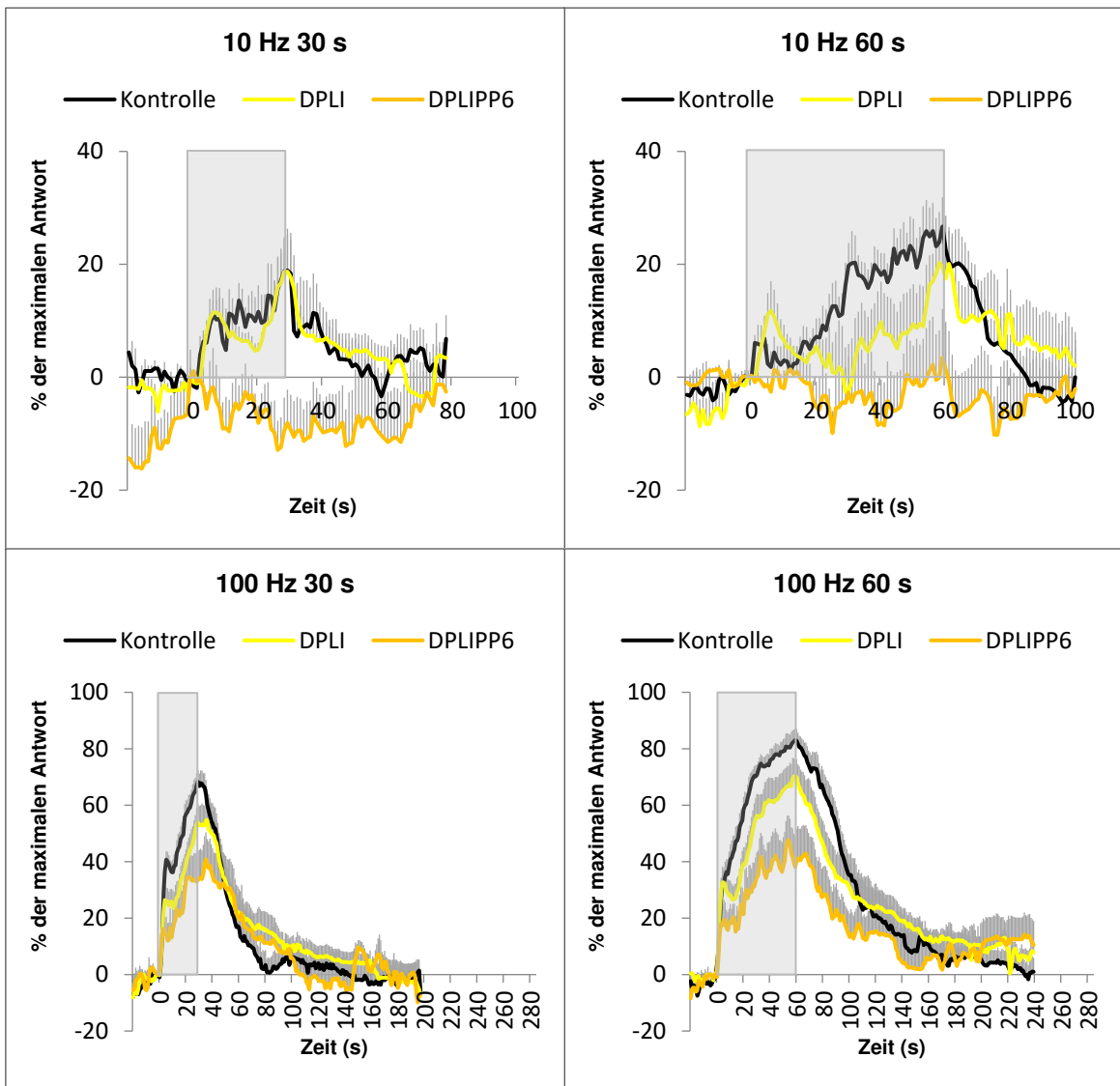


Abbildung 14: Arteriöle Durchmesser vor, während und nach tetanischen und nicht-tetanischen muskulären Kontraktionen. Es zeigte sich eine Vasodilatation, die durch die zusätzliche P_2Y -Rezeptorblockade (DPLIPP6) im Vergleich zur alleinigen kombinierten Blockade von Adenosinrezeptoren, COX und NOS (DPLI) vermindert wurde. Das graue Feld markiert die Dauer der elektrischen Stimulation. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM, signifikante Wertänderung (siehe Tabelle 4), $n = 10-11$.

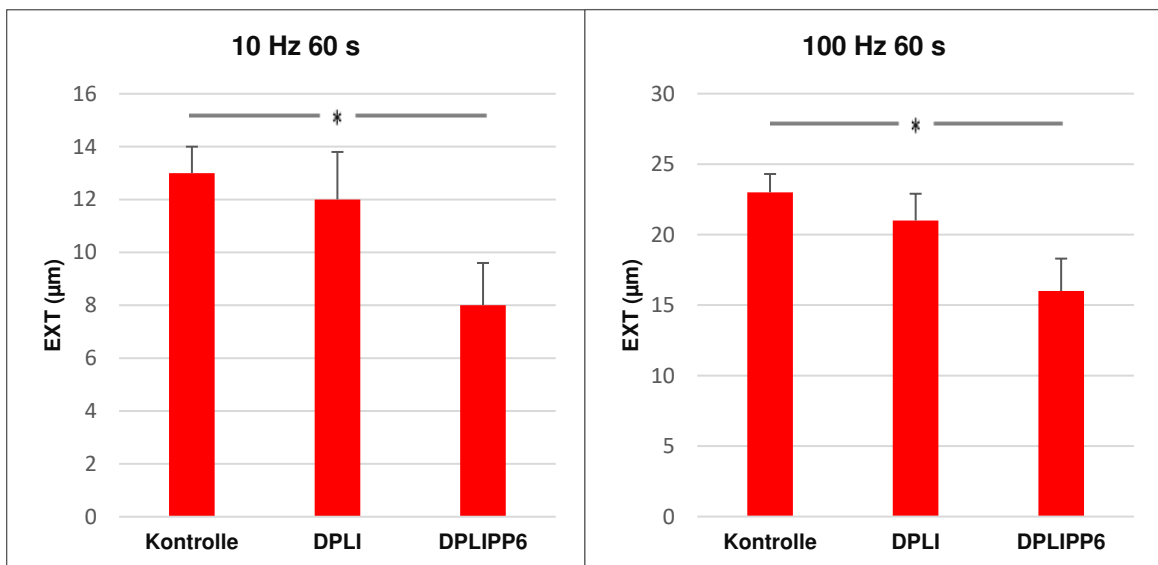


Abbildung 15: Extremwert der aktiven Hyperämie in μm bei tetanischen und nicht-tetanischen Kontraktionen über 60 Sekunden. Der Extremwert aktiver Hyperämie wurde durch die zusätzliche P_2Y -Rezeptorblockade (DPLIPP6) im Vergleich zur alleinigen kombinierten Blockade von Adenosinrezeptoren, COX und NOS (DPLI) nur tendenziell vermindert, die Änderung erreichte kein signifikantes Ausmaß. Abgebildet ist der Mittelwert \pm SEM, *=signifikante Wertänderung (siehe Tabelle 4), $n = 10-11$.

3.4.2.4 Selektive Adenosin- A_2 -Rezeptorblockade

Um den Effekt der unselektiven Adenosinrezeptorblockade weiter zu differenzieren, wurde die aktive Hyperämie unter selektiver Adenosin- A_2 -Rezeptorblockade durch 3,7 Dimethyl-1-propargylxanthine $10 \mu\text{mol/l}$ (A_2) betrachtet. A_1 - und A_3 -Rezeptoren blieben hierbei unbeeinflusst. Die Adenosin- A_2 -Rezeptorblockade schränkte Dilatationen auf Acetylcholin nicht ein (Acetylcholin $10 \mu\text{mol/l}$; Kontrolle: $21 \pm 2,2 \mu\text{m}$, A_2 : $20 \pm 2,5 \mu\text{m}$, $n = 6$) (Tabelle 5). Der arterioläre Tonus der Gefäße wurde durch die selektive Adenosin- A_2 -Rezeptorblockade nicht reduziert (Kontrolle: $8 \pm 0,7 \mu\text{m}$; A_2 : $8 \pm 2 \mu\text{m}$; $p = 0,601$; $n = 6$). Weder nach Applikation von Adenosin $1 \mu\text{mol/l}$ noch nach Applikation von Adenosin $10 \mu\text{mol/l}$ traten nach Rezeptorblockade geminderte Vasodilatationen auf (Abbildung 16 und Tabelle 5). Die Vasodilatation nach Adenosingabe wurde also entweder über einen alternativen Rezeptor vermittelt (A_1 - oder A_3 -Rezeptor) oder die Blockade des A_2 -Rezeptors wurde über einen anderen Weg kompensiert. Aufgrund der ausbleibenden Wirkung auf die Vasodilatation nach Adenosin kann auch ein unzureichender Effekt der selektiven

Adenosinrezeptorblockade nicht ausgeschlossen werden. Auch aktive Hyperämie war nach Applikation des Antagonisten nicht vermindert (Tabelle 5 und Abbildung 17).

3.4.2.5 Selektive Adenosin-A₂-Rezeptorblockade und Blockade der COX und NOS

Auch die kombinierte Blockade von A₂-Rezeptor, COX und NOS (A2LI) minderte die Vasodilatation auf Acetylcholin nicht (10 µmol; Kontrolle: 21 ± 2,2 µm; A2LI: 22 ± 1,9 µm, n = 6) (Tabelle 5). Der arterioläre Tonus der Gefäße wurde durch die kombinierte Blockade von A₂-Rezeptoren, COX und NOS im Vergleich zur Kontrolluntersuchung zwar tendenziell ähnlich (wie bei alleiniger COX- und NOS-Blockade) erhöht (Kontrolle: 8 ± 0,7 µm; A2: 8 ± 2 µm, n = 5; A2LI: 4 ± 1,3 µm; -50 %, p = 0,06; n = 6), dieser Effekt blieb allerdings unterhalb des Signifikanzniveaus. Durch Adenosin ausgelöste Vasodilatationen wurden durch die kombinierte Blockade des A₂-Rezeptors, der COX und der NOS nicht gemindert (Abbildung 16 und Tabelle 5). Die aktive Hyperämie wurde durch die kombinierte Blockade zwar nicht in ihrer AUC, aber zum Teil in ihrem Maximalwert, insbesondere bei Kontraktionen über kürzeren Zeitraum, gemindert (Abbildung 17 und Tabelle 5). Die kombinierte Blockade zeigt, dass ein Ausfall des A₂-Adenosinrezeptors nicht lediglich durch NO oder Prostaglandine kompensiert wird, sondern dass der A₂-Rezeptor entweder nicht an adenosinvermittelten Dilatationen und aktiver Hyperämie beteiligt ist oder der Antagonist keinen ausreichenden Effekt hatte.

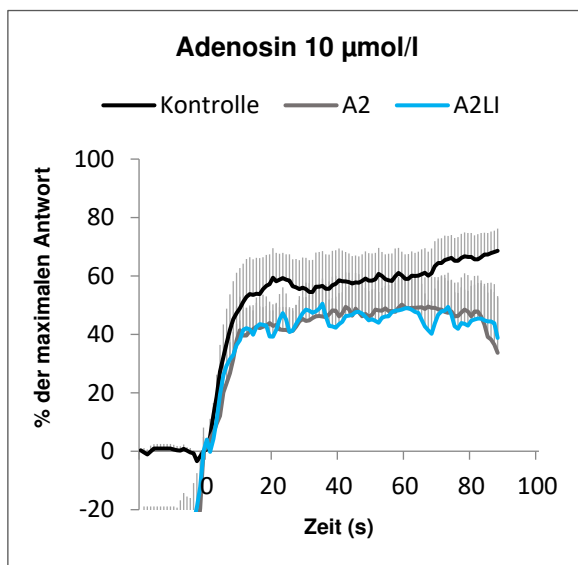


Abbildung 16: Arteriöläre Durchmesser nach Applikation von Adenosin 10 µmol/l zum Zeitpunkt 0. Es zeigte sich eine deutliche Vasodilatation, die in ihrem Extremwert und ihrer AUC nach Blockade von Adenosin-A₂-Rezeptoren und kombinierter Blockade von Adenosin-A₂-Rezeptoren, NOS und COX nicht abgeschwächt war. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM, n = 6.

Tabelle 5: AUC und maximale Vasodilatation (EXT, μm) nach Applikation von Acetylcholin, Adenosin und bei muskulärer Kontraktion unter Kontrollbedingungen, unter selektiver Adenosinrezeptorblockade (A2) und unter kombinierter Blockade der Adenosin-A₂-Rezeptoren, der COX und der NOS (A2LI). Es zeigte sich keine relevante Abschwächung der aktiven Hyperämie durch die Enzymblockade, außer des EXT-Wertes bei tetanischer Stimulation über 30 Sekunden unter kombinierter Enzymblockade gegenüber der Kontrolluntersuchung. Abgebildet ist der Mittelwert \pm SEM, * = signifikante Wertänderung versus Kontrolle-

	Kontrolle		A2		A2LI	
	AUC	EXT (μm)	AUC	EXT (μm)	AUC	EXT (μm)
Acetylcholin 1 $\mu\text{mol/l}$	715 \pm 278	17 \pm 2,8	1112 \pm 353	18 \pm 33	1869 \pm 498	12 \pm 2,8 * p = 0,07
Acetylcholin 10 $\mu\text{mol/l}$	1599 \pm 359	21 \pm 2,2	1540 \pm 303	20 \pm 2,5	1966 \pm 305	22 \pm 1,9
Adenosin 1 $\mu\text{mol/l}$	326 \pm 164	11 \pm 2,1	144 \pm 66	762 \pm 261	324 \pm 136	7 \pm 1,9
Adenosin 10 $\mu\text{mol/l}$	980 \pm 271	16 \pm 2,1	8 \pm 0,6	12 \pm 1,8	873 \pm 244	12 \pm 2,3
10 Hz 1 s	-9 \pm 18,3	9 \pm 0,9	18 \pm 2,7	8 \pm 1,6	27 \pm 20,7	4 \pm 1,8
10 Hz 15 s	66 \pm 42	11 \pm 1,1	54 \pm 25	7 \pm 1,2	23 \pm 9,2	2 \pm 0,5 ** p = 0,0048
10 Hz 30 s	236 \pm 168	9 \pm 1,5	92 \pm 58	8 \pm 1,2	36 \pm 26	4 \pm 1,3
10 Hz 60 s	574 \pm 315	11 \pm 2,2	190 \pm 124	9 \pm 1,8	468 \pm 180	12 \pm 2,4
100 Hz 1 s	325 \pm 160	14 \pm 2,4	247 \pm 104	15 \pm 2	261 \pm 140	11 \pm 2,5 * p = 0,003
100 Hz 15 s	1201 \pm 515	19 \pm 2,1	764 \pm 162	17 \pm 2,5	1678 \pm 674	18 \pm 2,1
100 Hz 30 s	1676 \pm 502	21 \pm 2,1	2549 \pm 672	22 \pm 3,1	1788 \pm 501	17 \pm 2,1 * p = 0,013
100 Hz 60 s	4143 \pm 1799	23 \pm 2,2	6641 \pm 1893	26 \pm 3,4	5552 \pm 1097	20 \pm 2
Ruhedurchmesser: Kontrolle 8 \pm 0,7 μm , A2 8 \pm 2 μm , A2LI 4 \pm 1,4 μm Maximaler Durchmesser der Gefäßstellen: 30 \pm 3 μm , n = 6-18						

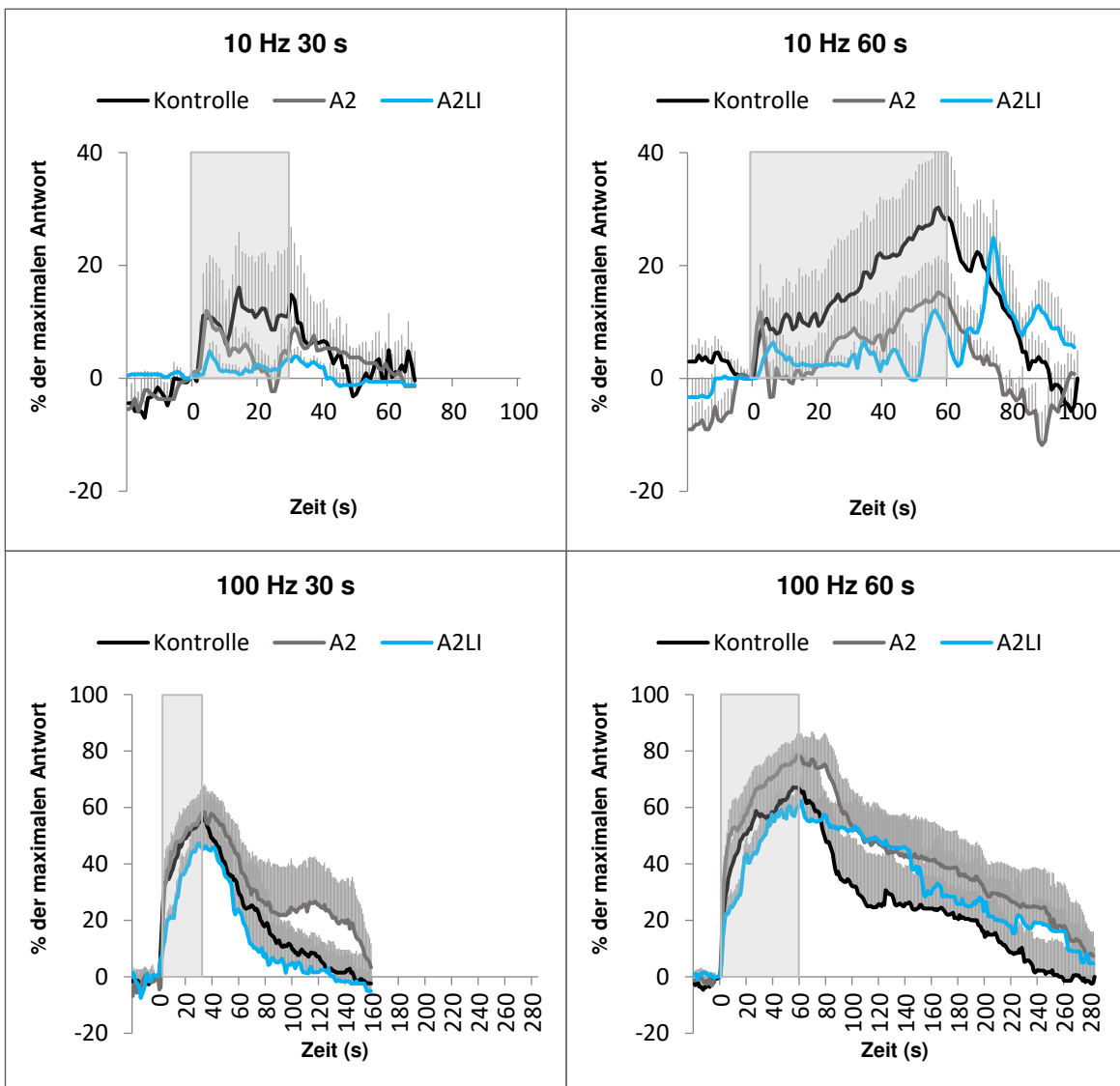


Abbildung 17: Arteriöle Durchmesser vor, während und nach tetanischen und nicht-tetanischen muskulären Kontraktionen. Es zeigte sich eine deutliche Vasodilatation, die in ihrem Maximalwert bei Stimulation mit 100 Hz über 30 s nach kombinierter Blockade versus Kontrolle vermindert war. Das graue Feld markiert die Dauer der elektrischen Stimulation. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM, signifikante Wertänderung (siehe Tabelle 5), $n = 6$.

3.4.3 Blockade des K_{ATP} -Kanals

Aufgrund des in der Literatur beschriebenen inhibierenden Effektes einer K_{ATP} -Kanal-Blockade auf durch Adenosin vermittelte Vasodilatationen, wurde der Effekt dieser Blockade auf die aktive Hyperämie untersucht. Die K_{ATP} -Kanal-Blockade (Glibenclamid 10 $\mu\text{mol/l}$, abgekürzt mit „G“) steigerte den Ruhetonus der

betrachteten GefäÙe leicht, der Effekt erreichte aber keine statistische Signifikanz (EXT; Kontrolle: $20 \pm 2,1 \mu\text{m}$, G: $13 \pm 2 \mu\text{m}$, -35 %; $p = 0,266$; $n = 15-16$). Die durch Acetylcholin hervorgerufene Vasodilatation wurde in ihrem Extremwert leicht reduziert (EXT; Acetylcholin $10 \mu\text{mol/l}$: Von Kontrolle: $26 \pm 1,4 \mu\text{m}$ auf G: $20 \pm 2,3 \mu\text{m}$, -23 %; $p = 0,012$; $n = 15-16$) (Abbildung 18 und Tabelle 6).

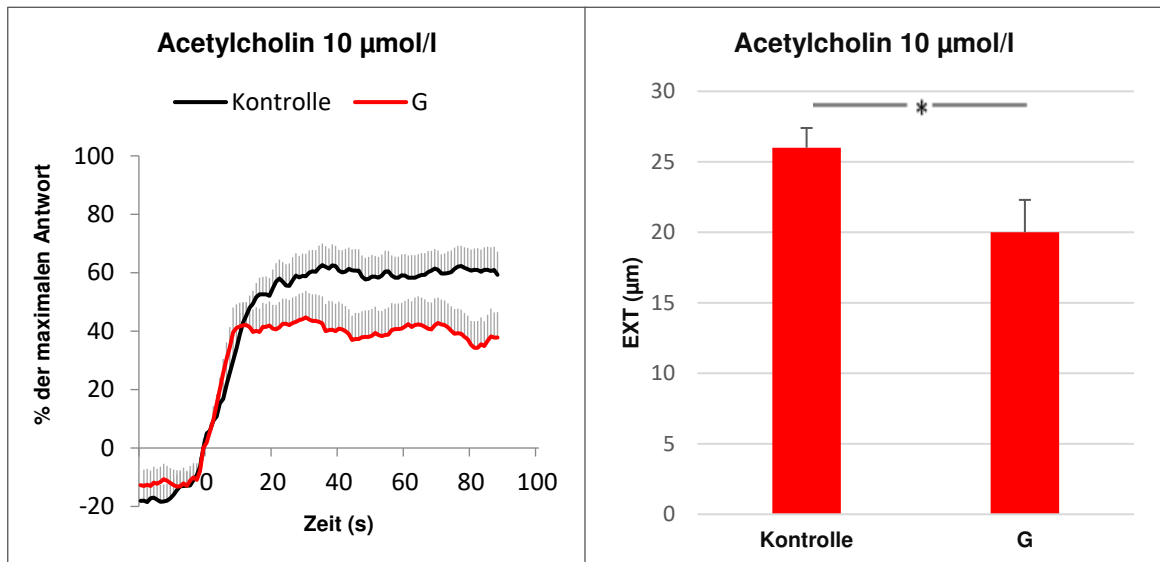


Abbildung 18: Arterielle Durchmesser nach Applikation von Acetylcholin $10 \mu\text{mol/l}$ zum Zeitpunkt 0. Es zeigte sich eine deutliche Vasodilatation, die in ihrer maximalen Antwort nach Blockade des K_{ATP} -Kanals abgeschwächt war. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Abgebildet ist der Mittelwert + bzw. \pm SEM, signifikante Wertänderung (siehe Tabelle 6), $n = 15-16$.

Die K_{ATP} -Kanal-Blockade minderte die nach Adenosinapplikation auftretende Vasodilatation deutlich stärker als die durch Acetylcholin hervorgerufene (EXT; Adenosin $10 \mu\text{mol/l}$; Kontrolle: $21 \pm 1,4 \mu\text{m}$, G: $14 \pm 2 \mu\text{m}$, -33 %; $p = 0,002$; $n = 15-16$) (Abbildung 19 und Tabelle 6).

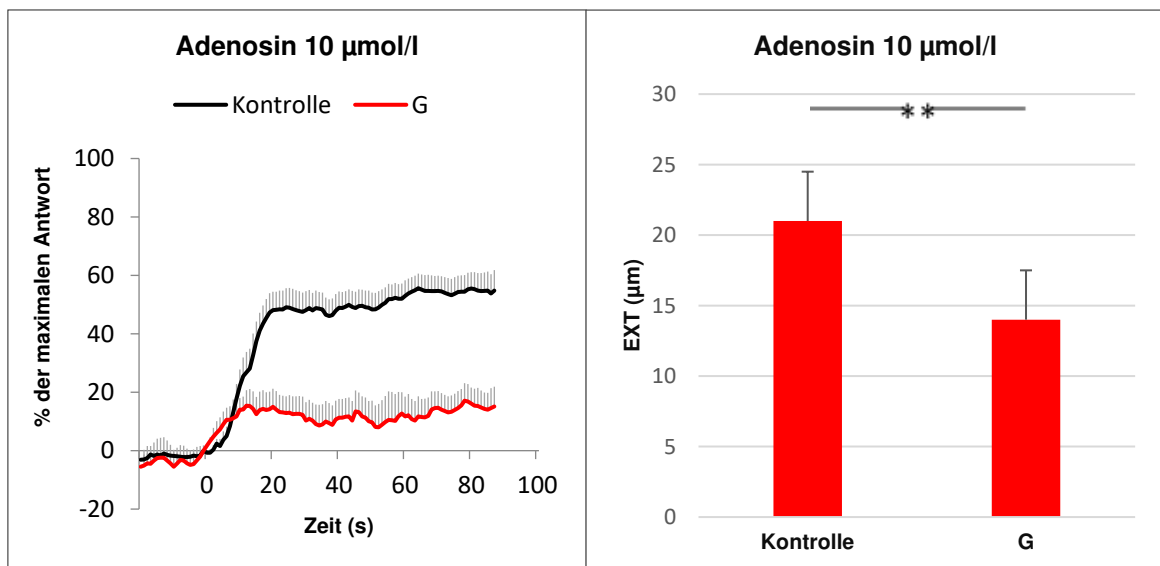


Abbildung 19: Arteriöle Durchmesser nach Applikation von Adenosin 10 µmol/l zum Zeitpunkt 0. Es zeigte sich eine deutliche Vasodilatation, die in ihrem Extremwert nach Blockade des K_{ATP}-Kanals (G) abgeschwächt war. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Abgebildet ist der Mittelwert + bzw. ± SEM, signifikante Wertänderung (siehe Tabelle 6), n = 15-16.

Die AUC aktiver Hyperämie blieb durch eine Blockade des K_{ATP}-Kanals sowohl bei tetanischen als auch bei nicht-tetanischen Kontraktionen unbeeinflusst (Tabelle 6). Die maximalen Gefäßdiameter während aktiver Hyperämie wurden zwar durchgehend deutlich reduziert (Abbildung 20 und Tabelle 6), diese Reduktion erreichte aber nur bei tetanischen Kontraktionen über 15 und 30 Sekunden das Signifikanzniveau (Tabelle 6). Der K_{ATP}-Kanal hat somit eine Funktion im Rahmen der aktiven Hyperämie und trägt durch seine Aktivierung teilweise zur Dilatation bei.

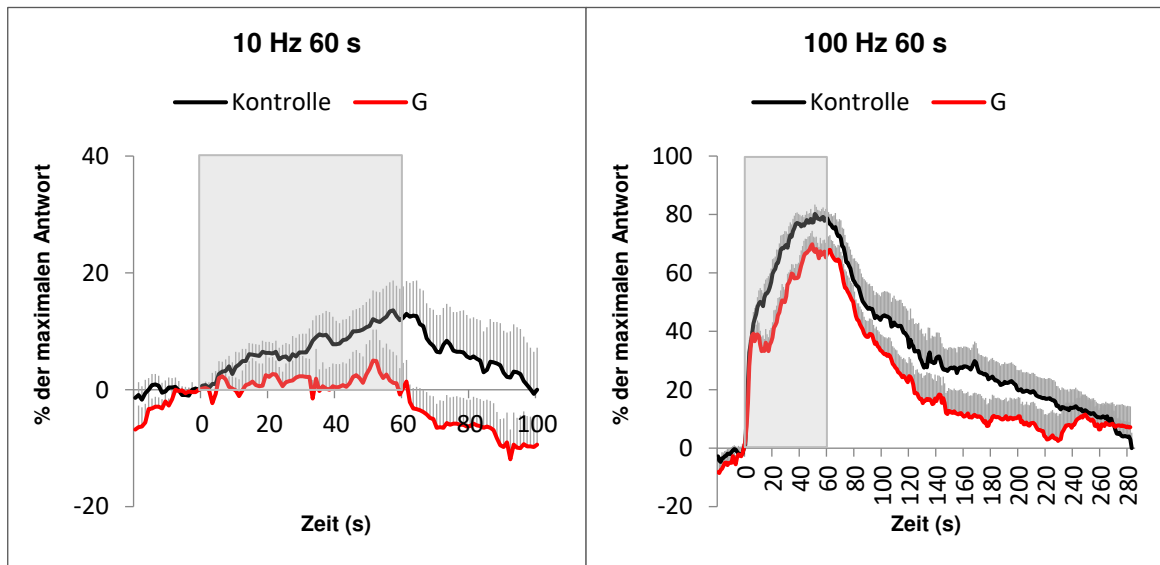


Abbildung 20: Arteriöläre Durchmesser vor, während und nach tetanischen und nicht-tetanischen muskulären Kontraktionen. Es zeigte sich eine deutliche Vasodilatation, die durch Blockade des K_{ATP}-Kanals (G) nicht in signifikantem Ausmaß vermindert wurde. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Das graue Feld markiert die Dauer der elektrischen Stimulation. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM, n = 15-16.

Tabelle 6: AUC und maximaler Durchmesser (EXT, μm) nach Applikation von Acetylcholin, Adenosin und bei muskulärer Kontraktion unter Kontrollbedingungen und unter Blockade des K_{ATP} -Kanals (G). Es zeigte sich eine Abschwächung der Vasodilatation nach Applikation von Acetylcholin und Adenosin und eine Minderung des Maximalwertes aktiver Hyperämie bei tetanischen Kontraktionen über 15 und 30 Sekunden durch die Blockade des K_{ATP} -Kanals. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Abgebildet ist der Mittelwert \pm SEM, * = signifikante Wertänderung versus Kontrolle (* = $p < / = 0,05$, ** = $p < / = 0,005$).

	Kontrolle		G	
	AUC	EXT (μm)	AUC	EXT (μm)
Acetylcholin 1 $\mu\text{mol/l}$	1023 \pm 240	20 \pm 2,1	466 \pm 208	13 \pm 2 * p = 0,019
Acetylcholin 10 $\mu\text{mol/l}$	2411 \pm 283	26 \pm 1,4	1810 \pm 353	20 \pm 2,3 * p = 0,012
Adenosin 1 $\mu\text{mol/l}$	337 \pm 101	13 \pm 1,6	124 \pm 95	7 \pm 1,3 ** p = 0,003
Adenosin 10 $\mu\text{mol/l}$	1824 \pm 215	21 \pm 1,4	733 \pm 265 ** p < 0,001	14 \pm 2 ** p = 0,0002
10 Hz 15 s	35 \pm 13,3	9 \pm 1,2	112 \pm 49	8 \pm 1,5
10 Hz 30 s	101 \pm 33	10 \pm 1,5	97 \pm 49	6 \pm 1,1
10 Hz 60 s	433 \pm 225	12 \pm 2,2	161 \pm 68	8 \pm 1,4
100 Hz 1 s	284 \pm 110	17 \pm 1,5	391 \pm 113	13 \pm 1,4
100 Hz 15 s	829 \pm 141	21 \pm 1,6	847 \pm 164	17 \pm 1,2 * p = 0,029
100 Hz 30 s	1984 \pm 300	24 \pm 1,4	1663 \pm 305	20 \pm 1,4 * p = 0,044
100 Hz 60 s	5019 \pm 1046	26 \pm 1,4	3524 \pm 443	25 \pm 1,5
Ruhedurchmesser: Kontrolle: 20 \pm 2,1 μm , G: 13 \pm 2 μm Maximaler Durchmesser der Gefäßstellen: 29 \pm 1,3 μm , n = 15-16				

3.4.3.1 Kombinierte Blockade des K_{ATP} -Kanals, der COX und der NOS

Ergänzend zu der K_{ATP} -Kanal-Blockade erfolgte eine zusätzliche Inhibierung der COX und NOS, um einen die K_{ATP} -Blockade eventuell kompensierenden Effekt durch NO und Prostaglandine erkennen zu können. Die kombinierte Blockade des K_{ATP} -Kanals, der COX und NOS (GLI) steigerte den Ruhetonus weder gegenüber der alleinigen K_{ATP} -Blockade (G) noch gegenüber der Kontrolluntersuchung (K: 6 \pm 1,7 μm , G: 4,9 \pm 1,2 μm , GLI: 2 \pm 0,5 μm ; -67 % versus Kontrolle p = 0,06; n = 5). Dies verwundert in Anbetracht des tendenziell steigenden Effekts der COX- und

NOS-Blockade (vergleiche 3.4.1) oder der kombinierten Blockade des K_{ATP} -Kanals und der COX (vergleiche 3.4.3.3) auf den Ruhetonus. Die Vasodilatation nach Acetylcholinapplikation wurde innerhalb der Versuchsserie mit Hemmung des K_{ATP} -Kanals, der COX und NOS (N = 5) (im Gegensatz zur Gesamtbetrachtung aller Versuche mit inhibiertem K_{ATP} -Kanal (n = 15-16)) nicht vermindert, die Fähigkeit der Gefäße zu dilatieren wurde also nicht eingeschränkt. Die Vasodilatation nach Adenosinapplikation 10 $\mu\text{mol/l}$ wurde in ihrer AUC deutlich vermindert, (AUC Adenosin 10 $\mu\text{mol/l}$; Kontrolle: 2067 ± 454 , G: 1307 ± 645 , GLI: 870 ± 248 ; -58 %; $p = 0,028$; n = 5) (Abbildung 21).

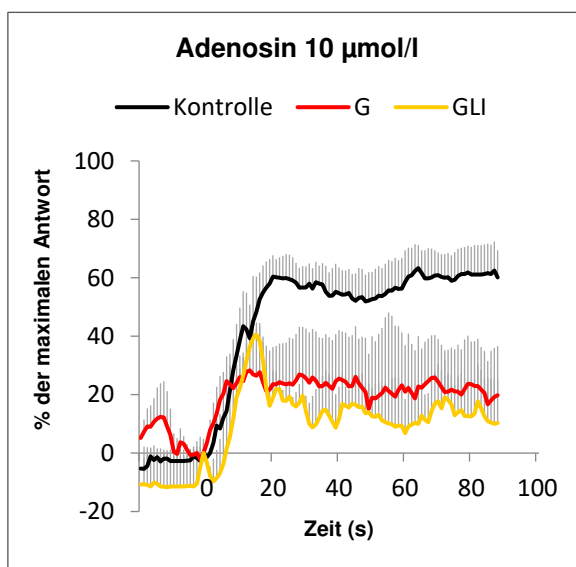


Abbildung 21: Arteriöle Durchmesser nach Applikation von Adenosin 10 $\mu\text{mol/l}$ zum Zeitpunkt 0. Es zeigte sich eine deutliche Vasodilatation, die in ihrer AUC nach Blockade des K_{ATP} -Kanals, der COX und NOS (GLI) abgeschwächt war. Die kombinierte Blockade des K_{ATP} -Kanals mit COX und NOS (GLI) minderte sie gegenüber der K_{ATP} -Kanalblockade (G) nicht zusätzlich. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM, signifikante Wertänderung (siehe Tabelle 7), n = 5.

Die kombinierte Blockade des K_{ATP} -Kanals, der COX und NOS minderte die aktive Hyperämie deutlich. Unter kombinierter Blockade war sowohl die AUC als auch der Extremwert nach tetanischer und nicht-tetanischer Stimulation (mit Ausnahme der aktiven Hyperämie bei nicht-tetanischer Stimulation über 15 s und tetanischer Stimulation über 1 s) stark vermindert (Z.B. 100 Hz 60 s AUC Kontrolle: 6583 ± 2348 , G: 2922 ± 841 (-56 %, $p = 0,34$), GLI: 648 ± 490 (-90 % versus Kontrolle, $p = 0,028$) und 100 Hz 60 s EXT Kontrolle: $26 \pm 3,4 \mu\text{m}$, G: $22 \pm 2,8 \mu\text{m}$ (-15 %, $p = 0,33$), GLI: $10 \pm 3,1 \mu\text{m}$ (-62 % versus Kontrolle, $p = 0,031$)) (Abbildungen 22, 23 und Tabelle 7). Auffällig ist, dass insbesondere die Dilatation während der muskulären Stimulation abgeschwächt wurde und daher besonders die aktive Hyperämie bei längerer Stimulation (60 s) drastisch reduziert war. Es fand kein

Anstieg des Gefäßdiameters zu einem Maximum am Ende der Stimulationszeit mehr statt.

*Tabelle 7: AUC und maximale Vasodilatation (EXT, μm) nach Applikation von Acetylcholin, Adenosin und bei muskulärer Kontraktion unter Kontrollbedingungen, unter Blockade des K_{ATP} -Kanals (G) und unter kombinierter Blockade des K_{ATP} -Kanals, der COX und der NOS (GLI). Die Messungen erfolgten innerhalb einer Versuchsserie in denselben Gefäßen. Es zeigte sich eine relevante Abschwächung der aktiven Hyperämie insbesondere nach kombinierter Blockade. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Abgebildet ist der Mittelwert \pm SEM, * = signifikante Wertänderung versus Kontrolle.*

	Kontrolle		G		GLI	
	AUC	EXT (μm)	AUC	EXT (μm)	AUC	EXT (μm)
Acetylcholin 1 $\mu\text{mol/l}$	762 \pm 494	16 \pm 3,3	1039 \pm 546	16 \pm 3,8	928 \pm 537	10 \pm 4,3
Acetylcholin 10 $\mu\text{mol/l}$	2080 \pm 296	24 \pm 1,9	2118 \pm 779	20 \pm 4,9	1750 \pm 614	20 \pm 2,5
Adenosin 1 $\mu\text{mol/l}$	424 \pm 203	17 \pm 2,3	338 \pm 275	11 \pm 3	554 \pm 228	10 \pm 2,9
Adenosin 10 $\mu\text{mol/l}$	2067 \pm 454	21 \pm 3,3	1307 \pm 645	18 \pm 3,1	870 \pm 248 * p = 0,026	15 \pm 1,5
10 Hz 15 s	41 \pm 32	7 \pm 2,5	134 \pm 120	6 \pm 4	0 \pm 0,9	1 \pm 1,3
10 Hz 30 s	110 \pm 74	8 \pm 2,2	148 \pm 130	5 \pm 2,4 * p = 0,01	1 \pm 0,8	1 \pm 0,3 * p = 0,045
10 Hz 60 s	78 \pm 25	7 \pm 1,8	34 \pm 17	5 \pm 1,6	11 \pm 6,6 *	1 \pm 0,4 * p = 0,045
100 Hz 1 s	243 \pm 88	16 \pm 1,4	518 \pm 208	15 \pm 1,5	112 \pm 51	8 \pm 3,5
100 Hz 15 s	890 \pm 243	19 \pm 2,6	664 \pm 308	15 \pm 1,7	321 \pm 220	8 \pm 3 * p = 0,041
100 Hz 30 s	2190 \pm 2769	23 \pm 3	1803 \pm 857	17 \pm 1,7	550 \pm 291 * p = 0,005	13 \pm 2,3 * p = 0,018
100 Hz 60 s	6583 \pm 2348	26 \pm 3,4	2922 \pm 841	22 \pm 2,8	648 \pm 490 * p = 0,028	10 \pm 3,1 * p = 0,009
Ruhedurchmesser: K: 6 \pm 1,7 μm , G: 4,9 \pm 1,2 μm , GLI: 2 \pm 0,5 μm						
Maximaler Durchmesser der Gefäßstellen: 27 \pm 2,8 μm , n = 5						

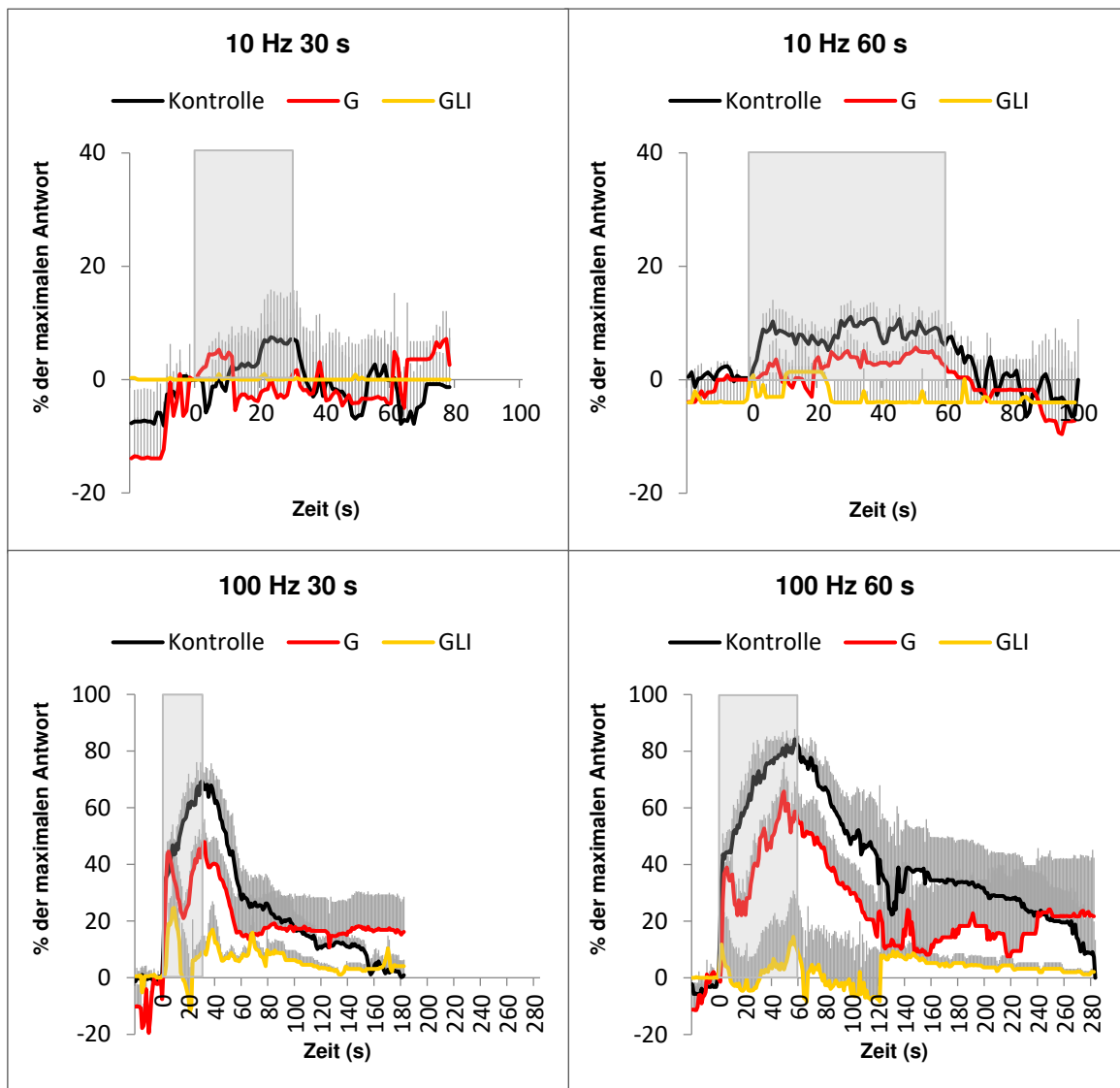


Abbildung 22: Arteriöläre Durchmesser vor, während und nach tetanischen und nicht-tetanischen muskulären Kontraktionen. Es zeigte sich eine Vasodilatation, die durch die kombinierte Enzymblockade vermindert wurde. Das graue Feld markiert die Dauer der elektrischen Stimulation. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM, signifikante Wertänderung (siehe Tabelle 7), $n = 5$.

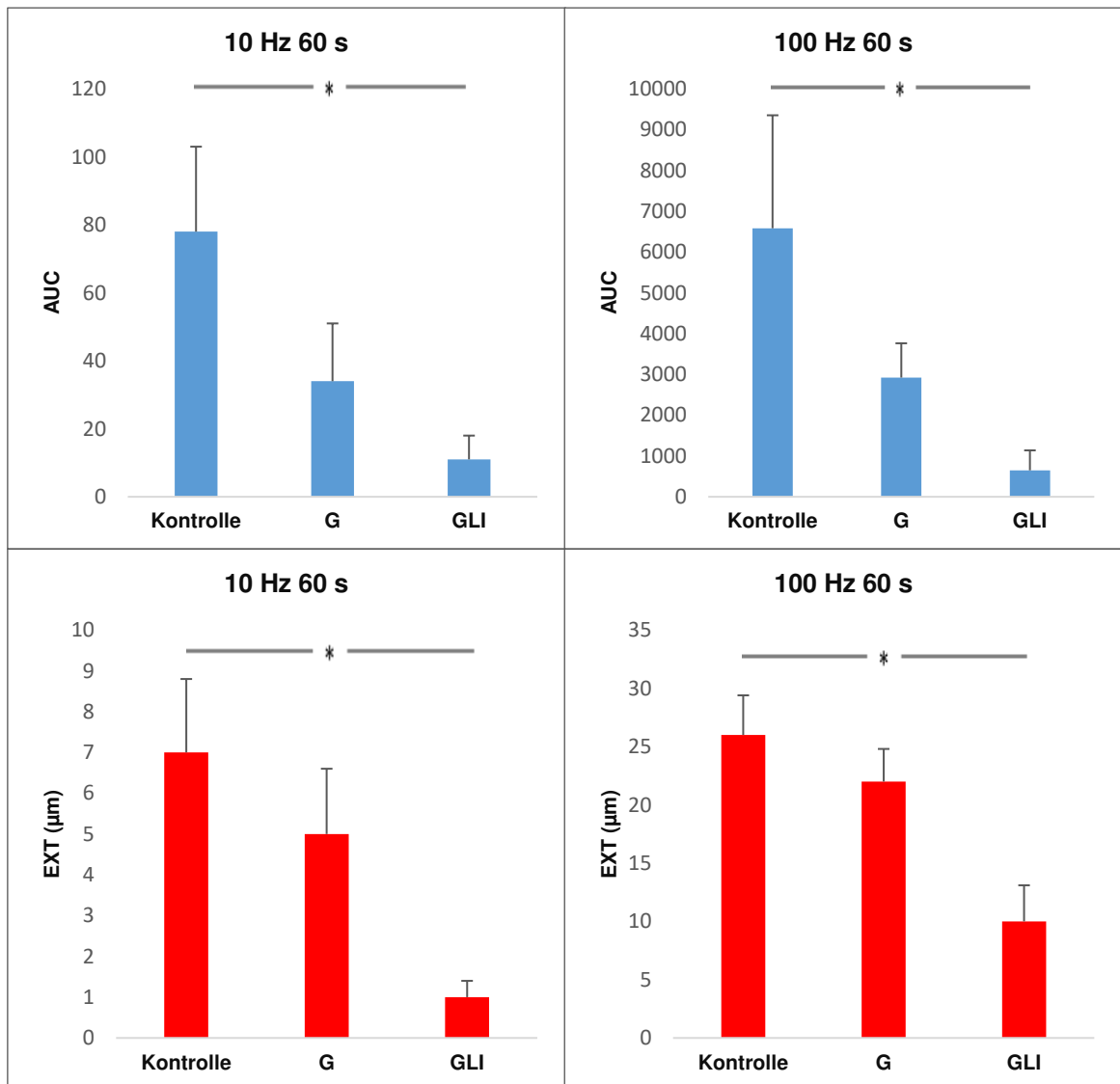


Abbildung 23: AUC (blau) und Maximalwert (EXT, rot) der aktiven Hyperämie. Die Messungen erfolgten innerhalb einer Versuchsserie in denselben Gefäßen. Es zeigte sich eine Vasodilatation, die durch die kombinierte Enzymblockade vermindert wurde. Abgebildet ist der Mittelwert \pm SEM, *=signifikante Wertänderung (siehe Tabelle 7), $n = 5$.

3.4.3.2 Kombinierte Blockade des K_{ATP} -Kanals und der NOS

Zur weiteren Differenzierung des deutlichen Effekts der kombinierten Blockade des K_{ATP} -Kanals, der NOS und COX erfolgte eine erneute Untersuchung einerseits der kombinierten Blockade von entweder K_{ATP} -Kanal und NOS und andererseits K_{ATP} -Kanal und COX. Die kombinierte Blockade des K_{ATP} -Kanals und der NOS minderte die Vasodilatation nach Applikation von Acetylcholin 10 μmol nicht (Tabelle 8). Der Ruhetonus der Gefäße wurde durch die kombinierte Inhibition von K_{ATP} -Kanal und NOS (GLI) gegenüber dem Ruhezustand und gegenüber der alleinigen Blockade des K_{ATP} -Kanals tendenziell erhöht, dies erreichte aber nicht das Signifikanzniveau (Kontrolle: $7 \pm 1,4 \mu\text{m}$, G: $5 \pm 0,9 \mu\text{m}$ (-29 %, $p = 0,474$), GL: $4 \pm 1,1 \mu\text{m}$ (-43 % versus Kontrolle, $p = 0,072$ und -20 % versus G, $p = 0,18$), $n = 5$). Wie zuvor wurden Vasodilatationen nach Adenosinapplikation nach K_{ATP} -Kanal-Blockade deutlich reduziert (Abbildung 24 und Tabelle 8).

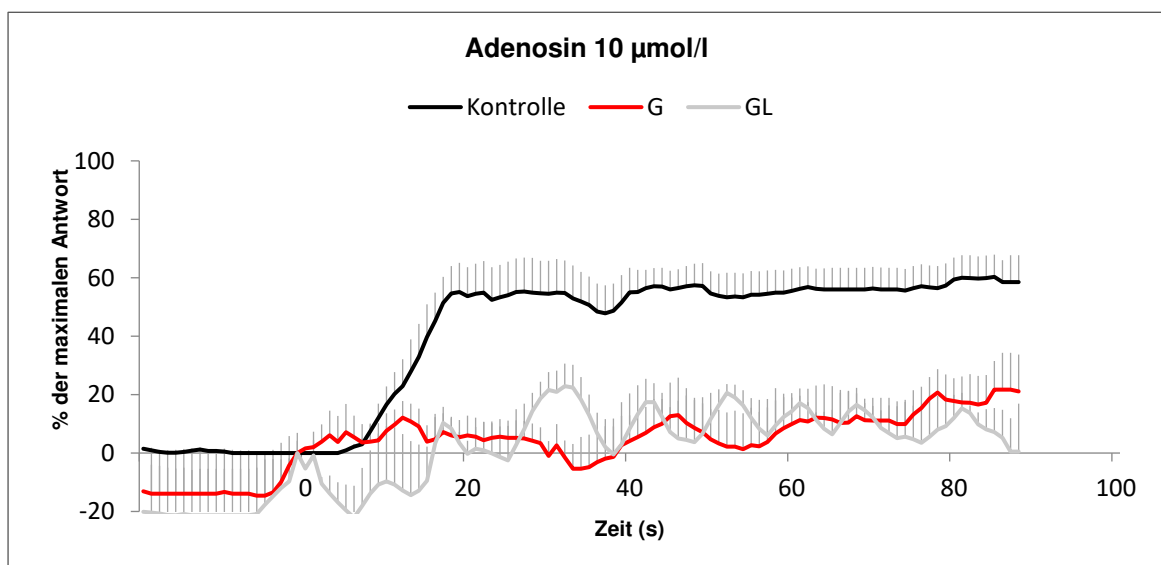


Abbildung 24: Arteriöläre Durchmesser nach Applikation von Adenosin 10 $\mu\text{mol/l}$ zum Zeitpunkt 0. Es zeigte sich eine deutliche Vasodilatation, die nach Blockade des K_{ATP} -Kanals (G) abgeschwächt war. Die kombinierte Blockade des K_{ATP} -Kanals mit einer Blockade der NOS (GL) minderte sie nicht zusätzlich. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM, signifikante Wertänderung (siehe Tabelle 8), $n = 5$.

Die aktive Hyperämie wurde durch die kombinierte Blockade des K_{ATP} -Kanals und der NOS bei tetanischer Stimulation über 30 Sekunden vermindert (EXT Kontrolle: $22 \pm 1,8 \mu\text{m}$, G: $19 \pm 1,9 \mu\text{m}$, GL: $11 \pm 0,9 \mu\text{m}$ (-50 % versus Kontrolle, $p = 0,04$, n

= 5) (Abbildung 25 und Tabelle 8). Bei tetanischer Stimulation minderte die zusätzliche Blockade der NOS zu bestehender Blockade des K_{ATP} -Kanals die aktive Hyperämie tendenziell (-35 % bei 100 Hz 60 s, EXT Kontrolle: $25 \pm 1,8 \mu\text{m}$, G: $23 \pm 2,1 \mu\text{m}$, GL: $15 \pm 4 \mu\text{m}$, $n = 5$), dieser Effekt erreichte aber nicht das Signifikanzniveau ($p = 0,21$).

*Tabelle 8: AUC und maximale Vasodilatation (EXT, μm) nach Applikation von Acetylcholin, Adenosin und bei muskulärer Kontraktion unter Kontrollbedingungen, unter Blockade des K_{ATP} -Kanals (G) und unter kombinierter Blockade des K_{ATP} -Kanals und der NOS (GL). Es zeigte sich eine Minderung des EXT-Wertes bei tetanischer Stimulation über 30 Sekunden unter kombinierter Enzymblockade gegenüber der Kontrolluntersuchung. Abgebildet ist der Mittelwert \pm SEM, * = signifikante Wertänderung versus Kontrolle (* = $p < / = 0,05$, ** = $p < / = 0,005$).*

	Kontrolle		G		GL	
	AUC	EXT (μm)	AUC	EXT (μm)	AUC	EXT (μm)
Acetylcholin 1 $\mu\text{mol/l}$	733 \pm 353	16 \pm 3,8	203 \pm 176	9 \pm 3,4	217 \pm 200	8 \pm 3 * $p = 0,03$
Acetylcholin 10 $\mu\text{mol/l}$	2569 \pm 349	11 \pm 3,6	1769 \pm 660	19 \pm 4,6	2136 \pm 874	18 \pm 5
Adenosin 1 $\mu\text{mol/l}$	374 \pm 170	11 \pm 3,6	-2 \pm 10,4	5 \pm 1,1	109 \pm 107	5 \pm 2,2
Adenosin 10 $\mu\text{mol/l}$	1957 \pm 273	21 \pm 2,3	645 \pm 411 ** $p = 0,004$	13 \pm 3,9	449 \pm 198 ** $p = 0,0007$	11 \pm 3,3 * $p = 0,03$
10 Hz 15 s	52 \pm 26	9 \pm 1,5	112 \pm 89	8 \pm 1,6	113 \pm 80	7 \pm 2
10 Hz 30 s	51 \pm 36	8 \pm 1,4	87 \pm 68	6 \pm 1,1	154 \pm 99	7 \pm 3,2
10 Hz 60 s	261 \pm 258	9 \pm 1,8	97 \pm 110	7 \pm 2,5	186 \pm 137	9 \pm 4,1
100 Hz 1 s	81 \pm 29	13 \pm 0,7	101 \pm 32	11 \pm 2,5	64 \pm 43	8 \pm 3,1
100 Hz 15 s	887 \pm 236	18 \pm 2,2	771 \pm 208	15 \pm 2	468 \pm 186	11 \pm 2,7
100 Hz 30 s	2391 \pm 580	22 \pm 1,8	1209 \pm 317	19 \pm 1,9	863 \pm 368	11 \pm 0,9 * $p = 0,04$
100 Hz 60 s	5102 \pm 1442	25 \pm 1,8	3523 \pm 701	23 \pm 2,1	1925 \pm 584	15 \pm 4
Ruhedurchmesser: Kontrolle: $7 \pm 1,4 \mu\text{m}$, G: $5 \pm 0,9 \mu\text{m}$, GL: $4 \pm 1,1 \mu\text{m}$ Maximaler Durchmesser der Gefäßstellen: $28 \pm 1,9 \mu\text{m}$, $n = 5$						

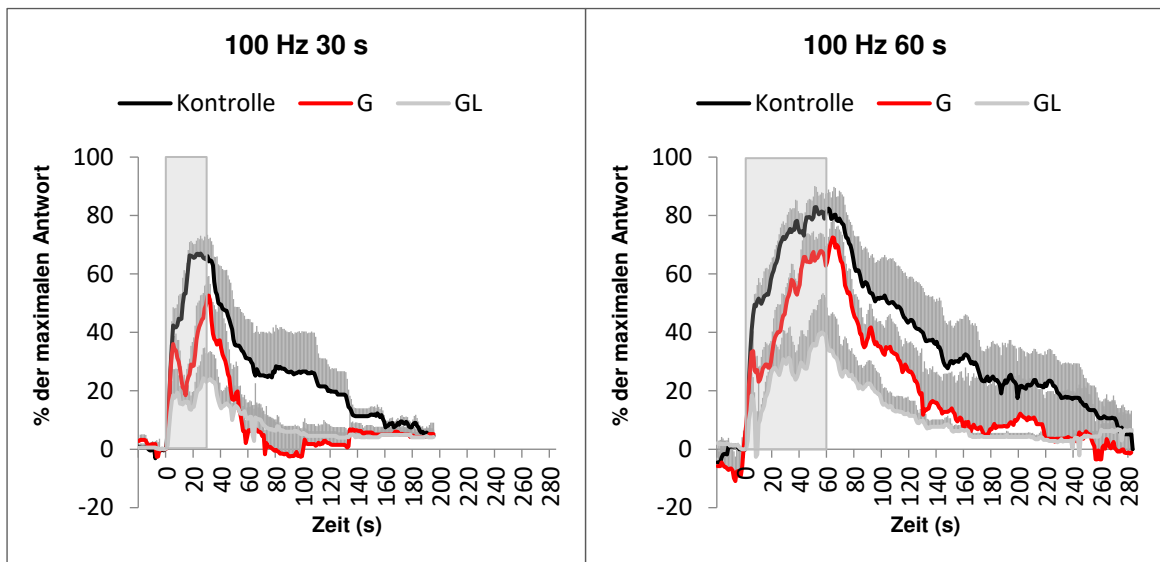


Abbildung 25: Arteriellere Durchmesser vor, während und nach tetanischen muskulären Kontraktionen. Es zeigte sich eine Vasodilatation, die durch die kombinierte Enzymblockade nur im Extremwert der aktiven Hyperämie unter kombinierter Blockade versus Kontrolle nach Stimulation über 30 Sekunden vermindert wurde. Das graue Feld markiert die Dauer der elektrischen Stimulation. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM, signifikante Wertänderung (siehe Tabelle 8), $n = 5$.

3.4.3.3 Kombinierte Blockade des K_{ATP} -Kanals und der COX

Die kombinierte Blockade des K_{ATP} -Kanals und der COX (GI) minderte die AUC von durch Acetylcholin $10 \mu\text{mol/l}$ hervorgerufenen Vasodilatationen (Kontrolle: 2031 ± 545 , G: 1543 ± 472 , GI: 1416 ± 485 (-30 % versus Kontrolle, $p = 0,03$); $n = 5$) (Tabelle 9). Der Ruhetonus wurde durch die zusätzliche Blockade der COX im Vergleich zu bestehender K_{ATP} -Kanal-Blockade nicht verändert, die gemeinsame Blockade von K_{ATP} -Kanal und COX steigerte den Vasotonus im Vergleich zur Kontrolluntersuchung aber deutlich (Kontrolle: $8 \pm 0,9 \mu\text{m}$, G: $7 \pm 1,6 \mu\text{m}$, GI: $4 \pm 0,9 \mu\text{m}$ (-50 % versus Kontrolle, $p = 0,001$). Vasodilatationen nach Applikation von Adenosin waren nach K_{ATP} -Kanal-Blockade wie zuvor reduziert und wurden durch eine zusätzliche Blockade der COX nicht weiter vermindert (Abbildung 26 und Tabelle 9).

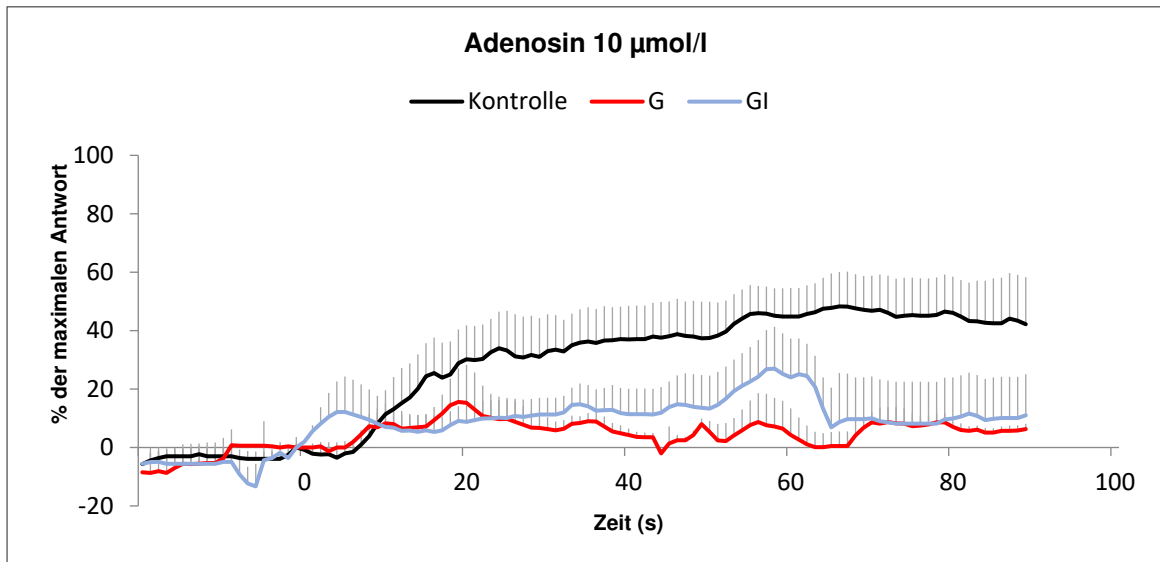


Abbildung 26: Arteriöläre Durchmesser nach Applikation von Adenosin 10 $\mu\text{mol/l}$ zum Zeitpunkt 0. Es zeigte sich eine deutliche Vasodilatation, die in ihrem Extremwert nach Blockade des K_{ATP} -Kanals (G) abgeschwächt war. Unter kombinierter Blockade des K_{ATP} -Kanals mit einer Blockade der COX (GI) war keine signifikante Minderung nachweisbar. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM, signifikante Wertänderung (siehe Tabelle 8), $n = 5$.

Die aktive Hyperämie wurde unter kombinierter Blockade des K_{ATP} -Kanals und der COX nur in ihrer maximalen Dilatation bei tetanischen und nicht-tetanischen Kontraktionen über 30 bzw. 60 Sekunden vermindert (Abbildung 27 und Tabelle 9).

Tabelle 9: AUC und maximale Vasodilatation (EXT, μm) nach Applikation von Acetylcholin, Adenosin und bei muskulärer Kontraktion unter Kontrollbedingungen, unter Blockade des K_{ATP} -Kanals (G) und unter kombinierter Blockade des K_{ATP} -Kanals und der COX (GI). Es zeigten sich einzelne Abschwächung der aktiven Hyperämie durch die Enzymblockade. Abgebildet ist der Mittelwert \pm SEM, * = signifikante Wertänderung versus Kontrolle.

	Kontrolle		G		GI	
	AUC	EXT (μm)	AUC	EXT (μm)	AUC	EXT (μm)
Acetylcholin 1 $\mu\text{mol/l}$	1310 \pm 421	25 \pm 1,3	156 \pm 56	15 \pm 2,7	1055 \pm 418	18 \pm 3,1
Acetylcholin 10 $\mu\text{mol/l}$	2031 \pm 545	27 \pm 2,6	1543 \pm 472	20 \pm 3,2	1416 \pm 485 * p = 0,03	22 \pm 2,8
Adenosin 1 $\mu\text{mol/l}$	212 \pm 178	12 \pm 5,6	34 \pm 21	6 \pm 1,1	117 \pm 115	8 \pm 2,6
Adenosin 10 $\mu\text{mol/l}$	1448 \pm 384	21 \pm 2,3	247 \pm 102	12 \pm 3,3	688 \pm 334	16 \pm 3,3
10 Hz 15 s	19 \pm 17	7 \pm 0,8	91 \pm 53	10 \pm 1,6	50 \pm 35	8 \pm 1,8
10 Hz 30 s	92 \pm 46	11 \pm 1,7	55 \pm 52	8 \pm 2,1	8 \pm 25	4 \pm 0,8 * p = 0,032
10 Hz 60 s	346 \pm 230	13 \pm 1,8	353 \pm 148	11 \pm 2,5	-33 \pm 58	4 \pm 0,7 * p = 0,011
100 Hz 1 s	219 \pm 63	19 \pm 2,5	555 \pm 240	14 \pm 3,4	258 \pm 105	12 \pm 3,3
100 Hz 15 s	455 \pm 72	23 \pm 0,6	1105 \pm 264	22 \pm 1,4	712 \pm 207	19 \pm 2,8
100 Hz 30 s	1371 \pm 307	27 \pm 2	1976 \pm 283	25 \pm 2,4	2306 \pm 485	21 \pm 2,1 * p = 0,009
100 Hz 60 s	3374 \pm 669	29 \pm 2,3	4127 \pm 826	30 \pm 1,4	2867 \pm 859	24 \pm 1,2
Ruhedurchmesser: Kontrolle: 8 \pm 0,9 μm , G: 7 \pm 1,6 μm , GI: 4 \pm 0,9 μm Maximaler Durchmesser der Gefäßstellen: 32 \pm 1,6 μm , n = 5						

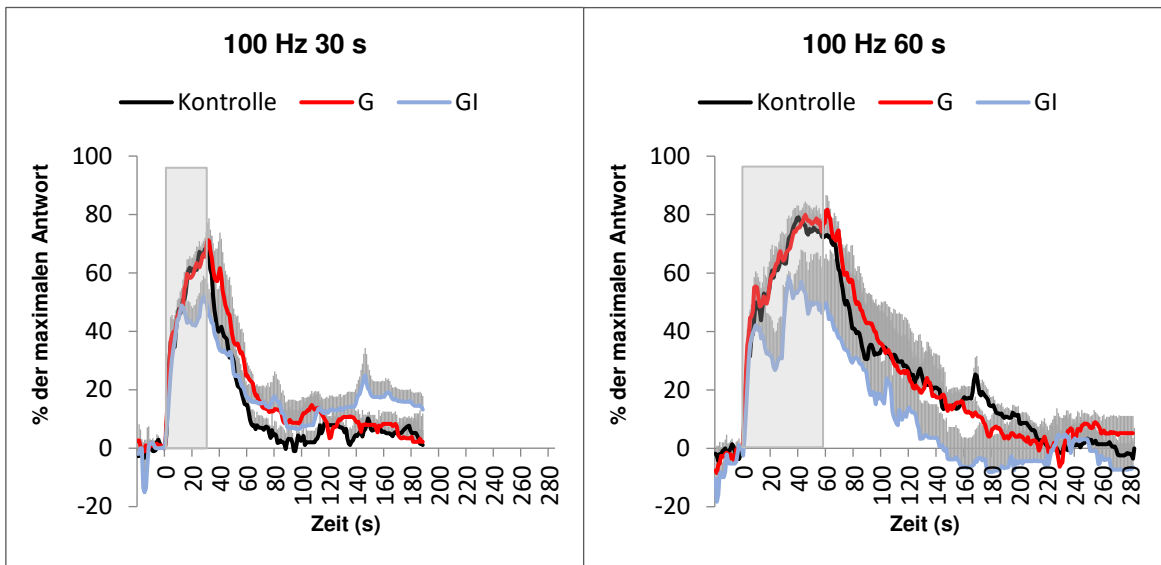


Abbildung 27: Arteriöläre Durchmesser vor, während und nach tetanischen muskulären Kontraktionen. Es zeigte sich eine Vasodilatation, die durch die kombinierte Blockade nur im Extremwert der aktiven Hyperämie unter kombinierter Blockade versus Kontrolle vermindert wurde. Das graue Feld markiert die Dauer der elektrischen Stimulation. Durchmesseränderung ist angegeben als % der maximal möglichen Antwort. Abgebildet ist der Mittelwert + SEM, signifikante Wertänderung (siehe Tabelle 9), $n = 5$.

4. Diskussion

Die aktive Hyperämie ist ein für den Skelettmuskel wichtiger physiologischer Mechanismus. Trotz ihrer Bedeutung sind die zugrunde liegenden Mechanismen unklar. Der Ablauf aktiver Hyperämie kann (hier am Beispiel des Cremastermuskels der Maus) im Skelettmuskel in vivo untersucht werden. Um diese aktive Hyperämie betrachten zu können, ist die Untersuchung von Arteriolen mit intaktem physiologischem Gefäßtonus notwendig. Hierfür sind erhaltene vegetative Efferenzen und ein ungestörtes Mikromilieu mit insbesondere intakter Intima und Media wichtig. Die Intravitalmikroskopie am M. cremaster ermöglicht aufgrund des erhaltenen Gefäßtonus bei vorsichtiger Präparation eine Betrachtung der physiologischen Abläufe. Blieb der Gefäßtonus nach der Präparation nicht erhalten, wurde das Experiment nicht fortgesetzt. Eine Applikation von Vasokonstriktoren erfolgte zu keinem Zeitpunkt. Die Steuerung der Narkose erfolgte nach den Reaktionen der Maus auf sensible Reize. Hierbei trat auch bei Erhöhung der Applikationsrate keine wesentliche Vasodilatation auf, weshalb die geringe Variation der Narkosegabe auf die Mikrozirkulation als eine nicht relevante Beeinflussung des Experiments betrachtet wurde.

Der Ausgangstonus der Gefäße in den verschiedenen Versuchstieren unterlag einer großen Variabilität, wie es charakteristisch für die Mikrozirkulation ist. Um Diameteränderungen der Gefäße in verschiedenen Versuchen vergleichbar zu machen, wurde sie als prozentualer Anteil der maximal möglichen Dilatation beschrieben, indem zu jedem Gefäß der maximale Durchmesser bei supramaximaler Applikation von verschiedenen Vasodilatoren bestimmt wurde.

Die Experimente wiesen teilweise eine große Streubreite auf, die trotz wiederholter deutlicher numerischer Effekte einer Behandlung zu einem nicht-signifikanten Ergebnis führten. Dies lag insbesondere an den großen interindividuellen Wirkunterschieden der Behandlungen. Interindividuelle Unterschiede bezüglich der Auswirkung einer K_{ATP} -, COX- und NO-Blockade auf den Vasotonusbereits wurden bereits am Menschen beschrieben (Schrage et al., 2006). Bei weiteren Untersuchungen an diesem Modell könnte eine Steigerung der Fallzahl zu mehr Ergebnissen führen, die statistische Signifikanz erreichen.

4.1 Grundlegende Experimente

Zum Ausschluss einer direkten Stimulation der Gefäße durch die Stimulationselektrode wurde eine Reihe von Kontrollstimulationen unter Muskelrelaxierung durchgeführt. Während unter Kontrollbedingungen Muskelkontraktionen auslösbar waren, kontrahierte der Skelettmuskel nach Applikation des nichtdepolarisierenden Muskelrelaxans Pancuronium nicht mehr. Auf Acetylcholin hin dilatierten die Gefäße allerdings unverändert. Dies zeigt, dass in dem verwendeten Versuchsaufbau die Muskelfasern nicht direkt durch die elektrische Stimulation zur Kontraktion gebracht wurden, und weiterhin, dass durch nervale Stimulation in den synaptischen Spalt freigesetztes Acetylcholin allein keine aktive Hyperämie hervorruft. Dabei hemmte Pancuronium die Dilatation der Gefäße auf Acetylcholin nicht, sodass gefolgert werden kann, dass muskarinerge Rezeptoren nicht blockiert wurden und die Dilatationsfähigkeit der Gefäße nicht eingeschränkt wurde.

In allen Versuchen wurde die Dilatation der Arteriolen auf verschiedene Agonisten untersucht, die mechanistisch unterschiedlich konzentrationsabhängige Vasodilatationen bewirkten. Dies zeigte die intakte Dilatation der Arteriolen unter Kontrollbedingungen und verifizierte insbesondere die Funktion des Endothels. Des Weiteren konnte so der Effekt im Folgenden applizierter Antagonisten bewertet werden. Der arterioläre Durchmesser stieg nach Applikation von Acetylcholin und Adenosin in den Konzentrationen 1 μmol bei Acetylcholin stärker und bei 10 μmol vergleichbar stark an. Der zeitliche Ablauf der Gefäßantwort nach Applikation von Acetylcholin und Adenosin war ähnlich. Die Vasodilatation durch ADP stieg deutlich langsamer an und erreichte einen geringeren Maximalwert als die durch Adenosin. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass zumindest ein Teil der Wirkung des ADP durch eine Degradation zu Adenosin hervorgerufen wird.

Die nervale Stimulation induzierte muskuläre Kontraktionen, die mit einer Dilatation vergesellschaftet waren. Schon die kurze Stimulation von 1 s mit 100 Hz löste zuverlässig Dilatationen auf 51 % der maximal möglichen Gefäßantwort aus. Das Ausmaß aktiver Hyperämie stieg mit der Stimulationsdauer sowohl bei tetanischer als auch bei nicht-tetanischer Stimulation an. Die Vasodilatation während nicht tetanischer Kontraktionen erfolgte langsamer, weniger steil ansteigend und erreichte eine deutlich geringere maximale Ausprägung als während tetanischer

Kontraktionen. So wurde bei nicht tetanischer Stimulation über 1 min nur eine Dilatation von ca. 40 % beobachtet, wohingegen sie bei tetanischer Stimulation über 1 min ca. 80 % der maximalen Antwort betrug. Der Anstieg der Vasodilatation während tetanischer Kontraktion über eine Minute verlangsamte sich zum Ende der Stimulationsdauer hin, und die weitere Dilatation stagnierte. Dies lässt vermuten, dass eine noch längere Stimulationsdauer keine wesentlich größere aktive Hyperämie hervorrufen würde. Die dilatierende Kapazität des der aktiven Hyperämie zugrundeliegenden Mechanismus ist also in ihrer Maximalausprägung limitiert. Dies könnte ein Grund beginnender muskulärer Erschöpfung sein.

4.2 Blockade der Cyclooxygenase und NO-Synthase

Das Endothel steht mit der Freisetzung der dort gebildeten Dilatatoren NO und Prostaglandinen schon seit Jahren im Fokus der Untersuchung der Regulation des Gefäßtonus und der Durchblutung. Auch bei aktiver Hyperämie wurde die Rolle des NO und der Produkte der Cyclooxygenase auf den Gefäßtonus vielfach untersucht. Es wird sowohl eine Beteiligung beider Mediatoren bei der Einstellung des basalen Tonus und der Ruhedurchblutung als auch bei aktiver Hyperämie (Boushel et al., 2002; Crecelius et al., 2013) diskutiert. In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich nach Blockade der Cyclooxygenase und NO-Synthase eine ungefähre Halbierung des Gefäßdiameters. Dies steht im Einklang mit Vorstudien am Hamster, bei denen nach kombinierter Blockade der NO- und Prostaglandinbildung ebenfalls eine Steigerung des Gefäßtonus in der in-vivo-Mikroskopie festgestellt werden konnte. Auch beim Menschen wurde die Bedeutung von NO (Rådegran und Hellsten, 2000) und Prostaglandinen für den vaskulären Grundtonus mehrfach gezeigt (Rådegran und Saltin, 1999; Mortensen et al., 2009b; Heinonen et al., 2011). So war die Durchblutung im Bein des Menschen vermindert und ging einher mit einer Steigerung der Sauerstoffextraktion nach Blockade der NO-Synthase mittels intraatrialer Infusion (Rådegran und Saltin, 1999). Die Bedeutung von NO scheint hierbei eher in tonischen Konzentrationsspiegeln zu liegen (Edmunds und Marshall, 2001b). Über die Regulation des Vasotonus hinaus könnten NO und Prostaglandine auch von Bedeutung für den ungestörten Ablauf aktiver Hyperämie sein.

In meiner Untersuchung kam es allerdings nur zu einer Minderung der durch Adenosin induzierten Vasodilatation, die aktive Hyperämie blieb unter kombinierter Enzymblockade unbeeinflusst. Vorstudien kamen hier zu divergierenden Ergebnissen, die sich sogar innerhalb einer Spezies je nach Lokalisation unterschieden. Die Interpretationen reichten von einer Bedeutung von NO und Prostaglandinen für die aktive Hyperämie in Studien am Arm des Menschen mit dem Effekt einer Reduktion des Blutflusses und teils Steigerung der Sauerstoffextraktion durch die kombinierte Blockade (Gilligan et al., 1994; Dyke et al., 1995; Schrage et al., 2004) bis zu einer gänzlich fehlenden Bedeutung von NO und Prostaglandinen bei der aktiven Hyperämie am Bein des Menschen mit fehlender Reduktion des Blutflusses durch die kombinierte Blockade, wobei teils auch die Sauerstoffextraktion untersucht wurde (Bradley et al., 1999; Rådegran und Saltin, 1999; Frandsen et al., 2001; Kingwell et al., 2002). Auch zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht wurde am Beispiel der Ratte bereits eine unterschiedliche Bedeutung von NO für die Mikrozirkulation aufgezeigt (Craig et al., 2018; Craig et al., 2019b).

Bei Betrachtung dieser Divergenz stellt sich die Frage, ob sich die zugrunde liegenden Mechanismen der aktiven Hyperämie zwischen verschiedenen Lokalisationen im Organismus unterscheiden können. Zumindest zwischen den Geschlechtern und auch Ethnien wurde bereits auf eine unterschiedliche Bedeutung von Prostaglandinen für die aktive Hyperämie hingewiesen (Aiku und Marshall, 2019). Ein relevanter Aspekt ist die Möglichkeit einer unterschiedlich guten Kompensation des Ausfalls der endothelialen Mediatoren NO und Prostaglandine durch andere Mechanismen, die eine Dilatation aufrechterhalten. Eine Möglichkeit der Kompensation einer NO- und COX-Blockade sind durch Cytochrom P450 2C9 gebildete Produkte, die am Menschen eine kompromittierte NO-Bildung kompensieren können, was im Bein des Menschen untersucht und anhand einer Reduktion des Blutflusses bei einer kombinierten Inhibition von CYP P450 2C9 und NOS gezeigt wurde. Eine alleinige Inhibierung von NOS oder CYP P450 2C9 erbrachte dabei keinen Effekt (Hillig et al., 2003). Auch ATP, dessen Spiegel nach der kombinierten Blockade der NO-Synthase und COX ansteigt (Mortensen et al., 2007) und folgend als Vasodilatator agieren könnte, könnte einen solchen Kompensationsmechanismus darstellen. Solche Mechanismen können ursächlich dafür sein, dass trotz einer Bedeutung von NO und Prostaglandinen bei

Vasodilatationen kein wesentlicher Effekt der kombinierten Blockade auf die aktive Hyperämie in meinen Experimenten zu beobachten war.

Insbesondere für Produkte der COX und für NO ist solch eine gegenseitige Kompensation bereits bekannt, und beide Mediatoren scheinen ihre Effekte zu verstärken. Anzeichen hierfür fanden sich im Menschen (Boushel et al., 2002) anhand eines reduzierten Blutflusses nach kombinierter Blockade der NO- und Prostaglandinbildung im Bein und über synergistische Interaktion der second messenger cGMP und cAMP auch mittels in-vivo-Mikroskopie im Hamster (Wit et al., 1994). Ein möglicher Mechanismus wäre hierbei eine cGMP vermittelte Hemmung des cAMP-Abbaus (Maurice und Haslam, 1990), ein Mechanismus der an Thrombozyten des Kaninchens beschrieben wurde. Neben ihrer Interaktion auf Signalkaskadenebene gibt es einen Einfluss auf Ebene der Bildung der Stoffe. Prostaglandine scheinen die Bildung von NO zu stimulieren (Butt et al., 2000). Trotzdem bzw. zusätzlich scheint bei einem Abfall der Prostaglandinspiegel die NO-Konzentration anzusteigen (Bolz und Pohl, 1997). So ist eine Teilkompensation möglich. Nur wenige Untersuchungen postulieren einen voneinander unabhängigen Effekt von NO und Prostaglandinen auf die aktive Hyperämie (Schrage et al., 2004). Deshalb erfolgte fast immer eine kombinierte Blockade der NO-Synthase und COX in den vorliegenden Experimenten.

In dieser Arbeit wurden Arteriolen direkt betrachtet. Die meisten Studien, die einen Effekt der kombinierten Blockade feststellten, hatten den Blutfluss gemessen. Da bereits eine Bedeutung von Prostaglandinen insbesondere bei Vasodilatationen an Gefäßstellen stromaufwärts von der Mikrozirkulation (Hammer et al., 2001) und Prostaglandinen und NO bei der Weiterleitung von Dilatationen (Domeier und Segal, 2007) festgestellt wurde, könnten diese die aktive Hyperämie in größeren Gefäßen vermitteln. Sie könnten also Element der sogenannten „Ascending dilation“ sein. Dies ist die Ausbreitung einer Vasodilatation Richtung upstream im Gefäßbett, die allerdings größtenteils über die im Gefäß vorhandenen Connexine Cx32, Cx37, Cx40, Cx43 und Cx45 (Pohl, 2020), meist durch Cx40, vermittelt wird (Milkau et al., 2010).

Bei der Betrachtung der Arteriolen wird nur ein Abschnitt der Mikrozirkulation betrachtet, während die Messung des Blutflusses das Verhalten des gesamten Gefäßbettes widerspiegelt. Während der in-vivo-Mikroskopie könnten also Effekte

stromaufwärts der Betrachtungsstelle nicht registriert worden sein, was Diskrepanzen zu Studien mit Flussmessung erklären würde.

Generell ist festzuhalten, dass bereits gezeigt wurde, dass eine Hemmung der NO-Bildung keinen Einfluss auf die muskuläre Kontraktionskraft hat (Murrant und Sarelius, 2002). Einen dahingehenden Einfluss der NO-Blockade mit folgendem Einfluss auf die aktive Hyperämie scheint daher unwahrscheinlich.

4.3 Adenosinrezeptorblockade mit und ohne Blockade der COX und NOS

Adenosin wird häufig als wichtiger Mediator in der aktiven Hyperämie beschrieben. Das Ausmaß des durch Adenosin vermittelten Anteils ist hierbei allerdings unklar. Die Beobachtungen reichen von 20-40 % der Vasodilatation im Steady state (Marshall, 2007) bis zu einem allenfalls geringfügigen Einfluss ohne essenzielle Bedeutung im Rahmen aktiver Hyperämie, gezeigt am Beispiel der Koronararterien mit Messung des coronaren Flusses und uneingeschränkter aktiver Hyperämie in Herzen von Adenosinrezeptor-knockout-Mäusen in der Langendorff-Anlage (Zhou et al., 2014).

In den durchgeführten Experimenten führte die Applikation von Adenosin zu einer Vasodilatation. Der verwendete Adenosinrezeptorantagonist verhinderte dies in der gewählten Konzentration zuverlässig. Die verwendeten Adenosinkonzentrationen sind vergleichbar mit den zur Vasodilatation verwendeten Konzentrationen anderer Arbeitsgruppen (Mian und Marshall, 1991) und liegen im Bereich der in vivo zu erwartenden Konzentrationen während muskulärer Belastung (extrazelluläre Adenosinkonzentration im Menschen in vivo 30 bis 300 nM, bei aktiver oder reaktiver Hyperämie bis 10 µM oder sogar höher; Schulte, 2004). Die aktive Hyperämie wurde durch Applikation des Adenosinrezeptorantagonisten nicht vermindert. Es trat zwar eine tendenzielle Abschwächung der Vasodilatation auf, diese erreichte allerdings nicht das gewählte statistische Signifikanzniveau. In der Maus ist Adenosin als Mediator der aktiven Hyperämie also nicht essenziell. Auch hier kann die Blockade des Adenosins möglicherweise durch redundante Mechanismen kompensiert werden. Die Bedeutung des Adenosins ist allerdings unter Umständen bei tetanischen und nicht-tetanischen Kontraktionen und in den unterschiedlichen Phasen der aktiven Hyperämie nicht identisch. Beispielsweise wurde der Einfluss durch Adenosin auf den femoralen Blutfluss am Beispiel der

Ratte im Rahmen tetanischer Kontraktionen mit ca. 25 % als größer beschrieben als bei nicht tetanischen Kontraktionen mit ca. 14 % (Ray und Marshall, 2009). Diese stärkere Reduktion der aktiven Hyperämie nach tetanischen Kontraktionen als nach nicht-tetanischen Kontraktionen durch eine Adenosinrezeptorblockade wurde in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls beobachtet. Interessant ist, dass ein Anstieg der Adenosinkonzentration insbesondere während länger anhaltender Kontraktion (Lo et al., 2001) beobachtet wurde. Die Bedeutung des Adenosins könnte also mit anhaltender Kontraktion des Skelettmuskels zunehmen.

Das Ausmaß des Effekts der Adenosinrezeptorblockade variierte in der vorliegenden Untersuchung geringfügig zwischen den verschiedenen Versuchen. Es gibt einige potentielle Einflussfaktoren, die diese Variabilität erklären könnten. Die vasodilatierende Wirkung von Adenosin durch die Abhängigkeit von z.B. Calcium (Duza und Sarelius, 2003), die großen Einflüsse des lokalen pO_2 auf die lokale Bildung von Adenosin oder die Aktivität muskulärer Adenosintransporter auf die Clearance des Adenosins (Rubin et al., 2000) könnten einen relevanten, nicht detektierten Einflussfaktor dargestellt haben.

In einem Großteil der bisherigen Studien zeigte sich eine enge Interaktion zwischen Adenosin und anderen Mediatoren wie NO oder den Produkten der COX. Diese Interaktion konnte sowohl bei der aktiven als auch der reaktiven Hyperämie nachgewiesen werden. In der reaktiven Hyperämie wird in den meisten Fällen eine Stimulation der NO-Bildung (meist über A_1 -Rezeptoren) durch Adenosin postuliert (Danialou et al., 1997; Bryan und Marshall, 1999b; Edmunds und Marshall, 2001a; Ray et al., 2002). Einzelne Studien beschreiben sogar kombiniert hemmende (via A_1) und stimulierende (via A_{2A}) Effekte von Adenosin auf die Bildung von NO (Li et al., 1998). Als Ort dieser Interaktion wurden das Endothel (Bryan und Marshall, 1999b; Ray et al., 2002) und ebenfalls der Skelettmuskel genannt (Nyberg et al., 2010). Daher wurde auch in der vorliegenden Studie die Adenosinrezeptorblockade um eine Inhibierung der NO-Synthase und der COX erweitert.

Die bereits starke Abschwächung einer durch Adenosin induzierten Vasodilatation wurde durch Blockade der NOS und COX nicht weiter vermindert. Für die NOS und COX konnte somit keine Funktion während bestehender Adenosinrezeptorblockade bei durch Adenosin induzierten Vasodilatationen gezeigt werden. Bei aktiver Hyperämie fanden sich allerdings Hinweise auf eine Kompensation der durch Blockade fehlenden Wirkung der Adenosinrezeptoren durch Prostaglandine und

NO. Aktive Hyperämie wurde durch die kombinierte Blockade zwar nicht in signifikantem Ausmaß beeinflusst, bei tetanischen Kontraktionen fand sich aber eine tendenzielle Minderung des Extremwertes und der AUC aktiver Hyperämie nach Blockade von Adenosinrezeptoren, COX und NOS. Die alleinige Blockade von COX und NOS schwächte aktive Hyperämie nicht ab (siehe oben). Dies weist darauf hin, dass bei der Kombination einer Adenosinrezeptorblockade mit COX- und NOS-Blockade kompensatorische Parallelmechanismen gehemmt werden. Es lässt sich vermuten, dass bei fehlender Wirkung des Adenosins, NO-Synthase und Cyclooxygenase verstärkt stimuliert und unter diesen Bedingungen funktionell wichtig werden. Die großen interindividuellen Unterschiede zwischen den Experimenten und der daraus folgende große SEM scheinen trotz deutlicher Minderung der AUC und maximalen Vasodilatationen (EXT) insbesondere unter kombinierter Blockade von Adenosinrezeptoren, COX und NOS der Grund für das Nichterreichen eines signifikanten Unterschiedes zu sein. Eine sich ergänzende Bedeutung von Adenosinrezeptoren, COX und NOS bei aktiver Hyperämie liegt daher nahe.

In einer Vielzahl vorangegangener Untersuchungen wurde der Adenosin-Typ 2-Rezeptor als besonders entscheidend aus der Gruppe der P₁-Rezeptoren (A₁-A₃) für den vasodilatierenden Effekt von Adenosin in verschiedenen Spezies und Gewebetypen herausgearbeitet (Merkel et al., 1992; Vials und Burnstock, 1993; Coney und Marshall, 1998). Insbesondere auch in Bezug auf aktive Hyperämie wird dem A_{2A}-Rezeptor eine besondere Bedeutung zugeschrieben (Minderung der AH um bis zu 30 % in der Katze; Poucher, 1996). In der vorliegenden Untersuchung wurde aber weder eine relevante Abschwächung der Vasodilatation nach Adenosinapplikation noch eine relevante Minderung von aktiver Hyperämie nach selektiver A_{2A}-Blockade festgestellt. Bei kombinierter Blockade von A_{2A}-Rezeptoren, COX und NOS ergab sich ein heterogenes Bild. Die kombinierte Blockade schwächte den Extremwert der Vasodilatation unter aktiver Hyperämie bei tetanischer Kontraktion für 30 Sekunden gegenüber der Kontrolluntersuchung ab, die AUC blieb unverändert. Auch hier zeigt sich also eine alleinige Abschwächung des Extremwertes der aktiven Hyperämie unter langanhaltender tetanischer Kontraktion. Hier scheint die Bedeutung von Adenosin zuzunehmen und die Blockade der drei Mediatorwege eine kritische Menge an funktionell relevanten

Mediatoren zu inhibieren. Der A_{2A} -Rezeptor ist hierbei beteiligt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Vorstudien, die einen Effekt einer A_{2A} -Blockade auf aktive Hyperämie insbesondere in der vierten und fünften Minute bzw. in der Zeit nach tetanischer Kontraktion registrierten (Ray und Marshall, 2009). Aufgrund der ähnlichen Ergebnisse bei unselektiver Adenosinrezeptorblockade ist es wahrscheinlich, dass der A_{2A} -Rezeptor eine Bedeutung für Adenosin im Rahmen aktiver Hyperämie besitzt, die Wirkung von Adenosin im Rahmen aktiver Hyperämie aufgrund des geringeren Effekts im Vergleich zur unselektiven Adenosinblockade aber nicht allein vermittelt.

4.4 Blockade von ADP/ATP, Adenosin, COX und NOS

Die für ADP und ATP relevanten P_2Y_2 - und P_2X_1 -Rezeptoren sind in Endothel und glattem Muskel exprimiert (Harrington et al., 2007; Mortensen et al. 2009a) und somit geeignet, aktive Hyperämie zu vermitteln. Vorstudien erbrachten Hinweise auf eine Beteiligung von ATP/ADP an aktiver Hyperämie (Nyberg et al., 2013). Hier wurde durch Kombination verschiedener experimenteller Ansätze, zum Beispiel einer Blutflussmessung im M. gluteus maximus der Ratte, im humanen Muskel mittels Mikrodialyse und durch Zellkulturstudien, die Bedeutung von ATP für die Regulation des Vasotonus und sein blutflusssteigernder Effekt aufgezeigt. Insbesondere wurde eine Blockade der ATP-vermittelten Vasodilatation durch Inhibierung der Bildung von NO und Prostaglandinen nachgewiesen. Die wichtige Frage einer aufgehobenen Hyperämie während muskulärer Aktivität unter ATP-Rezeptorblockade wurde allerdings nicht untersucht. Dieser Aspekt wurde im Minischwein studiert. Es wurde gezeigt, dass der Blutfluss an verschiedenen Messstellen im Skelettmuskel wie zum Beispiel dem Diaphragma während muskulärer Arbeit nach Blockade von P_2 -Rezeptoren geringer ist und Herzfrequenz sowie Laktat bei konstantem Blutdruck ansteigen. Dies zeigt reduzierte aktive Hyperämie mit folgend verminderter Sauerstoffversorgung des Muskels (Mortensen et al., 2014). Das passt zu den Ergebnissen der reduzierten aktiven Hyperämie bei langanhaltenden tetanischen Kontraktionen unter kombinierter Adenosinrezeptor-, P_2Y -, NO- und COX-Blockade.

Von besonderem Interesse waren die P_2Y -Rezeptoren auch deshalb, weil es Hinweise gibt, dass ATP der Mediator sein könnte, über den Erythrozyten auf

geringen Sauerstoffpartialdruck hin eine Vasodilatation bewirken (Ellsworth et al., 1995).

Ob intravasales ATP rein vasodilatierend wirkt (Hansmann et al., 1998), oder insbesondere in Abhängigkeit von der Integrität des Endothels variable Effekte hat, ist unklar. Untersuchungen zeigten eine eher vasodilatierende Wirkung über endotheliale P_2Y_2 -Rezeptoren (bzw. über endothelunabhängig am Gefäßmuskel lokalisierte P_2Y_2 -Rezeptoren (Mathieson und Burnstock, 1985; McMillan et al., 1999)) oder eine eher vasokonstringierende Wirkung (über muskulär exprimierte P_2X_1 -Rezeptoren bei endothelialer Dysfunktion) (Hansmann et al., 1998; Miyagi et al., 1996; van der Giet et al., 2002; Guns et al., 2005). Der Hauptanteil an Vasodilatation scheint dabei über den P_2Y -Rezeptor vermittelt zu werden, weshalb dieser im Zuge der weiteren Experimente blockiert wurde.

Die zusätzliche Blockade von P_2Y -Rezeptoren zu einer bestehenden unselektiven Blockade von Adenosinrezeptoren, COX und NOS konnte eine Vasodilatation nach Adenosin nicht weiter abschwächen. Interessant ist, dass bereits die kombinierte Blockade von Adenosinrezeptoren, COX und NOS durch ADP ausgelöste Vasodilatationen relevant mindern konnte. Dieser Effekt wurde durch zusätzliche ADP-Rezeptorblockade nicht weiter gesteigert. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass ADP seine vasodilatierende Wirkung insbesondere nach Degradierung zu Adenosin vermittelt. Dass dies ggf. ebenso für ATP gilt, zeigten bereits vorige Untersuchungen (Gordon, 1986). Die verwendeten Konzentrationen erscheinen dabei realistisch, da sowohl für Adenosin (siehe oben) als auch für ATP vergleichbare Konzentrationen in vivo nachgewiesen wurden (Nyberg et al., 2013). Die zusätzliche Blockade von P_2Y -Rezeptoren schwächte den Wert maximaler Dilatation bei tetanischer und nicht-tetanischer Stimulation über 60 Sekunden tendenziell ab. Die Änderung erreichte aber kein signifikantes Niveau. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass der Hauptanteil der Vasodilatation durch ATP/ADP zwar über die Degradation zu Adenosin mediiert wird, bei langanhaltender Stimulation, zumindest unter bestehender Adenosinrezeptorblockade, aber ein zusätzlicher vasodilatierender Effekt über P_2Y -Rezeptoren auftritt.

ATP steht in umfangreicher Interaktion mit verschiedenen regulatorischen Mechanismen, daher besteht bei isolierter Inhibierung der Wirkung von ATP die Möglichkeit der Kompensation über einen anderen Mechanismus. Es besteht

sowohl ein hemmender Einfluss auf vasokonstringierende, sympathoadrenerge Efferenzen (Rosenmeier et al., 2004; Kirby et al., 2008) als auch eine steigernde Wirkung auf die Spiegel von NO (60 %) und Prostacyclinen (40 %) (Nyberg et al., 2013). Der Effekt von ATP im Rahmen von aktiver Hyperämie wird insbesondere durch die Interaktion mit NO und Prostaglandinen mediiert (Collins et al., 1998; Mortensen et al., 2009a; Nyberg et al., 2013) und beeinflusst (Modifikation der Aktivität des K_{ATP} -Kanals durch den cGMP-Spiegel; Kubo et al., 1994). Im Rahmen einer kontrollierten ATP-Infusion im Menschen konnte bereits eine Reduktion der Blutflusssteigerung durch NOS- und COX-Blockade nachgewiesen und so gezeigt werden, dass die vasodilatierende Wirkung des ATP zu ca. 40 % über NO und Prostaglandine vermittelt wird (Mortensen et al., 2009a).

4.5 Blockade des K_{ATP} -Kanals sowie Blockade der COX und NOS

Der ATP-sensitive Kaliumkanal wird insbesondere im Pankreas, im Herz und im glatten Muskel exprimiert. Der K_{ATP} -Kanal ist Teil vieler Signalkaskaden (z.B. von Adenosin, Prostacyclin und β -Adrenorezeptoragonisten; Jackson, 1993). Verschiedene Stoffe sind dabei in der Lage den K_{ATP} -Kanal zu aktivieren, wie Adenosin (mittels Bildung von NO; Danialou et al., 1997), NO (Fujii et al., 2020), ADP oder ATP. Da der K_{ATP} -Kanal eine wichtige Rolle im Rahmen adenosinmediierter Vasodilatation spielt (Kuo und Chancellor, 1995), kann eine Blockade dieses Kanals über ihren Effekt auf die Vasodilatation nach Adenosinapplikation kontrolliert werden (Jackson, 1993).

In Bezug auf die Rolle des K_{ATP} -Kanals in der Mikrozirkulation gibt es Voruntersuchungen mit deutlich unterschiedlichen Resultaten. Insbesondere mittels intravitaler Mikroskopie des Cremastermuskels im Hamster konnte beobachtet werden, dass eine Blockade des K_{ATP} -Kanals mittels Glibenclamid zu einer Reduktion der aktiven Hyperämie in Arterien und Arteriolen jeder Größe bei muskulärer Stimulation führt (Hammer et al., 2001). Diese Beeinträchtigung der Dilatation durch die Blockade des K_{ATP} -Kanals hatte auch in vivo funktionelle Folgen, denn eine Blockade des Kanals während aktiver Hyperämie senkte den Sauerstoffpartialdruck in der Mikrozirkulation (Holdsworth et al., 2016) und führte letztlich zu erhöhten Laktatwerten im Blut (Holdsworth, 2015). Über die Bedeutung für die lokale aktive Hyperämie (Saito et al., 1996; Murrant und Sarelis, 2002)

hinaus scheint der K_{ATP} -Kanal auch bedeutend für die Weiterleitung einer Vasodilatation während aktiver Hyperämie nach upstream zu sein (Murrant und Sarelius, 2002; Cohen und Sarelius, 2002). Auch der Ruhetonus von Arteriolen jeder Größe, untersucht durch Messung des Gefäßdiameters mittels Intravitalmikroskopie in Backentasche und Cremastermuskel des Hamsters (Jackson, 1993), wird durch diese Kanäle (Saito et al., 1996) beeinflusst. Die Bedeutung des K_{ATP} -Kanals für die Mikrozirkulation zeigt sich nicht nur in seiner Rolle bei aktiver Hyperämie, sie wird auch durch die große Bedeutung bei der reaktiven Hyperämie deutlich (Lombard et al., 1999), die hier nicht weiter untersucht wird.

Die alleinige Blockade des K_{ATP} -Kanals bewirkte in den vorliegenden Experimenten eine tendenzielle Minderung der AUC und der Extremwerte der Dilatation bei aktiver Hyperämie. Diese erreichte allerdings kein signifikantes Niveau. Ein Block des K_{ATP} -Kanals kann somit zu einem Teil durch Freisetzung von NO und Prostaglandinen kompensiert werden. Der K_{ATP} -Kanal kann auf Basis der Ergebnisse nicht als allein entscheidend für den Ablauf aktiver Hyperämie angesehen werden. Die kombinierte Blockade der COX, der Bildung von NO und des K_{ATP} -Kanals im Menschen hatte innerhalb sogar einer einzelnen Vorstudie bei einigen Individuen eine deutliche, bei anderen aber keine Wirkung auf den Vasotonus (Schrage et al., 2006). Dies könnte auf interindividuelle Unterschiede innerhalb dieses Mechanismus hindeuten. Weiterhin muss beachtet werden, dass die Fallzahl untersuchter Tiere möglicherweise nicht ausgereicht hat, um einen vorhandenen Effekt statistisch signifikant abzubilden.

Im Rahmen der kombinierten Blockade des K_{ATP} -Kanals, der NOS und der COX wurde die aktive Hyperämie in den hier vorliegenden Versuchen sowohl bei tetanischen als auch bei nicht-tetanischen Kontraktionen deutlich vermindert. Dies wurde bei längerer aktiver Hyperämie noch deutlicher. Das zeigt, dass der K_{ATP} -Kanal in Kombination mit NO und den Produkten der COX eine wichtige Rolle bei aktiver Hyperämie im Skelettmuskel spielt und steht im Einklang mit den bereits genannten Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen (siehe oben). Die Bedeutung wird hierbei umso größer, je länger eine Kontraktion und die folgende aktive Hyperämie anhält.

K_{ATP} -Kanal, COX und NOS sind also insbesondere für die Steigerung und Aufrechterhaltung aktiver Hyperämie bei längerer Aktivität nötig. Ein gemeinsamer

Ausfall dieser Komponenten wird nicht kompensiert. Die nach Blockade verbliebene aktive Hyperämie wird entweder durch einen zusätzlichen Mechanismus (beispielsweise durch eine entstehende und nicht antagonisierbare Hypoxie (Sarelius und Pohl, 2010)), einen weiteren Mediator oder eine inkomplette Blockade bedingt. Letzteres scheint insbesondere aufgrund der leicht geringeren Inhibition adenosinvermittelter Vasodilatation in dieser Versuchsserie im Vergleich zur Gesamtbetrachtung des Effekts einer K_{ATP} -Kanal-Blockade und somit möglicherweise resultierenden Restwirkung des vorhandenen Adenosins nicht unwahrscheinlich.

Eine Minderung aktiver Hyperämie tritt bei Blockade des K_{ATP} -Kanals mit COX oder NOS erst bei einer Kontraktionsdauer über 30 Sekunden auf. Die Rolle der NOS ist hierbei geringer als die der COX, da ein signifikanter Effekt nach Blockade von K_{ATP} -Kanal und COX ebenfalls bei nicht tetanischen Kontraktionen eintritt. Bei der Blockade von K_{ATP} -Kanal und NOS kommt es nur bei tetanischen Kontraktionen zu geminderter aktiver Hyperämie. Auch ein Ausfall von zwei Teilen des Systems aus K_{ATP} -Kanal, COX und NOS kann also durch den verbliebenen Mechanismus noch teilkompensiert werden.

Der Effekt der kombinierten Blockade von K_{ATP} -Kanal, COX und NOS auf aktive Hyperämie war deutlich größer als auf adenosinvermittelte Vasodilatationen. Dies lässt vermuten, dass der K_{ATP} -Kanal bei aktiver Hyperämie über seine Funktion zur Signaltransduktion im Rahmen der Adenosinwirkung hinaus eine Rolle spielt. Eine Möglichkeit wäre hier die in früheren Studien bereits gezeigte Reduktion von über α_2 -Adrenorezeptoren vermittelter Vasokonstriktion während muskulärer Aktivität (Thomas et al., 1997). Bedeutend ist festzuhalten, dass die Kontraktionskraft des Skelettmuskels unter einer K_{ATP} -Kanalblockade nicht abnimmt (Renaud et al., 1996).

4.6 Weitere regulatorische Elemente der aktiven Hyperämie

Viele weitere regulatorische Elemente mit Einfluss auf die Mikrozirkulation wurden bereits beschrieben. Beispielsweise scheinen temperatursensible Mechanismen Einfluss auf die Perfusionsregulation des menschlichen Muskels zu nehmen (Chiesa et al, 2015). Weiterhin ist der Einfluss des durch shear stress gebildeten Faktors EDHF (Griffith et al., 1987; Watanabe et al., 2005) nicht klar. Auch dieser

könnte einen relevanten Beitrag zur Steuerung aktiver Hyperämie leisten und so die Differenz aus inhibierten Mediatoren und nicht komplett sistierender Vasodilatation erklären. Auch die lokale Initiierung einer Gefäßreaktion mit Ausbreitung Richtung upstream über Connexine (Milkau et al., 2010) und dortiger Mediatorfreisetzung ist denkbar. Bei dieser sogenannten „ascending dilation“ wäre die lokale Blockade relevanter Mediatoren vielleicht bezüglich des Mediators korrekt, hätte aber keinen hemmenden Effekt, weil die Bildung weiter upstream stattfände. Ein weiteres, noch zu klärendes Element aktiver Hyperämie ist die Reduktion der durch sympathische Nerven hervorgerufenen Vasokonstriktion während der Aktivität motorischer Nerven und insbesondere die scheinbar große Bedeutung des Endothels in diesem Mechanismus (Cohen und Weisbrod, 1988; Thomas und Segal, 2004).

5. Zusammenfassung

Die Regulation der Durchblutung ist essentiell zur bedarfsadaptierten Versorgung aktiver Gewebe. Eine Durchblutungssteigerung bei Aktivität (aktive Hyperämie) wird durch verschiedene Mechanismen ausgelöst. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von NO, COX, Adenosin und vom K_{ATP} -Kanal sowie ihre gegenseitige Beeinflussung und etwaige Kompensationsmechanismen bei aktiver Hyperämie im Skelettmuskel untersucht. Hierzu wurden Arteriolen mittels Intravitalmikroskopie am Cremastermuskel der narkotisierten Maus vor und während der Auslösung von Skelettmuskelkontraktionen direkt beobachtet und deren Durchmesser aufgezeichnet. Durch lokale Blockade der jeweiligen Rezeptoren, Enzyme und Kanäle wurden die genannten Mediatoren ausgeschaltet. Die elektrische Stimulation des motorischen Nerven mit 10 oder 100 Hertz induzierte Kontraktionen und eine rasche Dilatation, die mit der Stimulationsfrequenz und -dauer deutlich zunahm (bis zu 80% der maximalen Dilatation bei 100 Hz über 60 s). Die Dilatation (und die Kontraktion) war durch Blockade der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren komplett aufzuheben. Somit ist die Acetylcholinfreisetzung aus dem motorischen Nerven nicht hinreichend, sondern die neuromuskuläre Übertragung und nachfolgende Kontraktion ist zur Auslösung aktiver Hyperämie notwendig. Die untersuchten Blockadeprotokolle minderten die Dilatation auf den endothelialen Stimulus Acetylcholin nicht oder nur wenig, so dass die Effekte als spezifisch zu beurteilen sind. Aktive Hyperämie blieb unter alleiniger Hemmung der NOS und COX, unter alleiniger unselektiver Adenosinrezeptorblockade und unter alleiniger Blockade des für die adenosinvermittelte Vasodilatation wichtigen K_{ATP} -Kanals durch Glibenclamid bald unbeeinflusst. Die Effektivität der unselektiven Adenosinrezeptorblockade sowie der Blockade durch Glibenclamid zeigte sich durch eine starke Reduktion adenosinvermittelter Vasodilatationen. Die kombinierte unselektive Adenosinrezeptorblockade und Blockade von NOS und COX minderte aktive Hyperämie, die kombinierte Blockade des K_{ATP} -Kanals und NOS und COX hob sie teils annähernd auf. Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, dass die Stimulation des motorischen Nerven eine arterioläre Dilatation auslöst. Der Dilatation liegen redundante Mechanismen zugrunde, die sich gegenseitig ersetzen können. Hierbei sind NO, Produkte der COX und Adenosin, welches nach Bindung an seine Rezeptoren K_{ATP} -Kanäle aktiviert, von besonderer Bedeutung.

6. Literaturverzeichnis

- Aiku, Abimbola O.; Marshall, Janice M. (2019): Contribution of prostaglandins to exercise hyperaemia: workload, ethnicity and sex matter! In: *The Journal of physiology* 597 (19), S. 4887–4900. DOI: 10.1113/JP278033.
- Baez, S. (1973): An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. In: *Microvascular research* 5 (3), S. 384–394.
- Banitt, P. F.; Smits, P.; Williams, S. B.; Ganz, P.; Creager, M. A. (1996): Activation of ATP-sensitive potassium channels contributes to reactive hyperemia in humans. In: *The American journal of physiology* 271 (4 Pt 2), S. 8.
- Bank, A. J.; Sih, R.; Mullen, K.; Osayamwen, M.; Lee, P. C. (2000): Vascular ATP-dependent potassium channels, nitric oxide, and human forearm reactive hyperemia. In: *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 14 (1), S. 23–29.
- Bijlstra, P. J.; den Arend, J. A.; Lutterman, J. A.; Russel, F. G.; Thien, T.; Smits, P. (1996): Blockade of vascular ATP-sensitive potassium channels reduces the vasodilator response to ischaemia in humans. In: *Diabetologia* 39 (12), S. 1562–1568.
- Bockman, E. L. (1983): Blood flow and oxygen consumption in active soleus and gracilis muscles in cats. In: *The American journal of physiology* 244 (4), H546-51. DOI: 10.1152/ajpheart.1983.244.4.H546.
- Bodin, P.; Bailey, D.; Burnstock, G. (1991): Increased flow-induced ATP release from isolated vascular endothelial cells but not smooth muscle cells. In: *British journal of pharmacology* 103 (1), S. 1203–1205.
- Bodin, P.; Burnstock, G. (1995): Synergistic effect of acute hypoxia on flow-induced release of ATP from cultured endothelial cells. In: *Experientia* 51 (3), S. 256–259.
- Bodin, P.; Milner, P.; Winter, R.; Burnstock, G. (1992): Chronic hypoxia changes the ratio of endothelin to ATP release from rat aortic endothelial cells exposed to high flow. In: *Proceedings. Biological sciences* 247 (1319), S. 131–135. DOI: 10.1098/rspb.1992.0019.
- Bolz, S. S.; Fisslthaler, B.; Pieperhoff, S.; Wit, C. de; Fleming, I.; Busse, R.; Pohl, U. (2000): Antisense oligonucleotides against cytochrome P450 2C8 attenuate EDHF-mediated Ca(2+) changes and dilation in isolated resistance arteries. In: *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14 (2), S. 255–260.
- Bolz, S. S.; Pohl, U. (1997): Indomethacin enhances endothelial NO release--evidence for a role of PGI2 in the autocrine control of calcium-dependent autacoid production. In: *Cardiovascular research* 36 (3), S. 437–444.
- Bolz, Steffen-Sebastian; Vogel, Lukas; Sollinger, Daniel; Derwand, Roland; Wit, Cor de; Loirand, Gervaise; Pohl, Ulrich (2003): Nitric oxide-induced decrease in calcium sensitivity of resistance arteries is attributable to activation of the myosin light chain phosphatase and antagonized by the RhoA/Rho kinase pathway. In: *Circulation* 107 (24), S. 3081–3087. DOI: 10.1161/01.CIR.0000074202.19612.8C.
- Borrito-Escuela, Dasiel O.; Marcellino, Daniel; Narvaez, Manuel; Flajolet, Marc; Heintz, Nathaniel; Agnati, Luigi et al. (2010): A serine point mutation in the adenosine A2AR C-terminal tail reduces receptor heteromerization and allosteric modulation of the dopamine D2R. In: *Biochemical and biophysical research communications* 394 (1), S. 222–227. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.02.168.
- Boushel, Robert; Langberg, Henning; Gemmer, Carsten; Olesen, Jens; Cramer, Regina; Scheede, Celena et al. (2002): Combined inhibition of nitric oxide and prostaglandins reduces human skeletal muscle blood flow during exercise. In: *The Journal of physiology* 543 (Pt 2), S. 691–698.
- Boushel, R.; Langberg, H.; Green, S.; Skovgaard, D.; Bulow, J.; Kjaer, M. (2000): Blood flow and oxygenation in peritendinous tissue and calf muscle during dynamic exercise in humans. In: *The Journal of physiology* 524 Pt 1, S. 305–313. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2000.t01-2-00305.x.
- Bradley, S. J.; Kingwell, B. A.; McConell, G. K. (1999): Nitric oxide synthase inhibition reduces leg glucose uptake but not blood flow during dynamic exercise in humans. In: *Diabetes* 48 (9), S. 1815–1821.
- Bryan, P. T.; Marshall, J. M. (1999a): Adenosine receptor subtypes and vasodilatation in rat skeletal muscle during systemic hypoxia: a role for A1 receptors. In: *The Journal of physiology* 514 (Pt 1), S. 151–162.
- Bryan, P. T.; Marshall, J. M. (1999b): Cellular mechanisms by which adenosine induces vasodilatation in rat skeletal muscle: significance for systemic hypoxia. In: *The Journal of physiology* 514 (Pt 1), S. 163–175.
- Burns, Wendy R.; Cohen, Kenneth D.; Jackson, William F. (2004): K+-induced dilation of hamster cremasteric arterioles involves both the Na+/K+-ATPase and inward-rectifier K+ channels. In: *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* 11 (3), S. 279–293. DOI: 10.1080/10739680490425985.
- Burnstock, G. (1999): Release of vasoactive substances from endothelial cells by shear stress and purinergic mechanosensory transduction. In: *Journal of anatomy* 194 (Pt 3), S. 335–342.
- Burnstock, G. (2009): Purinergic regulation of vascular tone and remodelling. In: *Autonomic & autacoid pharmacology* 29 (3), S. 63–72. DOI: 10.1111/j.1474-8673.2009.00435.x.
- Butt, E.; Bernhardt, M.; Smolenski, A.; Kotsonis, P.; Fröhlich, L. G.; Sickmann, A. et al. (2000): Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (7), S. 5179–5187.

- Cheng, B.; Essackjee, H. C.; Ballard, H. J. (2000): Evidence for control of adenosine metabolism in rat oxidative skeletal muscle by changes in pH. In: *The Journal of physiology* 522 Pt 3, S. 467–477.
- Chiesa, Scott T.; Trangmar, Steven J.; Kalsi, Kameljit K.; Rakobowchuk, Mark; Banker, Devendar S.; Lotlikar, Makrand D. et al. (2015): Local temperature-sensitive mechanisms are important mediators of limb tissue hyperemia in the heat-stressed human at rest and during small muscle mass exercise. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 309 (2), S. 80. DOI: 10.1152/ajpheart.00078.2015.
- Ciruela, F.; Saura, C.; Canela, E. I.; Mallol, J.; Lluís, C.; Franco, R. (1996): Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors. In: *FEBS letters* 380 (3), S. 219–223.
- Ciruela, Francisco; Albergaria, Catarina; Soriano, Aroa; Cuffi, Laura; Carbonell, Lourdes; Sanchez, Silvia et al. (2010): Adenosine receptors interacting proteins (ARIPs): Behind the biology of adenosine signaling. In: *Biochimica et biophysica acta* 1798 (1), S. 9–20. DOI: 10.1016/j.bbame.2009.10.016.
- Clifford, Philip S.; Hellsten, Ylva (2004): Vasodilatory mechanisms in contracting skeletal muscle. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 97 (1), S. 393–403. DOI: 10.1152/jappphysiol.00179.2004.
- Cohen, Kenneth D.; Sarelius, Ingrid H. (2002): Muscle contraction under capillaries in hamster muscle induces arteriolar dilatation via K(ATP) channels and nitric oxide. In: *The Journal of physiology* 539 (Pt 2), S. 547–555.
- Cohen, R. A.; Weisbrod, R. M. (1988): Endothelium inhibits norepinephrine release from adrenergic nerves of rabbit carotid artery. In: *The American journal of physiology* 254 (5 Pt 2), H871-8. DOI: 10.1152/ajpheart.1988.254.5.H871.
- Colburn, Trenton D.; Weber, Ramona E.; Hageman, K. Sue; Caldwell, Jacob T.; Schulze, Kiana M.; Ade, Carl J. et al. (2020): Vascular ATP-sensitive K⁺ channels support maximal aerobic capacity and critical speed via convective and diffusive O₂ transport. In: *The Journal of physiology*. DOI: 10.1113/JP280232.
- Coleman, H. A.; Tare, M.; Parkington, H. C. (2001): EDHF is not K⁺ but may be due to spread of current from the endothelium in guinea pig arterioles. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 280 (6), H2478-83. DOI: 10.1152/ajpheart.2001.280.6.H2478.
- Collins, D. M.; McCullough, W. T.; Ellsworth, M. L. (1998): Conducted vascular responses: communication across the capillary bed. In: *Microvascular research* 56 (1), S. 43–53. DOI: 10.1006/mvre.1998.2076.
- Coney, A. M.; Marshall, J. M. (1998): Role of adenosine and its receptors in the vasodilatation induced in the cerebral cortex of the rat by systemic hypoxia. In: *The Journal of physiology* 509 (Pt 2), S. 507–518.
- Craig, Jesse C.; Colburn, Trenton D.; Caldwell, Jacob T.; Hirai, Daniel M.; Tabuchi, Ayaka; Baumfalk, Dryden R. et al. (2019a): Central and peripheral factors mechanistically linked to exercise intolerance in heart failure with reduced ejection fraction. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 317 (2), H434-H444. DOI: 10.1152/ajpheart.00164.2019.
- Craig, Jesse C.; Colburn, Trenton D.; Hirai, Daniel M.; Musch, Timothy I.; Poole, David C. (2019b): Sexual dimorphism in the control of skeletal muscle interstitial Po₂ of heart failure rats: effects of dietary nitrate supplementation. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 126 (5), S. 1184–1192. DOI: 10.1152/jappphysiol.01004.2018.
- Craig, Jesse C.; Colburn, Trenton D.; Hirai, Daniel M.; Schettler, Michael J.; Musch, Timothy I.; Poole, David C. (2018): Sex and nitric oxide bioavailability interact to modulate interstitial Po₂ in healthy rat skeletal muscle. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 124 (6), S. 1558–1566. DOI: 10.1152/jappphysiol.01022.2017.
- Crecelius, Anne R.; Kirby, Brett S.; Luckasen, Gary J.; Larson, Dennis G.; Dinunno, Frank A. (2013): Mechanisms of rapid vasodilation after a brief contraction in human skeletal muscle. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 305 (1), S. 40. DOI: 10.1152/ajpheart.00298.2013.
- da Silva, Cleide Gonçalves; Specht, Anke; Wegiel, Barbara; Ferran, Christiane; Kaczmarek, Elzbieta (2009): Mechanism of purinergic activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. In: *Circulation* 119 (6), S. 871–879. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.764571.
- Danielou, G.; Vicaut, E.; Sambe, A.; Aubier, M.; Boczkowski, J. (1997): Predominant role of A₁ adenosine receptors in mediating adenosine induced vasodilatation of rat diaphragmatic arterioles: involvement of nitric oxide and the ATP-dependent K⁺ channels. In: *British journal of pharmacology* 121 (7), S. 1355–1363. DOI: 10.1038/sj.bjp.0701247.
- Dietrich, H. H.; Ellsworth, M. L.; Sprague, R. S.; Dacey, R. G. (2000): Red blood cell regulation of microvascular tone through adenosine triphosphate. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 278 (4), S. 8.
- Domeier, Timothy L.; Segal, Steven S. (2007): Electromechanical and pharmacomechanical signalling pathways for conducted vasodilatation along endothelium of hamster feed arteries. In: *The Journal of physiology* 579 (Pt 1), S. 175–186. DOI: 10.1113/jphysiol.2006.124529.
- Dudzinski, David M.; Michel, Thomas (2007): Life history of eNOS: partners and pathways. In: *Cardiovascular research* 75 (2), S. 247–260. DOI: 10.1016/j.cardiores.2007.03.023.
- Duza, Tasmia; Sarelius, Ingrid H. (2003): Conducted dilations initiated by purines in arterioles are endothelium dependent and require endothelial Ca²⁺. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 285 (1), S. 37. DOI: 10.1152/ajpheart.00788.2002.
- Dyke, C. K.; Proctor, D. N.; Dietz, N. M.; Joyner, M. J. (1995): Role of nitric oxide in exercise hyperaemia during prolonged rhythmic handgripping in humans. In: *The Journal of physiology* 488 (Pt 1), S. 259–265.
- Eckle, Tobias; Krahn, Thomas; Grenz, Almut; Köhler, David; Mittelbronn, Michel; Ledent, Catherine et al. (2007): Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A_{2B} adenosine receptors. In: *Circulation* 115 (12), S. 1581–1590. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.669697.

- Edmunds, N. J.; Marshall, J. M. (2001a): Oxygen delivery and oxygen consumption in rat hindlimb during systemic hypoxia: role of adenosine. In: *The Journal of physiology* 536 (Pt 3), S. 927–935.
- Edmunds, N. J.; Marshall, J. M. (2001b): Vasodilatation, oxygen delivery and oxygen consumption in rat hindlimb during systemic hypoxia: roles of nitric oxide. In: *The Journal of physiology* 532 (Pt 1), S. 251–259.
- Ellsworth, M. L.; Forrester, T.; Ellis, C. G.; Dietrich, H. H. (1995): The erythrocyte as a regulator of vascular tone. In: *The American journal of physiology* 269 (6 Pt 2), S. 61.
- Emerson, G. G.; Segal, S. S. (2000): Electrical coupling between endothelial cells and smooth muscle cells in hamster feed arteries: role in vasomotor control. In: *Circulation research* 87 (6), S. 474–479. DOI: 10.1161/01.res.87.6.474.
- Fisslthaler, B.; Popp, R.; Kiss, L.; Potente, M.; Harder, D. R.; Fleming, I.; Busse, R. (1999): Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. In: *Nature* 401 (6752), S. 493–497. DOI: 10.1038/46816.
- Flach, Tracy L.; Pang, Winston; Chau, Elaine M. T.; Desrosiers, Melanie D.; Shi, Yan (2009): Adenosine primes resting stage dendritic cells before their activation. In: *Biochemical and biophysical research communications* 380 (4), S. 748–751. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.01.114.
- Fleming, Ingrid; Busse, Rudi (2003): Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 284 (1), S. 12. DOI: 10.1152/ajpregu.00323.2002.
- Fox, Ervin R.; Young, J. Hunter; Li, Yali; Dreisbach, Albert W.; Keating, Brendan J.; Musani, Solomon K. et al. (2011): Association of genetic variation with systolic and diastolic blood pressure among African Americans: the Candidate Gene Association Resource study. In: *Human molecular genetics* 20 (11), S. 2273–2284. DOI: 10.1093/hmg/ddr092.
- Frandsen, U.; Bangsbo, J.; Sander, M.; Hoffner, L.; Betak, A.; Saltin, B.; Hellsten, Y. (2001): Exercise-induced hyperaemia and leg oxygen uptake are not altered during effective inhibition of nitric oxide synthase with N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in humans. In: *The Journal of physiology* 531 (Pt 1), S. 257–264.
- Frisbee, Jefferson C.; Delp, Michael D. (2006): Vascular function in the metabolic syndrome and the effects on skeletal muscle perfusion: lessons from the obese Zucker rat. In: *Essays in biochemistry* 42, S. 145–161. DOI: 10.1042/bse0420145.
- Fujii, Naoto; McGarr, Gregory W.; Kenny, Glen P.; Amano, Tatsuro; Honda, Yasushi; Kondo, Narihiko; Nishiyasu, Takeshi (2020): NO-mediated activation of KATP channels contributes to cutaneous thermal hyperemia in young adults. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 318 (2), R390-R398. DOI: 10.1152/ajpregu.00176.2019.
- Garten, Ryan S.; Groot, H. Jonathan; Rossman, Matthew J.; Gifford, Jayson R.; Richardson, Russell S. (2014): The role of muscle mass in exercise-induced hyperemia. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 116 (9), S. 1204–1209. DOI: 10.1152/jappphysiol.00103.2014.
- Gilligan, D. M.; Panza, J. A.; Kilcoyne, C. M.; Waclawiw, M. A.; Casino, P. R.; Quyyumi, A. A. (1994): Contribution of endothelium-derived nitric oxide to exercise-induced vasodilation. In: *Circulation* 90 (6), S. 2853–2858.
- González-Alonso, José; Olsen, David B.; Saltin, Bengt (2002): Erythrocyte and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery: role of circulating ATP. In: *Circulation research* 91 (11), S. 1046–1055.
- Gordon, J. L. (1986): Extracellular ATP: effects, sources and fate. In: *The Biochemical journal* 233 (2), S. 309–319.
- Griffith, T. M.; Edwards, D. H.; Davies, R. L.; Harrison, T. J.; Evans, K. T. (1987): EDRF coordinates the behaviour of vascular resistance vessels. In: *Nature* 329 (6138), S. 442–445. DOI: 10.1038/329442a0.
- Gunnar Schulte (2004): Adenosin, Adenosinrezeptoren und adenosinrezeptoraktivierte Signalwege. In: *BIOspektrum* 10, S. 159–161.
- Guns, Pieter-Jan D. F.; Korda, Andras; Crauwels, Herta M.; van Assche, Tim; Robaye, Bernard; Boeynaems, Jean-Marie; Bult, Hidde (2005): Pharmacological characterization of nucleotide P2Y receptors on endothelial cells of the mouse aorta. In: *British journal of pharmacology* 146 (2), S. 288–295. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706326.
- Hallén, J. (1996): K⁺ balance in humans during exercise. In: *Acta physiologica Scandinavica* 156 (3), S. 279–286. DOI: 10.1046/j.1365-201X.1996.187000.x.
- Hammer, L. W.; Ligon, A. L.; Hester, R. L. (2001): Differential inhibition of functional dilation of small arterioles by indomethacin and glibenclamide. In: *Hypertension* 37 (2 Pt 2), S. 599–603.
- Hansen, Pernille B.; Schnermann, Jürgen (2003): Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the kidney. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 285 (4), S. 9. DOI: 10.1152/ajprenal.00051.2003.
- Hansmann, G.; Ihling, C.; Pieske, B.; Bultmann, R. (1998): Nucleotide-evoked relaxation of human coronary artery. In: *European journal of pharmacology* 359 (1), S. 59–67.
- Harrington, L. S.; Evans, R. J.; Wray, J.; Norling, L.; Swales, K. E.; Vial, C. et al. (2007): Purinergic 2X1 receptors mediate endothelial dependent vasodilation to ATP. In: *Molecular pharmacology* 72 (5), S. 1132–1136. DOI: 10.1124/mol.107.037325.
- Heinonen, Ilkka; Saltin, Bengt; Kempainen, Jukka; Sipilä, Hannu T.; Oikonen, Vesa; Nuutila, Pirjo et al. (2011): Skeletal muscle blood flow and oxygen uptake at rest and during exercise in humans: a pet study with nitric oxide and cyclooxygenase inhibition. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 300 (4), S. 7. DOI: 10.1152/ajpheart.00996.2010.

- Hellsten, Y.; Nyberg, M.; Jensen, L. G.; Mortensen, S. P. (2012): Vasodilator interactions in skeletal muscle blood flow regulation. In: *The Journal of physiology* 590 (Pt 24), S. 6297–6305. DOI: 10.1113/jphysiol.2012.240762.
- Hillig, Thore; Krusturup, Peter; Fleming, Ingrid; Osada, Takuya; Saltin, Bengt; Hellsten, Ylva (2003): Cytochrome P450 2C9 plays an important role in the regulation of exercise-induced skeletal muscle blood flow and oxygen uptake in humans. In: *The Journal of physiology* 546 (Pt 1), S. 307–314.
- Holdsworth, Clark T.; Copp, Steven W.; Ferguson, Scott K.; Sims, Gabrielle E.; Poole, David C.; Musch, Timothy I. (2015): Acute inhibition of ATP-sensitive K⁺ channels impairs skeletal muscle vascular control in rats during treadmill exercise. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 308 (11), S. 42. DOI: 10.1152/ajpheart.00772.2014.
- Holdsworth, Clark T.; Ferguson, Scott K.; Poole, David C.; Musch, Timothy I. (2016): Modulation of rat skeletal muscle microvascular O₂ pressure via KATP channel inhibition following the onset of contractions. In: *Respiratory physiology & neurobiology* 222, S. 48–54. DOI: 10.1016/j.resp.2015.11.012.
- Jackson, W. F. (1993): Arteriolar tone is determined by activity of ATP-sensitive potassium channels. In: *The American journal of physiology* 265 (5 Pt 2), S. 803.
- Jagger, J. E.; Bateman, R. M.; Ellsworth, M. L.; Ellis, C. G. (2001): Role of erythrocyte in regulating local O₂ delivery mediated by hemoglobin oxygenation. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 280 (6), S. 9.
- Joyner, Michael J.; Casey, Darren P. (2015): Regulation of increased blood flow (hyperemia) to muscles during exercise: a hierarchy of competing physiological needs. In: *Physiological reviews* 95 (2), S. 549–601. DOI: 10.1152/physrev.00035.2013.
- Kameritsch, P.; Hoffmann, A.; Pohl, U. (2003): Opposing effects of nitric oxide on different connexins expressed in the vascular system. In: *Cell communication & adhesion* 10 (4-6), S. 305–309. DOI: 10.1080/cac.10.4-6.305.309.
- Kingwell, Bronwyn A.; Formosa, Melissa; Muhlmann, Michael; Bradley, Scott J.; McConell, Glenn K. (2002): Nitric oxide synthase inhibition reduces glucose uptake during exercise in individuals with type 2 diabetes more than in control subjects. In: *Diabetes* 51 (8), S. 2572–2580.
- Kirby, Brett S.; Carlson, Rick E.; Markwald, Rachel R.; Voyles, Wyatt F.; Dinunno, Frank A. (2007): Mechanical influences on skeletal muscle vascular tone in humans: insight into contraction-induced rapid vasodilatation. In: *The Journal of physiology* 583 (Pt 3), S. 861–874. DOI: 10.1113/jphysiol.2007.131250.
- Kirby, Brett S.; Voyles, Wyatt F.; Carlson, Rick E.; Dinunno, Frank A. (2008): Graded sympatholytic effect of exogenous ATP on postjunctional alpha-adrenergic vasoconstriction in the human forearm: implications for vascular control in contracting muscle. In: *The Journal of physiology* 586 (17), S. 4305–4316. DOI: 10.1113/jphysiol.2008.154252.
- Knot, H. J.; Zimmermann, P. A.; Nelson, M. T. (1996): Extracellular K⁽⁺⁾-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K⁽⁺⁾ channels. In: *The Journal of physiology* 492 (Pt 2), S. 419–430. DOI: 10.1113/jphysiol.1996.sp021318.
- Kubo, M.; Nakaya, Y.; Matsuoka, S.; Saito, K.; Kuroda, Y. (1994): Atrial natriuretic factor and isosorbide dinitrate modulate the gating of ATP-sensitive K⁺ channels in cultured vascular smooth muscle cells. In: *Circulation research* 74 (3), S. 471–476.
- Kuo, L.; Chancellor, J. D. (1995): Adenosine potentiates flow-induced dilation of coronary arterioles by activating KATP channels in endothelium. In: *The American journal of physiology* 269 (2 Pt 2), S. 9.
- Lalande, Sophie; Gusso, Silmara; Hofman, Paul L.; Baldi, James C. (2008): Reduced leg blood flow during submaximal exercise in type 2 diabetes. In: *Medicine and science in sports and exercise* 40 (4), S. 612–617. DOI: 10.1249/MSS.0b013e318161aa99.
- Layland, Jamie; Carrick, David; Lee, Matthew; Oldroyd, Keith; Berry, Colin (2014): Adenosine: physiology, pharmacology, and clinical applications. In: *JACC. Cardiovascular interventions* 7 (6), S. 581–591. DOI: 10.1016/j.jcin.2014.02.009.
- Li, J. m.; Fenton, R. A.; Wheeler, H. B.; Powell, C. C.; Peyton, B. D.; Cutler, B. S.; Dobson, J. G. (1998): Adenosine A_{2a} receptors increase arterial endothelial cell nitric oxide. In: *The Journal of surgical research* 80 (2), S. 357–364.
- Lo, S. M.; Mo, F. M.; Ballard, H. J. (2001): Interstitial adenosine concentration in rat red or white skeletal muscle during systemic hypoxia or contractions. In: *Experimental physiology* 86 (5), S. 593–598.
- Lombard, J. H.; Liu, Y.; Fredricks, K. T.; Bizub, D. M.; Roman, R. J.; Rusch, N. J. (1999): Electrical and mechanical responses of rat middle cerebral arteries to reduced PO₂ and prostacyclin. In: *The American journal of physiology* 276 (2 Pt 2), S. 16.
- Mackie, B. G.; Terjung, R. L. (1983): Blood flow to different skeletal muscle fiber types during contraction. In: *The American journal of physiology* 245 (2), H265–75. DOI: 10.1152/ajpheart.1983.245.2.H265.
- Marshall, Janice M. (2007): The roles of adenosine and related substances in exercise hyperaemia. In: *The Journal of physiology* 583 (Pt 3), S. 835–845. DOI: 10.1113/jphysiol.2007.136416.
- Mathieson, J. J.; Burnstock, G. (1985): Purine-mediated relaxation and constriction of isolated rabbit mesenteric artery are not endothelium-dependent. In: *European journal of pharmacology* 118 (3), S. 221–229.
- Maurice, D. H.; Haslam, R. J. (1990): Molecular basis of the synergistic inhibition of platelet function by nitrovasodilators and activators of adenylate cyclase: inhibition of cyclic AMP breakdown by cyclic GMP. In: *Molecular pharmacology* 37 (5), S. 671–681.
- McMillan, M. R.; Burnstock, G.; Haworth, S. G. (1999): Vasodilatation of intrapulmonary arteries to P₂-receptor nucleotides in normal and pulmonary hypertensive newborn piglets. In: *British journal of pharmacology* 128 (3), S. 543–548. DOI: 10.1038/sj.bjp.0702815.

- Merkel, L. A.; Lappe, R. W.; Rivera, L. M.; Cox, B. F.; Perrone, M. H. (1992): Demonstration of vasorelaxant activity with an A1-selective adenosine agonist in porcine coronary artery: involvement of potassium channels. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 260 (2), S. 437–443.
- Mian, R.; Marshall, J. M. (1991): The role of adenosine in dilator responses induced in arterioles and venules of rat skeletal muscle by systemic hypoxia. In: *The Journal of physiology* 443, S. 499–511.
- Milkau, Malte; Köhler, Ralf; Wit, Cor de (2010): Crucial importance of the endothelial K⁺ channel SK3 and connexin40 in arteriolar dilations during skeletal muscle contraction. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24 (9), S. 3572–3579. DOI: 10.1096/fj.10-158956.
- Miura, Hiroto; Bosnjak, John J.; Ning, Gang; Saito, Takashi; Miura, Mamoru; Gutterman, David D. (2003): Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. In: *Circulation research* 92 (2), S. 40.
- Miyagi, Y.; Kobayashi, S.; Nishimura, J.; Fukui, M.; Kanaide, H. (1996): Dual regulation of cerebrovascular tone by UTP: P2U receptor-mediated contraction and endothelium-dependent relaxation. In: *British journal of pharmacology* 118 (4), S. 847–856.
- Mo, F. M.; Ballard, H. J. (1997): Intracellular lactate controls adenosine output from dog gracilis muscle during moderate systemic hypoxia. In: *The American journal of physiology* 272 (1 Pt 2), S. 24.
- Mortensen, S. P.; McAllister, R. M.; Yang, H. T.; Hellsten, Y.; Laughlin, M. H. (2014): The effect of purinergic P2 receptor blockade on skeletal muscle exercise hyperemia in miniature swine. In: *European journal of applied physiology* 114 (10), S. 2147–2155. DOI: 10.1007/s00421-014-2932-8.
- Mortensen, Stefan P.; González-Alonso, José; Bune, Laurids T.; Saltin, Bengt; Pilegaard, Henriette; Hellsten, Ylva (2009a): ATP-induced vasodilation and purinergic receptors in the human leg: roles of nitric oxide, prostaglandins, and adenosine. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 296 (4), S. 8. DOI: 10.1152/ajpregu.90822.2008.
- Mortensen, Stefan P.; González-Alonso, José; Damsgaard, Rasmus; Saltin, Bengt; Hellsten, Ylva (2007): Inhibition of nitric oxide and prostaglandins, but not endothelial-derived hyperpolarizing factors, reduces blood flow and aerobic energy turnover in the exercising human leg. In: *The Journal of physiology* 581 (Pt 2), S. 853–861. DOI: 10.1113/jphysiol.2006.127423.
- Mortensen, Stefan P.; Nyberg, Michael; Thaning, Pia; Saltin, Bengt; Hellsten, Ylva (2009b): Adenosine contributes to blood flow regulation in the exercising human leg by increasing prostaglandin and nitric oxide formation. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 53 (6), S. 993–999. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.130880.
- Mundell, Stuart; Kelly, Eamonn (2011): Adenosine receptor desensitization and trafficking. In: *Biochimica et biophysica acta* 1808 (5), S. 1319–1328. DOI: 10.1016/j.bbame.2010.06.007.
- Murrant, Coral L.; Sarelius, Ingrid H. (2002): Multiple dilator pathways in skeletal muscle contraction-induced arteriolar dilations. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 282 (4), S. 78. DOI: 10.1152/ajpregu.00405.2001.
- Nyberg, Michael; Al-Khazraji, Baraa K.; Mortensen, Stefan P.; Jackson, Dwayne N.; Ellis, Christopher G.; Hellsten, Ylva (2013): Effect of extraluminal ATP application on vascular tone and blood flow in skeletal muscle: implications for exercise hyperemia. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 305 (3), S. 90. DOI: 10.1152/ajpregu.00189.2013.
- Nyberg, Michael; Mortensen, Stefan P.; Thaning, Pia; Saltin, Bengt; Hellsten, Ylva (2010): Interstitial and plasma adenosine stimulate nitric oxide and prostacyclin formation in human skeletal muscle. In: *Hypertension* 56 (6), S. 1102–1108. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.161521.
- Pohl, U.; Holtz, J.; Busse, R.; Bassenge, E. (1986): Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 8 (1), S. 37–44. DOI: 10.1161/01.hyp.8.1.37.
- Pohl, Ulrich (2020): Connexins: Key Players in the Control of Vascular Plasticity and Function. In: *Physiological reviews* 100 (2), S. 525–572. DOI: 10.1152/physrev.00010.2019.
- Poucher, S. M. (1996): The role of the A(2A) adenosine receptor subtype in functional hyperaemia in the hindlimb of anaesthetized cats. In: *The Journal of physiology* 492 (Pt 2), S. 495–503.
- Rådegran, G.; Calbet, J. A. (2001): Role of adenosine in exercise-induced human skeletal muscle vasodilatation. In: *Acta physiologica Scandinavica* 171 (2), S. 177–185. DOI: 10.1046/j.1365-201x.2001.00796.x.
- Rådegran, G.; Hellsten, Y. (2000): Adenosine and nitric oxide in exercise-induced human skeletal muscle vasodilatation. In: *Acta physiologica Scandinavica* 168 (4), S. 575–591. DOI: 10.1046/j.1365-201x.2000.00705.x.
- Rådegran, G.; Saltin, B. (1999): Nitric oxide in the regulation of vasomotor tone in human skeletal muscle. In: *The American journal of physiology* 276 (6 Pt 2), S. 60.
- Raqeeb, Abdul; Sheng, Jianzhong; Ao, Ni; Braun, Andrew P. (2011): Purinergic P2Y2 receptors mediate rapid Ca(2+) mobilization, membrane hyperpolarization and nitric oxide production in human vascular endothelial cells. In: *Cell calcium* 49 (4), S. 240–248. DOI: 10.1016/j.ceca.2011.02.008.
- Ray, Clare J.; Abbas, Mark R.; Coney, Andrew M.; Marshall, Janice M. (2002): Interactions of adenosine, prostaglandins and nitric oxide in hypoxia-induced vasodilatation: in vivo and in vitro studies. In: *The Journal of physiology* 544 (Pt 1), S. 195–209.

- Ray, Clare J.; Marshall, Janice M. (2009): Elucidation in the rat of the role of adenosine and A2A-receptors in the hyperaemia of twitch and tetanic contractions. In: *The Journal of physiology* 587 (Pt 7), S. 1565–1578. DOI: 10.1113/jphysiol.2008.163683.
- Renaud, J. M.; Gramolini, A.; Light, P.; Comtois, A. (1996): Modulation of muscle contractility during fatigue and recovery by ATP sensitive potassium channel. In: *Acta physiologica Scandinavica* 156 (3), S. 203–212. DOI: 10.1046/j.1365-201X.1996.210000.x.
- Rosenmeier, Jaya B.; Hansen, Jim; González-Alonso, José (2004): Circulating ATP-induced vasodilatation overrides sympathetic vasoconstrictor activity in human skeletal muscle. In: *The Journal of physiology* 558 (Pt 1), S. 351–365. DOI: 10.1113/jphysiol.2004.063107.
- Rubin, L. J.; Johnson, L. R.; Dodam, J. R.; Dhalla, A. K.; Magliola, L.; Laughlin, M. H.; Jones, A. W. (2000): Selective transport of adenosine into porcine coronary smooth muscle. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 279 (3), S. 410.
- Saito, Y.; McKay, M.; Eraslan, A.; Hester, R. L. (1996): Functional hyperemia in striated muscle is reduced following blockade of ATP-sensitive potassium channels. In: *The American journal of physiology* 270 (5 Pt 2), S. 54.
- Saitoh, Shu-ichi; Zhang, Cuihua; Tane, Johnathan D.; Potter, Barry; Kiyooka, Takahiko; Rogers, Paul A. et al. (2006): Hydrogen peroxide: a feed-forward dilator that couples myocardial metabolism to coronary blood flow. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26 (12), S. 2614–2621. DOI: 10.1161/01.ATV.0000249408.55796.da.
- Sandow, Shaun L.; Tare, Marianne; Coleman, Harold A.; Hill, Caryl E.; Parkington, Helena C. (2002): Involvement of myoendothelial gap junctions in the actions of endothelium-derived hyperpolarizing factor. In: *Circulation research* 90 (10), S. 1108–1113. DOI: 10.1161/01.res.0000019756.88731.83.
- Sarelius, I.; Pohl, U. (2010): Control of muscle blood flow during exercise: local factors and integrative mechanisms. In: *Acta physiologica (Oxford, England)* 199 (4), S. 349–365. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2010.02129.x.
- Sato, Atsushi; Terata, Ken; Miura, Hiroto; Toyama, Kazuyoshi; Loberiza, Fausto R., JR; Hatoum, Ossama A. et al. (2005): Mechanism of vasodilation to adenosine in coronary arterioles from patients with heart disease. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 288 (4), S. 40. DOI: 10.1152/ajpheart.00575.2004.
- Schrage, William G.; Dietz, Niki M.; Joyner, Michael J. (2006): Effects of combined inhibition of ATP-sensitive potassium channels, nitric oxide, and prostaglandins on hyperemia during moderate exercise. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 100 (5), S. 1506–1512. DOI: 10.1152/jappphysiol.01639.2005.
- Schrage, William G.; Joyner, Michael J.; Dinunno, Frank A. (2004): Local inhibition of nitric oxide and prostaglandins independently reduces forearm exercise hyperaemia in humans. In: *The Journal of physiology* 557 (Pt 2), S. 599–611. DOI: 10.1113/jphysiol.2004.061283.
- Schuchardt, Mirjam; Tolle, Markus; van der Giet, Markus (2012): P2Y purinoceptors as potential emerging therapeutical target in vascular disease. In: *Current pharmaceutical design* 18 (37), S. 6169–6180.
- Segal, S. S.; Kurjaka, D. T. (1995): Coordination of blood flow control in the resistance vasculature of skeletal muscle. In: *Medicine and science in sports and exercise* 27 (8), S. 1158–1164.
- Sharifi-Sanjani, Maryam; Zhou, Xueping; Asano, Shinichi; Tilley, Stephen; Ledent, Catherine; Teng, Bunyen et al. (2013): Interactions between A(2A) adenosine receptors, hydrogen peroxide, and KATP channels in coronary reactive hyperemia. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 304 (10), S. 301. DOI: 10.1152/ajpheart.00637.2012.
- Siegl, Daniel; Koeppen, Michael; Wöfle, Stephanie E.; Pohl, Ulrich; Wit, Cor de (2005): Myoendothelial coupling is not prominent in arterioles within the mouse cremaster microcirculation in vivo. In: *Circulation research* 97 (8), S. 781–788. DOI: 10.1161/01.RES.0000186193.22438.6c.
- Sprague, R. S.; Ellsworth, M. L.; Stephenson, A. H.; Lonigro, A. J. (1996): ATP: the red blood cell link to NO and local control of the pulmonary circulation. In: *The American journal of physiology* 271 (6 Pt 2), S. 22.
- Sun, Dong; Huang, An; Kaley, Gabor (2004): Mechanical compression elicits NO-dependent increases in coronary flow. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 287 (6), H2454-60. DOI: 10.1152/ajpheart.00364.2004.
- Thomas, G. D.; Hansen, J.; Victor, R. G. (1997): ATP-sensitive potassium channels mediate contraction-induced attenuation of sympathetic vasoconstriction in rat skeletal muscle. In: *The Journal of clinical investigation* 99 (11), S. 2602–2609. DOI: 10.1172/JCI119448.
- Thomas, Gail D.; Segal, Steven S. (2004): Neural control of muscle blood flow during exercise. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 97 (2), S. 731–738. DOI: 10.1152/jappphysiol.00076.2004.
- Tschakovsky, Michael E.; Sheriff, Don D. (2004): Immediate exercise hyperemia: contributions of the muscle pump vs. rapid vasodilation. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 97 (2), S. 739–747. DOI: 10.1152/jappphysiol.00185.2004.
- van der Giet, Markus; Schmidt, Sven; Tolle, Markus; Jankowski, Joachim; Schluter, Hartmut; Zidek, Walter; Tepel, Martin (2002): Effects of dinucleoside polyphosphates on regulation of coronary vascular tone. In: *European journal of pharmacology* 448 (2-3), S. 207–213.
- Vials, A.; Burnstock, G. (1993): A2-purinoceptor-mediated relaxation in the guinea-pig coronary vasculature: a role for nitric oxide. In: *British journal of pharmacology* 109 (2), S. 424–429.
- Watanabe, Sachiko; Yashiro, Yasuaki; Mizuno, Risuke; Ohhashi, Toshio (2005): Involvement of NO and EDHF in flow-induced vasodilation in isolated hamster cremasteric arterioles. In: *Journal of vascular research* 42 (2), S. 137–147. DOI: 10.1159/000083652.

- Welsh, D. G.; Segal, S. S. (1998): Endothelial and smooth muscle cell conduction in arterioles controlling blood flow. In: *The American journal of physiology* 274 (1 Pt 2), S. 86.
- Wit, C. de; Bismarck, P. von; Pohl, U. (1994): Synergistic action of vasodilators that increase cGMP and cAMP in the hamster cremaster microcirculation. In: *Cardiovascular research* 28 (10), S. 1513–1518.
- Wit, C. de; Schäfer, C.; Bismarck, P. von; Bolz, S. S.; Pohl, U. (1997): Elevation of plasma viscosity induces sustained NO-mediated dilation in the hamster cremaster microcirculation in vivo. In: *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 434 (4), S. 354–361. DOI: 10.1007/s004240050408.
- Wit, Cor de (2010): Different pathways with distinct properties conduct dilations in the microcirculation in vivo. In: *Cardiovascular research* 85 (3), S. 604–613. DOI: 10.1093/cvr/cvp340.
- Wit, Cor de; Griffith, Tudor M. (2010): Connexins and gap junctions in the EDHF phenomenon and conducted vasomotor responses. In: *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 459 (6), S. 897–914. DOI: 10.1007/s00424-010-0830-4.
- Xiang, Lusha; Naik, Jay S.; Hodnett, Benjamin L.; Hester, Robert L. (2006): Altered arachidonic acid metabolism impairs functional vasodilation in metabolic syndrome. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 290 (1), R134-8. DOI: 10.1152/ajpregu.00295.2005.
- Yada, Toyotaka; Shimokawa, Hiroaki; Hiramatsu, Osamu; Kajita, Tatsuya; Shigeto, Fumiyuki; Goto, Masami et al. (2003): Hydrogen peroxide, an endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor, plays an important role in coronary autoregulation in vivo. In: *Circulation* 107 (7), S. 1040–1045.
- Yang, Ailian; Mucsi, Ashley D.; Desrosiers, Melanie D.; Chen, Jiang-Fan; Schnermann, Jürgen B.; Blackburn, Michael R.; Shi, Yan (2010): Adenosine mediated desensitization of cAMP signaling enhances T-cell responses. In: *European journal of immunology* 40 (2), S. 449–459. DOI: 10.1002/eji.200939586.
- Zaritsky, J. J.; Eckman, D. M.; Wellman, G. C.; Nelson, M. T.; Schwarz, T. L. (2000): Targeted disruption of Kir2.1 and Kir2.2 genes reveals the essential role of the inwardly rectifying K(+) current in K(+)-mediated vasodilation. In: *Circulation research* 87 (2), S. 160–166. DOI: 10.1161/01.res.87.2.160.
- Zhou, Xueping; Teng, Bunyen; Tilley, Stephen; Ledent, Catherine; Mustafa, S. Jamal (2014): Metabolic hyperemia requires ATP-sensitive K⁺ channels and H₂O₂ but not adenosine in isolated mouse hearts. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 307 (7), S. 55. DOI: 10.1152/ajpheart.00421.2014.
- Zhou, Xueping; Teng, Bunyen; Tilley, Stephen; Mustafa, S. Jamal (2013): A1 adenosine receptor negatively modulates coronary reactive hyperemia via counteracting A2A-mediated H₂O₂ production and KATP opening in isolated mouse hearts. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 305 (11), H1668-79. DOI: 10.1152/ajpheart.00495.2013.
- Zhou, Xueping; Teng, Bunyen; Tilley, Stephen; Mustafa, S. Jamal (2013): A1 adenosine receptor negatively modulates coronary reactive hyperemia via counteracting A2A-mediated H₂O₂ production and KATP opening in isolated mouse hearts. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 305 (11), H1668-79. DOI: 10.1152/ajpheart.00495.2013.

7. Anhang

Mikroskop	Axioskop FS von Zeiss
OP-Mikroskop	Wild Heerbrugg Wild M650
Nähfaden	Fa. Serapen; EP 0,7 (6/0) Nadel DR-9 / Best.Nr. CO 07340A
Glasliege	Eigenproduktion
Heizfolie	HR5423R131L12A Fa Telemeter Electronic GmbH, Donauwörth
Narkose Midazolam Dexmedetomidin Fentanyl Pentobarbital-Natrium	Midazolam Hameln, 5 mg/ml, hamelnpharma plus GmbH Dexdomitor 0,5 mg/ml, Elanco Animal Health, Bad Homburg Curamed, Karlsruhe Narcoren, Fa. Merial GmbH
Rasierer	Fa. Aesculap, „Isis“ GT420
Tubus	Fa. Portex Polythene Tubing, 0,86 mm Innendurchmesser, 1,27 mm Außendurchmesser
ZVK-Schlauch	Fa. Portex, Smiths medical, 0,4 mm Innendurchmesser, 0,8 mm Außendurchmesser
Perfusor	Fa. WPI Kat. No. 78-9100W
Beatmungsgerät	Fa. Hugo Sachs, Type 845
Adenosin	Fluka, Sigma Aldrich, Steinheim
Acetylcholin	Sigma Aldrich, Steinheim
Adenosin A ₂ Antagonist	Fa. Sigma, Produktnummer D134
Glibenclamid	Fa. Sigma, Best. Nr. G0639
Adenosinrezeptor-Antagonist	Fa. Sigma, Produktnummer A022
ADP	Fa. Sigma, Best. Nr. A2754
P ₂ Y-Antagonist	Fa. Sigma, Produktnummer P178

Indometacin	Fa. Promedica (gruppochiesie), Via Palermo 26/A, Parma
L-Na	Fa. Sigma, Best.Nr. N5501
Ringerlösung: Stammlösung 1 200 ml Stammlösung 2 200 ml Aqua Bidest 4.600 ml	
Stammlösung 1: NaCl 118,4 mM KCl 3,8 mM CaCl ₂ + 2H ₂ O 2,5 mM MgSO ₄ + 7H ₂ O 1,2 mM	Fa. Carl Roth, Art.Nr. 3957.1 Fa. Merck, Art.Nr. 1.04936.1000 Fa. Merck, Art.Nr. 1.02382.1000 Fa. Merck, Art.Nr. 5886
Stammlösung 2: NaHCO ₃ 20 mM KH ₂ PO ₄ 1,2 mM	Fa. Merck, Art.Nr. 1.063232500 Fa. Merck, Art.Nr. 1.04873.1000

8. Präsentationen und Auszeichnungen

- 02.10.2014: **Poster** und **Posterpreis** auf dem „3rd Joint Meeting of the German Society for Microcirculation and Vascular Biology and the Swiss Society for Microcirculation and Vascular Research“ in Münster
- 10.06.2015: **Poster** und **Posterpreis** bei der Präsentation von Forschungsprojekten für die Öffentlichkeit im Rahmen von „Uni im Dialog“ in Lübeck
- 13.06.2015: **Poster** bei der „20. Jahrestagung der Physiologen im Ostseeraum“ in Hamburg
- 16.12.2016: **Vortrag** im Rahmen der „Norddeutschen Anästhesietage“ in Hamburg
- 03.05.2017: **Vortrag** im Rahmen des „Deutschen Anästhesiekongresses“ in Nürnberg

9. Publikationen

- 2021 K_{ATP} channels and NO dilate redundantly intramuscular arterioles during electrical stimulation of the skeletal muscle in mice
Simon Schemke, Cor de Wit
Pflugers Arch. 2021 Nov;473(11):1795-1806. doi: 10.1007/s00424-021-02607-1.

- 2020 Notfallmedizin in der Deutschen Gesellschaft zur Rettung Schiffbrüchiger (DGzRS) – Auswertung medizinischer Notfälle auf der Nord- und Ostsee über 2 Jahre
Schemke, S.; Schwalbe, H.; Grunewald, L.; Maurer, H. (2020); In: Der Anaesthetist. DOI: 10.1007/s00101-020-00885-5.

- 2020 Fluid therapy with gelatin may have deleterious effects on kidney function: an observational trial.
Heringlake, Matthias; Berggreen, Astrid E.; Reemts, Enno; Schemke, Simon; Balzer, Felix; Charitos, Efstratios I. et al. (2020); In: Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia 34 (10), S. 2674–2681. DOI: 10.1053/j.jvca.2020.03.037.

- 2019 Optimisation of Perioperative Cardiovascular Management to Improve Surgical Outcome II (OPTIMISE II) trial: study protocol for a multicentre international trial of cardiac output-guided fluid therapy with low-dose inotrope infusion compared with usual care in patients undergoing major elective gastrointestinal surgery.
Edwards, Mark R.; Forbes, Gordon; MacDonald, Neil; Berdunov, Vladislav; Mihaylova, Borislava; Dias, Priyanthi et al. (2019); In: BMJ open 9 (1), e023455. DOI: 10.1136/bmjopen-2018-023455.

- 2015 Adenosine contributes to active hyperemia in the murine skeletal muscle through activation of K_{ATP} -channels
Schmidt, K.; Schemke, S.; de Wit, C.
Acta Physiol. 213 (Suppl 699): 154

10. Danksagung

Mein größter Dank gebührt meiner Familie. Nur durch ihr unermüdliches Engagement, weit über die Finanzierung meines Studiums hinaus, haben sie meine Ergebnisse und Leistungen erst möglich gemacht. In den vielen Phasen der Anstrengung und Mühe, die ein Medizinstudium mit sich bringt, hat mir die nicht endende Unterstützung meiner Eltern, meines Bruders und meiner Partnerin über viele Hürden geholfen.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Cor de Wit danke ich für die Überlassung des bearbeiteten Themas, seine Unterstützung und für die Einführung in die Welt der medizinischen Forschung.

Nicht zuletzt möchte ich auch Rita Meuer und Dr. rer. nat. Kjestine Schmidt danken. Durch ihr unglaubliches Wissen und ihre große Geduld, ihre Erfahrung mit mir zu teilen, habe ich die nötigen Grundlagen erlernt, meine Experimente durchzuführen.